



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**Producción y papel de las hormonas esteroides  
sexuales en los cisticercos de *Taenia solium* y de  
*Taenia crassiceps*.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**PEDRO ISAÍAS JIMÉNEZ ESTRADA**

**TUTORA: Dra. MARTA CATALINA ROMANO PARDO**

**COMITÉ TUTORAL: Dra. ALINE SHUNEMANN DE ALUJA  
Dr. CARLOS LARRALDE RANGEL**

**México, D. F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Para ser científico debo afirmar lo que veo y negar*

*lo que creo*

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de la Dra. Marta Catalina Romano Pardo del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, en colaboración con el Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

## DEDICATORIA

*Antes que a nadie, a mi madre, quien ya no pudo ver terminado este proyecto. Me quedo con tus enseñanzas y consejos. Nunca te olvidaré.*

*A Aby por su constante impulso para seguir adelante y por hacer de mí una mejor persona.*

*A Melissa, mi niña, motor de mi vida, con todo mi amor.*

*A mis hermanos, por darme los mejores momentos de mi infancia y por estar conmigo en los momentos difíciles.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Marta Romano por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio y por brindarme su amistad y conocimientos.

A la Dra. Abigail Betanzos por sus pacientes enseñanzas y quien siempre tuvo un momento para mí.

A la Dra. Gabriela González-Mariscal y al Dr. Carlos Beyer por su apoyo.

A los miembros del jurado de mi examen de grado por el tiempo y empeño que le dedicaron a la revisión de la tesis y por sus acertadas sugerencias.

Dra. Aline S. De Aluja

Dr. Carlos Larralde Rangel

Dr. Carlos Gutierrez Aguilar

Dr. Mario Pérez Martínez

Dra. Kaethe Willms Manning

Dra. María Dolores Correa Beltrán

A la Dra. Gabriela Morali de la Brena, quien fue parte del comité en mi examen de candidatura y que dedicó tiempo y esfuerzo en la revisión de la tesis.

A los auxiliares del laboratorio Carolina Miranda Brito y Ricardo Valdéz Pérez por sus enseñanzas y consejos.

A los técnicos del laboratorio Jesús Velázquez Lozano y Armando Vargas Sánchez por su disposición al trabajo y por su amistad.

A Luz María Buendía Rangel, por su apoyo secretarial, siempre eficiente y por su amistad.

A Moisés Miranda por su valioso apoyo en el área de computación.

A todos los compañeros que compartieron conmigo su estancia y amistad en el laboratorio, y que siempre me hicieron sentir como en casa, especialmente a Ada Luz Cartas, quien fue un invaluable apoyo en mis primeros días.

# ÍNDICE

Resumen .....	1
Summary .....	3
1. Introducción .....	5
1.1. Relaciones endócrinas hospedero-parásito .....	5
1.1.1. Generales .....	5
1.1.2. Cestodos .....	7
1.1.2.1 Taenias .....	7
1.1.3. Otros parásitos .....	8
1.1.3.1. <i>Ostertagia circumcincta</i> .....	8
1.1.3.2. <i>Schistosoma mansoni</i> .....	9
1.2. Cisticercosis .....	10
1.2.1. <i>Taenia solium</i> .....	10
1.2.1.1. El problema de salud pública .....	10
1.2.1.2. Clasificación taxonómica .....	11
1.2.1.3. Ciclo de vida .....	11
1.2.1.4. Biología del cisticerco de <i>Taenia solium</i> .....	13
1.2.1.5. Nutrición del cisticerco de <i>Taenia solium</i> .....	13
1.2.2. <i>Taenia crassiceps</i> .....	14
1.2.2.1. Clasificación taxonómica .....	14
1.2.2.2. Ciclo de vida .....	14
1.2.2.3. El modelo murino de la cisticercosis .....	15
1.3. Biosíntesis de hormonas esteroides .....	17
1.4. Los receptores a esteroides .....	20
1.4.1. El receptor a andrógenos .....	20
1.4.2. El receptor a estrógenos .....	22
1.5. Mecanismo de acción de los esteroides sexuales .....	23
1.6. Fármacos antihormonales .....	26
1.6.1. Antiandrógenos .....	26
1.6.1.1. Mecanismo de acción .....	27



1.6.2. Antiestrógenos .....	28
1.6.2.1. Mecanismo de acción .....	28
1.7. La búsqueda de receptores a esteroides en invertebrados .....	30
1.7.1. Parásitos .....	30
2. Hipótesis .....	33
3. Objetivos .....	34
3.1. General .....	34
3.2. Particulares .....	34
4. Material y métodos .....	35
4.1. Parásitos .....	35
4.1.1. Obtención de los parásitos .....	35
4.2. Metabolismo y producción de esteroides .....	36
4.3. Extracción de esteroides del medio de cultivo .....	37
4.4. Cromatografía en capa delgada .....	38
4.4.1. Técnica de cromatografía .....	38
4.5. Western blot .....	40
4.5.1. Lisis de los tejidos .....	40
4.5.2. Análisis de Western Blot .....	41
4.6. Cultivo .....	42
4.6.1. Técnica de cultivo .....	42
4.7. Administración <i>in vivo</i> de flutamida .....	44
4.7.1. Procedimiento experimental .....	44
4.8. Análisis estadístico .....	45
5. Resultados .....	46
5.1. <i>Taenia crassiceps</i> .....	46
5.1.1. Metabolismo de esteroides .....	46
5.2. <i>Taenia solium</i> .....	50
5.2.1. Metabolismo de esteroides .....	50
5.2.2. Determinación de la presencia de receptores a andrógenos y estrógenos	54
5.2.3. Efecto de la administración de antiandrógenos y antiestrógenos <i>in vitro</i> ..	56
5.2.3.1. Antiandrógenos .....	56

5.2.3.2. Antiestrógenos .....	58
5.3. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de flutamida .....	59
6. Discusión .....	62
7. Conclusiones .....	69
7.1. Cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> .....	69
7.2. Cisticerco de <i>Taenia solium</i> .....	69
7.3. Administración <i>in vivo</i> de flutamida .....	70
8. Literatura citada .....	71
9. Apéndice I .....	96
9.1. Fundamentos de la cromatografía .....	96
10. Apéndice II.....	98

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue estudiar la síntesis de hormonas esteroides y la presencia de sus receptores en cisticercos de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) y de *Taenia solium* (*T. solium*), así como el efecto de los antiandrógenos y los antiestrógenos sobre la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* de los cisticercos antes mencionados.

Para cumplir con este objetivo se utilizó la siguiente metodología: los cisticercos de *T. solium* fueron disecados de la carne de cerdos infectados, lavados e incubados en medio de cultivo con antibióticos, en presencia de  $^3\text{H}$ -progesterona,  $^3\text{H}$ -DHEA,  $^3\text{H}$ -estradiol o  $^3\text{H}$ -estrone. El medio de cultivo fue extraído, los esteroides separados mediante cromatografía en capa delgada (TLC) en dos diferentes sistemas de solventes y la radioactividad fue contada por centelleometría. Los cisticercos de *T. crassiceps* se obtuvieron de la cavidad abdominal de ratones hembras de la cepa Balb/c ANn, con 8 semanas de parasitadas con cisticercos de *T. crassiceps*. El proceso de lavado e incubación con esteroides se realizó como fue descrito para los cisticercos de *T. solium*. En otra serie de experimentos, los cisticercos fueron cultivados por 24 h in DMEM enriquecido con suero bovino fetal. El medio fue cambiado por otro que contenía DMEM más antibióticos y antagonistas de receptores a esteroides sexuales y posteriormente cultivados en presencia de  $^3\text{H}$ -timidina durante 24 h. Se descartó el medio, los parásitos se disociaron y se contó la radioactividad. La búsqueda de receptores se realizó mediante la técnica de Western Blot. Finalmente, para evaluar el efecto de la administración de antiandrógenos sobre la proliferación celular de los cisticercos de *T. crassiceps in vivo*, se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c ANn con 10 semanas de parasitadas y se les administró 25 mg/kg/día de flutamida o vehículo vía subcutánea, durante 10 días. Los animales se pesaron diariamente. Después de este periodo, los animales se sacrificaron bajo anestesia con cloroformo, los cisticercos se extrajeron de la cavidad abdominal, se colocaron en una probeta y posteriormente se contaron.

Los resultados muestran que los cisticercos de *T. solium* así como los de *T. crassiceps* fueron capaces de utilizar precursores esteroidales marcados radioactivamente para sintetizar diferentes metabolitos. Encontramos  $^3\text{H}$ - $17\alpha$ -hidroxiprogesterona,  $^3\text{H}$ -androstendiona y  $^3\text{H}$ -testosterona cuando la  $^3\text{H}$ -progesterona fue el precursor;  $^3\text{H}$ -androstendiol y  $^3\text{H}$ -testosterona cuando  $^3\text{H}$ -DHEA fue el precursor;  $^3\text{H}$ -estradiol cuando se incubó en presencia de  $^3\text{H}$ -estrona; y  $^3\text{H}$ -estrona cuando  $^3\text{H}$ -estradiol fue usado como precursor.

Se determinó la presencia de la proteína de los receptores a andrógenos y a estrógenos en ambas especies de cisticercos estudiadas. Por otra parte, encontramos que tanto la flutamida como el tamoxifen disminuyen la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en una forma dosis-dependiente.

Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en la carga parasitaria en los ratones tratados con flutamida, en comparación con aquellos a los que sólo se les inyectó vehículo. El tratamiento no afectó el peso corporal de los ratones.

Se concluye por tanto que la ruta  $\Delta 4$  y parte de la ruta  $\Delta 5$  de la vía esteroidogénica están presentes en los cisticercos de *T. solium* y de *T. crassiceps*. Los cisticercos expresan los receptores a andrógenos y a estrógenos y el bloqueo de los mismos con fármacos específicos afecta la proliferación de los parásitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que demuestra la importancia de los andrógenos y los estrógenos para el desarrollo de los cisticercos de *T. solium* y de *T. crassiceps*.

## SUMMARY

The objective of the present thesis was to study the synthesis of steroid hormones and the presence of specific receptors in *Taenia solium* (*T. Solium*) and *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) cysticerci, and also, to investigate the effect of antiandrogens and antiestrogens *in vitro* and *in vivo*, on the cell proliferation of the forementioned cysticerci.

For these purposes *T. solium* cysticerci were dissected from infected pigs, washed and incubated in culture media plus antibiotics in the presence of  $^3\text{H}$ -progesterone,  $^3\text{H}$ -estradiol or  $^3\text{H}$ -estrone. The culture media were extracted, the steroids separated by thin layer chromatography (TLC) in two different solvent systems and radioactivity was counted. *T. crassiceps* cysticerci were obtained from the abdominal cavity of balb/c AnN mice and processed as described for *T. solium* cysticerci. In another series of experiments, *T. solium* cysticerci were cultured for 24 h in DMEM plus fetal bovine serum. Media were changed by another containing DMEM plus antibiotics and sex steroid receptor antagonists and further cultured in the presence of  $^3\text{H}$ -thymidine for 24 h. Media were discarded, parasites dissociated and radioactivity counted. To determine the expression of steroid receptors Western Blot analysis was performed using specific antibodies. Finally, to evaluate the effect of the *in vivo* antiandrogen administration on *T. crassiceps* cysticerci's cell proliferation, we used Balb/c ANn female mice with 10 weeks of infection. Flutamide (25 mg/kg/day) or vehicle, were administered subcutaneously for 10 days. The animals were daily weighed. After this period, females were killed under chloroform anesthesia and cysticerci obtained from the abdominal cavity, and counted.

The results show that *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci used radiolabeled steroid precursors to synthesize different metabolites. We found  $^3\text{H}$ - $17\alpha$ -hydroxprogesterone,  $^3\text{H}$ -androstenedione and  $^3\text{H}$ -testosterone when  $^3\text{H}$ -progesterone was the precursor;  $^3\text{H}$ -androstenediol and  $^3\text{H}$ -testosterone when  $^3\text{H}$ -DHEA was the precursor;  $^3\text{H}$ -estradiol when  $^3\text{H}$ -estrone was used; and  $^3\text{H}$ -estrone when  $^3\text{H}$ -estradiol was used as a precursor.

Western blot analysis demonstrated the presence of the protein for androgen and estrogen receptors in both species of cysticerci. In addition, we found that flutamide and tamoxifen diminished the  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation to *T. solium* cysticerci in a dose-dependent manner.

The results also show a significant decrease in the parasitic load of flutamide-treated mice, compared to the ones injected with only vehicle. The treatment did not affect the body weight.

We conclude that  $\Delta 4$  and part of the  $\Delta 5$  steroidogenic pathways are present in *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci. In addition, we found that both species of cysticerci have androgen and estrogen receptors. The blockage of these receptors altered the cysticerci proliferation, *in vitro* and *in vivo*. Finally, present results showed that androgens and estrogens are important for cysticerci development.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Relaciones endócrinas hospedero-parásito

### 1.1.1. Generales

Las interacciones hormonales recíprocas que se establecen entre el hospedero y el parásito están recibiendo mayor atención en fechas recientes, debido a que se ha visto que dichas interacciones pueden influenciar el éxito reproductivo del hospedero o del parásito (Beckage, 1991, Escobedo et al., 2005, Morales-Montor y Larralde, 2005). En numerosas enfermedades e infecciones parasitarias de los vertebrados es bien conocida la existencia de un dimorfismo sexual. En general los machos son más susceptibles que las hembras a las infecciones bacterianas y por protozoarios (Ansar et al., 1985). Además, las hormonas sexuales modulan la respuesta inmune y pudieran estar involucradas en la susceptibilidad a la infección asociada al género (Grossman, 1984). Por ejemplo, los machos de diversas especies de mamíferos, son más resistentes que las hembras a las infecciones por céstodos (Bundy, 1988).

Los esteroides sexuales producidos en etapas tempranas del desarrollo son críticos para la diferenciación de las gónadas, sobretodo durante el desarrollo perinatal en aves y mamíferos (George y Wilson, 1994). Las hormonas esteroides sexuales, tanto la testosterona como los estrógenos, están presentes en todos los vertebrados estudiados. Sin embargo, la existencia de hormonas esteroides en los invertebrados es menos conocida y el significado fisiológico de su presencia es poco claro. Hasta la fecha, existe una creciente lista de estudios que muestran la capacidad de producción de esteroides de algunos invertebrados: *Mytilus edulis* L, un molusco marino, produce progesterona, androstendiona, testosterona, 17 $\beta$ -estradiol y estrona (Reis-Henriques et al., 1990); el camarón *Parapanaeus fissurus* produce un compuesto similar a los estrógenos (Jeng et al., 1978). Por otra parte, se ha reportado que tanto la progesterona como los estrógenos son producidos

por los machos y hembras de la estrella de mar, *Asterias rubens* (Voogt y Dieleman, 1984); inclusive en el coral, se ha identificado actividad de la enzima aromatasa, así como la presencia de estradiol y testosterona (Twan et al., 2003).

Por otra parte, existen numerosos ejemplos de interacciones endócrinas recíprocas entre el hospedero y el parásito; así, el cangrejo macho parasitado con rizocéfalos, presenta cambios en sus caracteres sexuales secundarios (Phillips y Cannon, 1973); la infección con el tremátodo *Trichobilharzia ocellata*, interfiere con el control endócrino de la reproducción femenina del caracol *Lymnae stagnalis* (Jong-Brink et al., 1988); la reproducción de *Dirofilaria immitis* es modulada por ecdiesteroides (Barker et al., 1991); un crustáceo, el anfípodo *Gammarus duebeni* es hospedero del parásito *Nosema granulosis*, que feminiza a los machos y los convierte en hembras funcionales, ya que evita la diferenciación de la glándula androgénica, la producción hormonal de esta glándula y la consecuente diferenciación hacia macho (Rodgers-Gray et al., 2004); El pájaro *Parus major*, conocido comúnmente como carbonero, cuando está expuesto a la pulga de las gallinas, *Ceratophyllus gallinae*, reduce los niveles de testosterona y de su precursor la androstendiona, en la yema del huevo (Tschirren et al., 2004).

Un caso notable es el del dromedario macho, *Camelus dromedarius*, que al ser parasitado por *Tripanosoma evansi*, sufre cambios en las concentraciones plasmáticas de esteroides sexuales y en las características del semen. Los machos parasitados muestran un incremento en las concentraciones de estradiol y una disminución en testosterona, mientras que en el semen se observa una disminución en los siguientes parámetros: el conteo espermático, el porcentaje de motilidad y de espermatozoides vivos, así como un incremento en el porcentaje de anomalías morfológicas (Al Qarawi et al., 2004, Al Qarawi, 2005).

Un caso similar se observa en ratones machos de la cepa BALB/c, infectados con *Plasmodium chabaudi*, donde se observa una disminución de los niveles de testosterona, después de 4-5 semanas de infección. Asimismo, disminuye la tasa de fertilización y la duración del contacto social durante el cortejo (Barthelemy et al., 2004).



También se ha observado maduración sexual, que es inducida en anguilas, *Anguilla anguilla*, cuando son parasitadas con el nemátodo *Anguillicola crassus* (Muller et al., 2003).

Finalmente, se ha reportado que los artrópodos producen ecdisonas, las cuales son hormonas esteroides involucradas en la muda de los insectos (ecdisis) y pueden funcionar de manera semejante a los andrógenos o a los estrógenos en los insectos (De Loof y Huybrechts, 1998).

## **1.1.2. Céstodos**

### **1.1.2.1. *Taenias***

Las *Taenias* son endoparásitos (Whitfield, 1982) que difieren mucho de otros platelmintos. No poseen tracto digestivo, sino que absorben el alimento por las microvellosidades de la epidermis (Whitfield, 1982). Tienen un metabolismo principalmente anaerobio ya que el intestino de los vertebrados que parasita es bajo en O<sub>2</sub> y alto en CO<sub>2</sub>, sin embargo, también son aerobios facultativos (Saz, 1981). Tienen un cuerpo muy alargado (2-5 m), frecuentemente cientos de veces más largo que su anchura (10-12 mm) (Whitfield, 1982).

Generalmente los adultos residen en el tracto digestivo (duodeno) del hospedero definitivo y las fases larvarias infestan los tejidos del hospedero intermediario (Whitfield, 1982).

En cuanto a las relaciones endócrinas hospedero-parásito, se ha observado que la administración *in vitro*, de productos de secreción de metacéstodos de *Taenia taeniaeformis*, inhibe la producción de testosterona en las células de Leydig de testículos de rata (Rikihisa et al., 1985), además, la infección con este parásito, altera la reproducción de la rata hembra, ya que disminuye el promedio de apareamientos que terminan en gestación, así como el número de crías nacidas (Lin et al., 1990)

La producción de ecdiesterona ha sido reportada en varias especies de helmintos, entre ellos, los nemátodos: *Dirofilaria immitis*, *Brugia pahangi*, *Ascaris suum*, y

*Anisakis simplex*; los céstodos: *Moniezia expansa*, *Echinococcus granulosus* e *Hymenolepis diminuta*; y los tremátodos: *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica* (Mendis et al., 1983, Mercer et al., 1990, Cleator et al., 1987, Fleming, 1985, Evershed et al., 1987, Mendis et al., 1984, Mercer et al., 1987b, Mercer et al., 1987a).

.

### **1.1.3. Otros parásitos**

#### **1.1.3.1. *Ostertagia circumcincta***

Una especie parasitaria muy estudiada en cuanto a las interrelaciones que tiene con su hospedero es el nemátodo *Ostertagia circumcincta*, este parásito afecta a la oveja en varias interacciones complejas, que van desde estructurales, bioquímicas, nutricionales e inmunológicas, hasta hormonales. Después de la infección con *Ostertagia spp*, se pierde la función secretoria especializada y la integridad de las células epiteliales gástricas. El pH del contenido abomasal se eleva y la concentración de pepsinógeno en plasma se incrementa. Hay una concurrente elevación en la concentración de gastrina en sangre. Los efectos pueden ser en respuesta a las interacciones físicas del parásito con las células epiteliales, ser mediados a través de los productos de excreción/secreción del parásito o bien, por mecanismos neurales. También existen interacciones entre las respuestas, dado que el elevado pH abomasal estimula la secreción de gastrina. Los cambios hormonales tienen también un papel importante en el incremento de la susceptibilidad del hospedero al parásito durante el periodo periparto. La prolactina ha sido considerada la responsable hormonal de este incremento, aunque ahora hay evidencia que sugiere que las elevadas concentraciones de esta hormona no son las únicas responsables (Taylor et al., 1989, Jeffcoate et al., 1990, McKellar, 1993, Stear et al., 1999)

### 1.1.3.2. *Schistosoma mansoni*

Experimentos hechos con los diferentes estadios de desarrollo de *Schistosoma mansoni*, usando la técnica de cromatografía en capa delgada, llevaron a la conclusión de que únicamente los homogenados de la fase adulta ( y no así los huevos o los miracidios), son capaces de producir una variedad de hormonas esteroides a partir de diferentes precursores. Así, cuando se incubó con estrona, se encontró estradiol; con pregnenolona se halló progesterona; con testosterona, se identificó  $5\alpha$ -dihidrotestosterona; con cortisona se encontró cortisol, y finalmente, con colesterol, se encontró pregnenolona (Briggs, 1972).

De igual forma, en otra serie de estudios metabólicos se llegó a la conclusión de que este parásito no tiene la capacidad de sintetizar de novo ácidos grasos ni esteroides (Meyer et al., 1970), pero sí puede modificar las cadenas de ácidos grasos (Brouwers et al., 1998). Además, es capaz de absorber y utilizar del medio, ácido araquidónico, ácido linoleico, fosfatidilcolina, tripalmitilglicerol y colesterol, y mediante la técnica de cromatografía en capa delgada, se supo que estos lípidos son mayormente incorporados a moléculas de triacilglicerol, y en menor proporción a diacilglicerol, fosfolípidos y ácidos grasos, y que estos compuestos se encuentran formando parte integral de las varias estructuras membranosas del parásito (Rumjanek y Simpson, 1980).

Esta serie de estudios claramente muestran el grado de complejidad que tiene un parásito, desde el punto de vista del metabolismo de lípidos y del de esteroides, y nos dan una idea de lo que podría esperarse en el caso de los cisticercos.

## 1.2. CISTICERCOSIS

### 1.2.1. *Taenia solium*

#### 1.2.1.1. El problema de salud pública

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria, ampliamente distribuida a nivel mundial, causada por la ingestión de huevos de *Taenia solium* (*T. solium*), esta enfermedad ocasiona severos daños en el humano cuando el parásito se localiza en el sistema nervioso central (neurocisticercosis). En México es todavía un problema de salud pública, así como en el resto de América latina, Asia y África (Garcia y Del Brutto, 2000, Huerta et al., 2001, Sciutto et al., 2000).

Prevalece tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocia a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos en forma rústica, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza (Sarti, 1997), así como una deficiente inspección sanitaria de carnes.

Al igual que otras enfermedades parasitarias, la cisticercosis es una enfermedad crónica en donde el parásito permanece por largos periodos sin que parezca existir una respuesta efectiva del hospedero para eliminarlo, aunque probablemente sí, para limitar su desarrollo en el organismo. El parásito tampoco parece inducir un daño importante en el hospedero, y cuando esto sucede se debe más a su localización que a su capacidad patogénica. Su alojamiento en ciertas zonas del cerebro puede producir desde cuadros epilépticos, debido a calcificaciones, hasta la muerte por hipertensión intracraneal, mientras que en otras zonas del cerebro o en el músculo, su presencia puede pasar inadvertida (Soulsby, 1987, Garcia y Del Brutto, 2000, Raether y Hanel, 2003, Hawk et al., 2005).

### 1.2.1.2. Clasificación taxonómica

Reino Animalia

Rama helminte

Phylum platelminte

Clase cestoda

Subclase eucestoda

Orden taeniidea

Familia taeniidae

Género Taenia

Especie *T. solium*

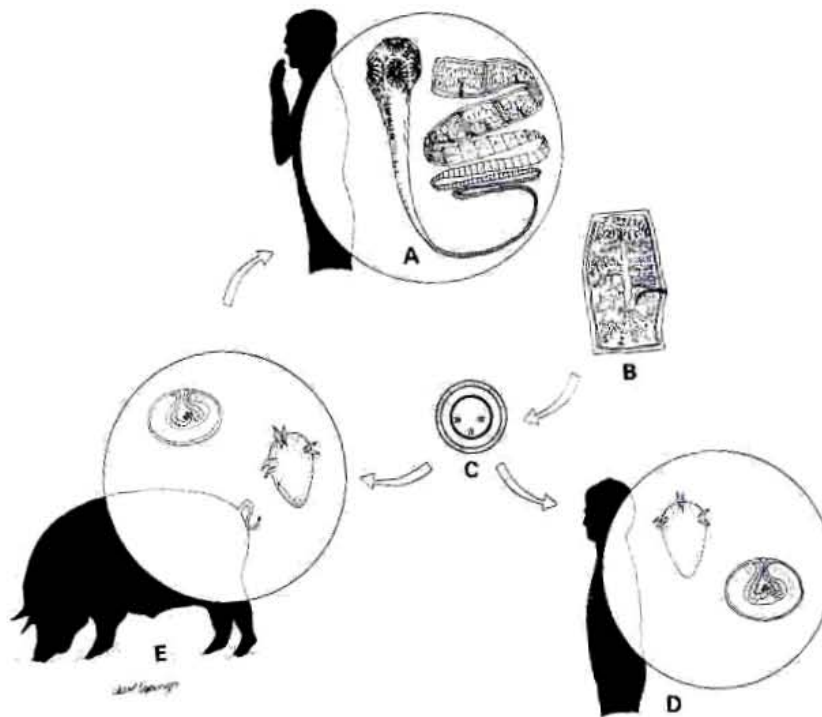
(Noble y Noble, 1976, Schmidt y Roberts.L.S, 1977, Whitfield, 1982, Mehlhorn y Piekarsi, 1993).

### 1.2.1.3. Ciclo de vida

El cisticerco es el metacéstodo de un gusano que en su etapa adulta es hermafrodita. El cisticerco de *Taenia solium* es un organismo complejo compuesto por un escolex, (a partir del cual se desarrolla la tenia adulta) y una cápsula de tegumento formada por un tejido sincicial.

*Taenia solium* es un platelminto que pertenece a la clase cestoda. Los céstodos son gusanos que tienen un cuerpo largo y plano, formado de numerosos segmentos, llamados proglótidos. Cada proglótido es una unidad reproductiva que tiene testículos y ovarios, y tiene la capacidad de autofecundarse. Después de fertilizado, el útero contiene miles de embriones infectivos, cada uno de los cuales puede dar origen a un cisticerco en el hospedero intermediario. Los proglótidos grávidos se separan del gusano (que se encuentra en el intestino del hospedero), y es expulsado con las heces fecales. El hospedero intermediario, normalmente el cerdo, se infecta ya sea por la ingestión de proglótidos o por la de huevos del parásito que vienen en las heces de humanos que defecan al aire libre. Los

huevos son inducidos a eclosionar por acción de los jugos gástricos y fluidos intestinales. Las oncosferas que eclosionaron atraviesan entonces la mucosa intestinal e invaden al hospedero vía la corriente sanguínea (White et al., 1997). En un periodo aproximado de 2 meses se transforman en metacéstodos. Las oncosferas se alojan preferentemente en los músculos del cerdo, donde maduran y ocasionan daño en el tejido circundante (de Aluja y Vargas, 1988). El ciclo de vida se completa cuando el humano consume carne de cerdo mal cocida que contiene al cisticerco. El ser humano también puede ser el huésped intermediario de *Taenia solium* y desarrollar la cisticercosis (Noble y Noble, 1976, Schmidt y Roberts.L.S, 1977, White et al., 1997).



**Fig. 1.** Ciclo de vida de *Taenia solium*. A) *Taenia solium* adulta en intestino del hospedero. B) El proglótido gávido es expulsado en heces fecales. C) El huevo es ingerido por el cerdo ó por el humano. D) Cisticercosis humana. E) Cisticercosis porcina. El ciclo se cierra cuando el humano consume carne de cerdo parasitada, mal cocida (tomada de Schmidt G. D y Roberts, L.S).

#### 1.2.1.4. Biología del cisticerco de *Taenia solium*

El cisticerco es una vesícula translúcida, ovoide o circular de 5 a 10 mm de diámetro y consta esencialmente de un único escólex que se encuentra inmerso en la vesícula llena de líquido (Mehlhorn y Piekarsi, 1993). La pared de la vesícula es una estructura membranosa compuesta de tres capas: tegumentaria o externa, celular o media y reticular o interna. El escólex presenta una estructura similar a la de la *Taenia* adulta, con una cabeza o rostelo con 4 ventosas y doble corona con 22 a 32 ganchos (Whitfield, 1982). El desarrollo del escólex tiene lugar dentro del cuerpo vesicular hueco de la larva (Marshall y Williams, 1985).

Algunas de las proteínas de los cisticercos tienen propiedades antigénicas, y por lo tanto, estimulan la producción de anticuerpos específicos (Grogl et al., 1985). Sin embargo, estos anticuerpos no tienen mayor efecto en la protección contra la enfermedad, ya que los cisticercos desarrollan una serie de mecanismos evasores que le permiten sobrevivir al ataque inmunológico del hospedero. Entre estos mecanismos destacan el mimetismo molecular y la depresión de la inmunidad celular, la cual puede condicionar una serie de complicaciones en enfermos con cisticercosis (Soulsby, 1987, Maizels y Yazdanbakhsh, 2003, Maizels et al., 2004). Por norma general, los cisticercos no se reproducen. Sin embargo, en el caso de *Taenia crassiceps*, puede tener lugar un proceso de reproducción asexual (gemación) a nivel del extremo de la vesícula, más alejado del escólex (Mehlhorn y Piekarsi, 1993).

#### 1.2.1.5. Nutrición del cisticerco de *Taenia solium*

Aunque el colesterol es el esteroles predominante en su tejido, muchos parásitos, incluyendo *Taenia solium*, no son capaces de sintetizarlo o de sintetizar ácidos grasos de cadena larga *de novo*, y deben, por tanto, obtener estos compuestos del hospedero. Las lipoproteínas son una fuente rica y abundante de colesterol; estas proteínas están disponibles sobretodo para parásitos que habitan el sistema vascular y para aquellos con acceso a sitios extravasculares del hospedero. La

falta de sistema digestivo hace que el parásito necesite que los nutrientes pasen a través de su superficie membranal y, de igual forma, que los desechos sean eliminados a través de ella. La membrana en la etapa de metacéstodo es más permeable a compuestos de alto peso molecular que en la etapa adulta, de tal forma que en el líquido del cisticerco están presentes moléculas del hospedero. No es inconcebible pensar que en los parásitos haya evolucionado una gran variedad de receptores para lipoproteínas por evolución convergente (Lamsam y McManus, 1990, Rogers, 1991, Kurzchalia y Ward, 2003).

### **1.2.2. *Taenia crassiceps***

#### 1.2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino Animalia

Rama helminte

Phylum platelminte

Clase cestoda

Subclase eucestoda

Orden taeniidea

Familia taeniidae

Género *Taenia*

Especie *T. crassiceps*

(Noble y Noble, 1976, Schmidt y Roberts.L.S, 1977, Whitfield, 1982, Mehlhorn y Piekarsi, 1993).

#### 1.2.2.2. Ciclo de vida

*Taenia crassiceps* es también un platelminto, cuya forma adulta es usualmente encontrada en el intestino de zorros rojos, norteamericanos o Europeos (Delvalle, 1989, Dorais y Esch, 1969, Freeman, 1962). La etapa larvaria o el cisticerco se desarrolla en un roedor llamado ratón de las praderas, quien adquiere la infección



por ingestión de los huevos provenientes de las heces de los zorros. En los roedores infestados de manera natural, los huevos se desarrollan a cisticercos que pueden multiplicarse asexualmente (Toledo et al., 1997) y se alojan en diversos tejidos y cavidades del cuerpo del roedor, el cual es por lo tanto, el hospedero intermediario natural de este parásito (Toenjes et al., 1999).

### 1.2.2.3. El modelo murino de la cisticercosis

Ante la dificultad de experimentar con la cisticercosis en el humano, y para conocer y definir diversos factores biológicos relacionados, se adoptó y ha resultado muy útil, un modelo de cisticercosis experimental murina, causada por *Taenia crassiceps*, donde se han estudiado las interacciones inmunoendócrinas que ocurren entre el hospedero y el parásito (Sciutto et al., 1991, Terrazas et al., 1994, Larralde et al., 1995, Morales et al., 1996, Morales-Montor et al., 2002b, Morales-Montor et al., 2002a). Varias cepas de cisticercos de *Taenia crassiceps* han sido aisladas y mantenidas en condiciones de laboratorio. De entre las cepas aisladas, la ORF se ha convertido en la más ampliamente utilizada, debido a su capacidad de multiplicarse rápidamente por gemación en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c, lo que lo convirtió en un excelente modelo para estudiar la cisticercosis (Freeman, 1962).

Este modelo ofrece diversas ventajas, que incluyen la posibilidad de realizar un número grande de experimentos, la facilidad operativa y las semejanzas en el ciclo biológico, estructura, antigenicidad y capacidad de daño tisular con su homólogo humano.

Experimentalmente puede inducirse la infección con la inyección intraperitoneal de los cisticercos. La reproducción del parásito por gemación produce una gran población de parásitos homogéneos (Huerta et al., 1992, Spolski et al., 2000). Esta característica del cisticerco, que no comparte el de *Taenia solium*, permite además cultivarlo, lo que facilita los estudios *in vitro* (Huerta et al., 1992).

La cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* ha sido de gran utilidad para la obtención de antígenos utilizados en inmunodiagnósticos de

padecimientos por ténidos. Asimismo se ha usado para la producción de vacunas contra la cisticercosis porcina causada por *Taenia solium* (Huerta et al., 2001).

Asimismo, se ha observado que en ratones parasitados con *Taenia crassiceps*, existe una mayor susceptibilidad a la infección en la hembra que en el macho. Sin embargo, en infecciones crónicas, la carga parasitaria en el macho también se incrementa hasta alcanzar los niveles observados en las hembras. Este inicial dimorfismo sexual y el subsecuente aumento en la carga parasitaria del macho, hizo pensar que los niveles hormonales existentes en machos y hembras eran los responsables de la diferencia a la infección inicial, y que algo le pasaba posteriormente al macho que lo hacía alcanzar cargas parasitarias tan grandes como las de las hembras. Al investigar sobre este punto se descubrió que los machos parasitados elevan 200 veces sus niveles séricos de estradiol, al mismo tiempo que sufren una disminución del 90% en sus niveles de testosterona, es decir, existe un proceso de feminización provocado por la presencia de cisticercos de *Taenia crassiceps* (Larralde et al., 1995), estos cambios hormonales sufridos por el macho parasitado, provocan a su vez, una inhibición de su conducta sexual (montas, intromisiones y eyaculaciones) (Morales et al., 1996).

Se pensó entonces que las modificaciones en los niveles hormonales del hospedero podían ser debidas a que el cisticerco, mediante el aparato inmune, provocara un aumento en la síntesis de enzimas de la vía esteroidogénica, o bien, que el cisticerco mismo fuera capaz de producir hormonas esteroides. Con la finalidad de determinar si el cisticerco es capaz de producir hormonas esteroides sexuales, se inició una serie de estudios en nuestro laboratorio, donde se ha encontrado que tanto los cisticercos de *Taenia crassiceps*, como los del parásito al que sirve de modelo, *Taenia solium*, son capaces de producir andrógenos a partir de precursores hormonales, *in vitro*, lo que supone la existencia y actividad de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) (Gomez et al., 2000, Romano et al., 2003, Jiménez et al., 2004, Valdéz et al., 2005)

Estos resultados llevaron a pensar que el parásito podría usar precursores esteroides del hospedero para producir los esteroides sexuales, y que esto podría ser de manera accidental ó bien, como una necesidad para su propio desarrollo. Si

este último fuera el caso, es decir, que los cisticercos necesitaran producir esteroides sexuales para su desarrollo, necesariamente deberían contar con receptores específicos a esteroides para que estos pudieran ejercer su efecto.

Todos estos antecedentes en conjunto, nos llevaron a plantearnos la idea de la existencia de receptores, y su búsqueda, en los cisticercos estudiados en el presente proyecto.

### **1.3. Biosíntesis de hormonas esteroides**

El ovario de las hembras de los mamíferos es capaz de sintetizar una gran cantidad de esteroides, los más importantes secretados por el folículo son: el estradiol y la estrona, mientras que la progesterona es el principal producto biológicamente activo del cuerpo lúteo. Otros esteroides secretados por el ovario son: dehidroepiandrosterona, testosterona, androstenediona, pregnenolona y la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (Brodie, 1983).

Los esteroides poseen una estructura común derivada del ciclopentano perhidro fenantreno. El hidrocarburo básico es el gonano, que contiene 17 átomos de carbono en sus cuatro anillos (A, B, C y D) (Cowan, 1997). Modificaciones en esta estructura, como la adición de uno o dos carbonos y una cadena lateral de dos átomos de carbono en la posición 17, generan hormonas con características bien definidas, que se clasifican en: 1) pregnanos, con 21 átomos de carbono (e. g., progesterona y cortisona); 2) androstanos, con 19 carbonos (e. g., testosterona) y 3) estranos, de 18 carbonos (e. g., estradiol). La biosíntesis de esteroides ocurre de dos formas: directamente del acetato, vía mevalonato, escualeno y colesterol ó del colesterol circulante en sangre procedente de la dieta. Dicha biosíntesis puede seguir posteriormente dos vías: la de la pregnenolona (vía  $\Delta 5$ ), que es el pregnano del que derivan todos los demás esteroides; o la de la progesterona (vía  $\Delta 4$ ), que ya muestra la estructura delta-4-3-ceto en su anillo A. Ambas progestinas sufren una hidroxilación en el carbono 17, antes de ocurrir una ruptura en ese mismo sitio y dar lugar a los andrógenos de 19 carbonos. La dehidroepiandrosterona (DHEA) se forma a partir de la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, y puede ser reducida para formar

androstendiol y posteriormente isomerizada para formar testosterona. La  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, por su parte es convertida directamente en androstendiona y posteriormente en testosterona. Esta hormona puede ser posteriormente reducida a dihidrotestosterona ( $5\alpha$  ó  $5\beta$ ). La androstendiona puede ser directamente aromatizada a estrona o primero convertirse en testosterona y después aromatizarse a estradiol. Es decir, los estrógenos son derivados de la testosterona y la androstendiona, por la aromatización del anillo A de estos andrógenos. La aromatización incluye una serie de reacciones complejas que consiste, entre otros pasos, en una hidroxilación del carbono 19, seguida de una oxidación y la remoción de este carbono a través de una molécula de formaldehído. El estradiol, que es el estrógeno más potente, resulta directamente de la aromatización de la testosterona, mientras que la estrona se obtiene por la aromatización de la androstendiona (Naftolin et al., 1975, Brodie, 1983, Cowan, 1997, Beyer y González-Flores, 2000). Estrona y estradiol pueden interconvertirse por la actividad de la enzima  $17\beta$ -HSD (Brodie, 1983).

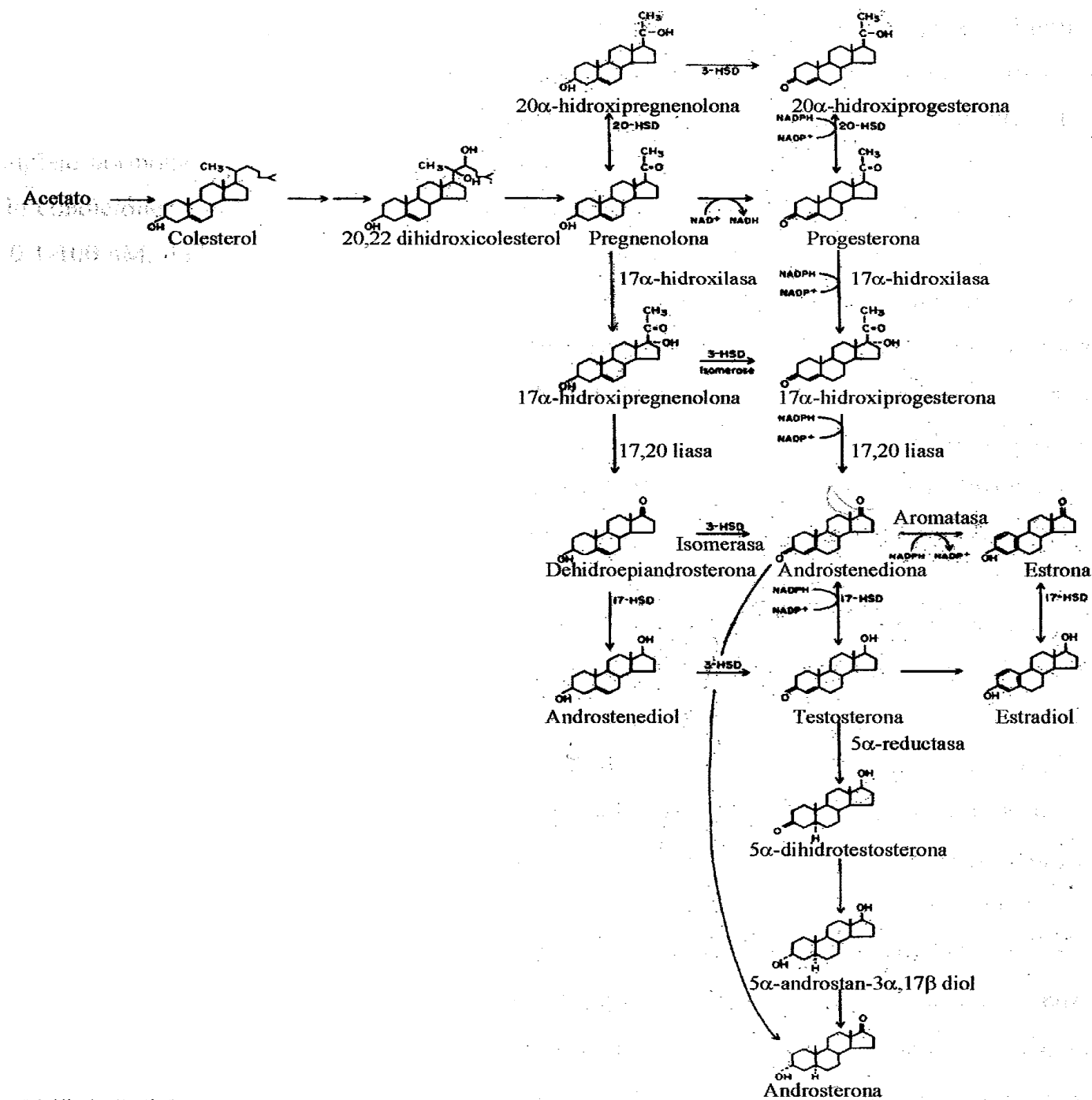


Fig. 2. Biosíntesis de esteroides (Tomada de Brodie, 1983).

## **1.4. Los receptores a esteroides**

### **1.4.1. El receptor a andrógenos**

El receptor a andrógenos es un regulador de la transcripción, de naturaleza proteica, que es activado por un ligando, y que media el desarrollo y funciones sexuales masculinas, inducidas por los andrógenos (Zhou et al., 1994). Los principales andrógenos, biológicamente activos son la testosterona y su metabolito, la dihidrotestosterona (Wilson y French, 1976).

El receptor a andrógenos es altamente susceptible a la ruptura proteolítica, y con frecuencia resulta en múltiples formas que retienen la unión al andrógeno con alta afinidad (Zhou et al., 1994), de tal forma que el receptor no unido al ligando tiene una vida media de 1 hora, mientras que en presencia del andrógeno su vida media se incrementa a 6 horas (Kemppainen et al., 1992, Zhou et al., 1995).

En su forma intacta el receptor a andrógenos es una proteína monomérica que tiene un peso molecular que oscila en las diferentes especies entre los 100 y los 120 kDa (Brinkmann et al., 1989, Zhou et al., 1994).

Una serie de moléculas, denominadas chaperonas o chaperoninas, asisten a las proteínas para que alcancen su maduración y conformación funcional. En años recientes, se ha vuelto aparente que las chaperonas funcionan como parte de un heterocomplejo multiproteico, que está involucrado no sólo en el plegamiento de proteínas, sino también en el tráfico intracelular y en el marcaje de proteínas para ser degradadas. En el caso de los receptores a esteroides, la actividad de las chaperonas, así como de las proteínas que forman el heterocomplejo, tiene efecto sobre la actividad transcripcional ligando dependiente del receptor (Heinlein y Chang, 2001). Los receptores no unidos a esteroides están ensamblados en heterocomplejos a la proteína de choque térmico 90 (hsp 90). Además de unirse al receptor en el sitio de las chaperonas, la hsp 90 se une a cofactores que también son parte de la maquinaria de ensamble, así como a las inmunofilinas, que conectan el ensamble hsp 90/receptor con las proteínas encargadas del tráfico intracelular. La hsp 90 y la hsp 70 interactúan con el receptor no unido a ligando,

para abrir una vía de acceso al esteroide, y una vez unido éste, facilitan su traslocación al núcleo. En el núcleo, la maquinaria de chaperonas interacciona con complejos regulatorios de la transcripción después de la disociación de la hormona, para liberar al receptor y terminar la activación de la transcripción. Al formar heterocomplejos con hsp 90, la maquinaria de chaperonas estabiliza al receptor para su degradación proteolítica por ubiquitina (Pratt et al., 2004).

En ausencia del ligando, el receptor se localiza predominantemente en el citoplasma, en particular, en la región perinuclear, mientras que en presencia del andrógeno, la localización es nuclear (Kempainen et al., 1992, Zhou et al., 1994).

El receptor a andrógenos está subdividido en varias regiones llamadas dominios, que están relacionadas con su mecanismo de acción, y que son: a) el dominio de unión a esteroides; b) el dominio de unión al ADN; c) el dominio de localización nuclear; d) el dominio de dimerización; e) 2 dominios de activación de la transcripción, también llamados transactivadores; y f) el dominio de unión a las proteínas hsp (Díaz-Chico y Navarro, 1996).

La actividad transcripcional del receptor a andrógenos es afectada por correguladores, que influyen en sus propiedades funcionales, incluyendo la selectividad por el ligando y la capacidad de unión al ADN. Los correguladores son proteínas que participan en la modificación del ADN, ya sea por vía directa al modificar las histonas o indirectamente al reclutar complejos modificadores de la cromatina, aunque también funcionan mediante el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Heinlein y Chang, 2002). Los correguladores pueden dividirse en dos: 1) los coactivadores, que mejoran la actividad transcripcional del receptor a andrógenos, y que pertenecen a la familia de coactivadores de los receptores a esteroides (SRC por sus siglas en Inglés, steroid receptor coactivator) (McKenna et al., 1999); y 2) los correpresores, que son proteínas que median la represión transcripcional, posiblemente a través de la formación de interacciones no productivas con factores de transcripción, o a través del reclutamiento de complejos que desacetilan a las histonas (Nagy et al., 1997, McKenna et al., 1999).

### 1.4.2. El receptor a estrógenos

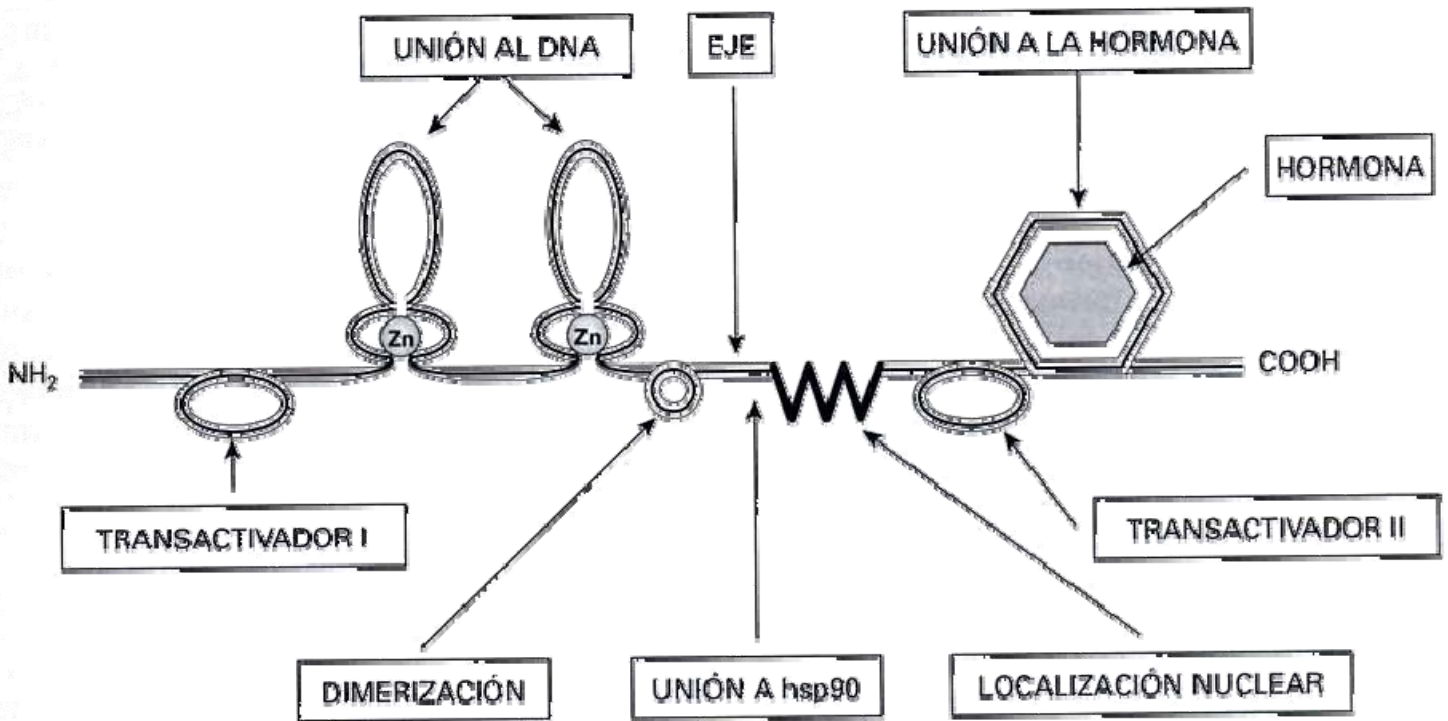
Los efectos conocidos de los estrógenos son mediados por un factor de transcripción activado por ligando, llamado receptor a estrógenos. El receptor tiene una estructura característica de los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares. Otros miembros de esta familia incluyen a los receptores a andrógenos, a progesterona, a corticosteroides, a hormona tiroidea y a vitaminas A y D (Enmark y Gustafsson, 1999).

El análisis del receptor a estrógenos muestra que está subdividido en varios dominios funcionales (Beato et al., 1995), que son: a) un dominio de unión a ADN altamente conservado, que contiene dos dedos de zinc, los cuales están involucrados en la unión específica al ADN y en la dimerización del receptor; b) otro dominio de unión al ligando, menos conservado; c) un dominio de dimerización; d) un dominio de localización nuclear y e) dominios de interacción con coactivadores y correpresores transcripcionales (Enmark y Gustafsson, 1999).

La región N-terminal es altamente variable en secuencia y extensión, y usualmente tiene función de transactivación, esta región activa genes blanco, mediante una interacción directa con componentes de la maquinaria transcripcional (Enmark y Gustafsson, 1999). La región de la bisagra proporciona flexibilidad a la molécula. Se ha visto también que influye en las propiedades de unión al ADN y puede servir de ancla para ciertas proteínas correpresoras (Enmark y Gustafsson, 1999). Finalmente, se ha visto que la región C-terminal contribuye a la capacidad de transactivación del receptor, y posiblemente otras funciones que aún no han sido descubiertas (Enmark y Gustafsson, 1999).

Hasta el momento se han descubierto dos tipos de receptores a estrógenos, el tipo  $\alpha$  y el tipo  $\beta$ . El tipo  $\alpha$  fue descubierto en 1958, clonado en 1986 y tiene un peso molecular de 66 kDa (Jensen, 1962, Green et al., 1986, Obourn et al., 1993), durante mucho tiempo se pensó que este tipo era el único existente, hasta que en 1996 se aisló el ADNc para un segundo tipo, al que se le denominó  $\beta$ , este receptor tiene un peso molecular de 53 kDa (Kuiper et al., 1996, Kuiper et al., 1997).





**Fig. 3.** Estructura general del receptor a hormonas esteroides (Tomada de Díaz-chico y Navarro, 1996).

### 1.5. Mecanismo de acción de los esteroides sexuales

En las células blanco, la acción de una hormona esteroide está mediada por el receptor, una proteína citosoluble que se une a la hormona con una alta afinidad y selectividad (Catelli y Mester, 1983, Clark et al., 1992). Los receptores para las hormonas esteroides están presentes en una gran variedad de células diferenciadas, y la concentración de receptores por célula es importante para la amplitud de la respuesta. Además, dicha respuesta también está determinada por la naturaleza de una estructura nuclear llamada aceptor, sitio aceptor ó elemento de respuesta a esteroides, el cual interactúa con el complejo hormona-receptor (Catelli y Mester, 1983, Clark et al., 1992, Robinson y Spelsberg, 1997).

Bajo condiciones fisiológicas, los esteroides circulantes se encuentran en la sangre en concentraciones de 0.1-100 nM, de los cuales el 90% está firmemente unido a proteínas, las que al parecer no tienen una verdadera función de transporte, sino de limitar la disponibilidad de la hormona a las células blanco (Catelli y Mester, 1983). La testosterona, en particular, se encuentra unida a una proteína denominada: Sex steroid-Binding  $\beta$ -globulin (SBG) (Mainwaring, 1979), también llamada: Gonadal Hormone-Binding Globulin (Clark et al., 1992). Se asume de manera general que la membrana celular, debido a sus propiedades lipofílicas, no ofrece resistencia a la difusión de la testosterona, ni a los esteroides en general, hacia el interior de la célula (Mainwaring, 1979, Catelli y Mester, 1983, Clark et al., 1992, Robinson y Spelsberg, 1997).

El receptor a andrógenos se encontró por primera vez en la próstata de la rata, en la forma de un complejo DHT-receptor que era retenido en el núcleo celular y donde inducía la síntesis de ARN mensajero (Liang et al., 1977). La  $5\alpha$ -dihidrotestosterona se une selectiva y fuertemente al receptor a andrógenos, formando un complejo proteína-esteroide. El receptor tiene muy baja afinidad por la testosterona no metabolizada: la proporción de unión al receptor de la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona: testosterona es al menos 10:1. Además, la afinidad del receptor por el andrógeno es al menos un orden de magnitud mayor que el observado entre la hormona y la proteína del sistema de transporte plasmático. La especificidad y la más alta eficiencia del receptor, significa que la testosterona sistémica es literalmente succionada al interior de la célula blanco (célula prostática), donde es transformada por la enzima  $5\alpha$ -reductasa al metabolito activo, la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona. Esta se une selectivamente y con alta afinidad al receptor a andrógenos (Mainwaring, 1979). El complejo hormona-receptor, bajo la influencia de la hormona, sufre un cambio en su configuración fisico-química (Mainwaring, 1979) y posteriormente ocurre una traslocación desde el citoplasma al núcleo, por dos mecanismos: 1) difusión a través de los poros de la envoltura nuclear y 2) interacción con el poro nuclear, proceso mediado por una señal de traslocación del receptor (Clark et al., 1992). El cambio en las propiedades del receptor consistente en un incremento en la afinidad por el núcleo ha sido llamado

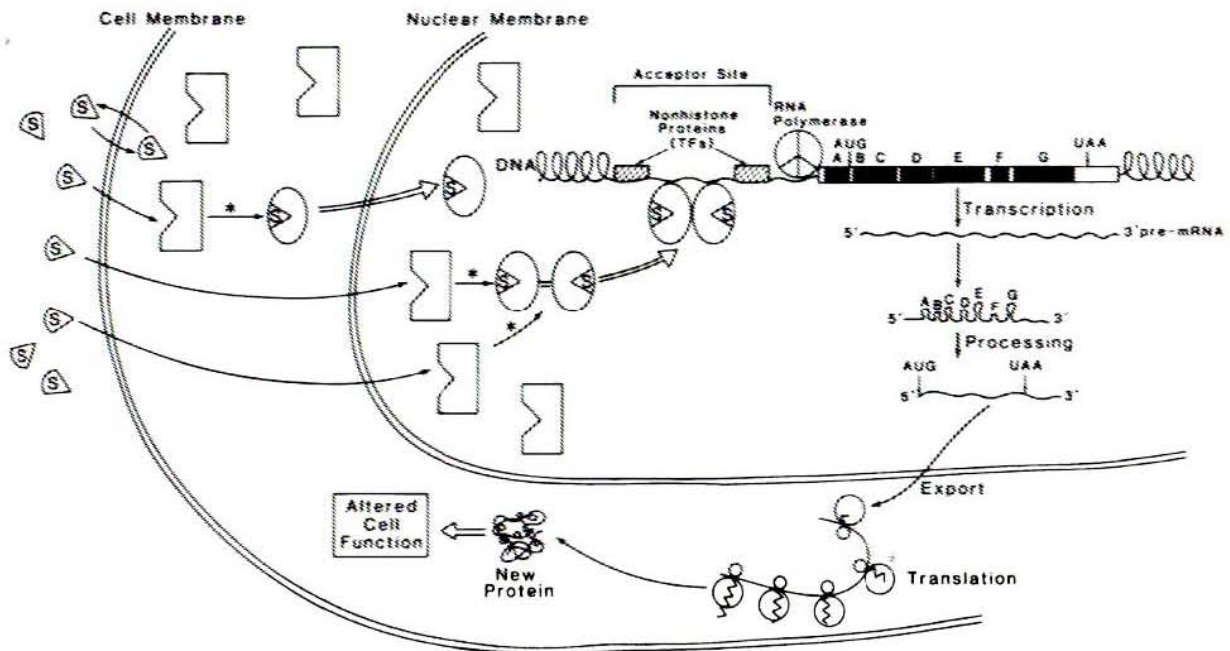
activación ó transformación (Catelli y Mester, 1983, Clark et al., 1992, Robinson y Spelsberg, 1997).

La retención nuclear del complejo DHT-receptor, parece implicar un cambio en el punto isoeléctrico de 5.8 a 6.5, o un cambio en el coeficiente de sedimentación de 3.8-S de la forma citosólica a 3-S de la forma nuclear. Los sitios aceptores en el núcleo pueden saturarse con complejos andrógeno-receptor ( $K_d=0.5$  nM), lo que indica que hay un número limitado de moléculasceptoras (aproximadamente 2000-3000 sitios aceptores por núcleo celular) (Liang et al., 1977). La naturaleza de estos sitios no es absolutamente clara, aunque se sabe que contienen ADN y proteínas nucleares diferentes a las histonas (Mainwaring, 1979, Edwards, 2000).

El complejo hormona-receptor dispara una serie de eventos bioquímicos, los cuales están fundamentalmente dirigidos a incrementar la transcripción de la información genética almacenada en el ADN de los cromosomas (Mainwaring, 1979). Una de las primeras respuestas de la unión del complejo andrógeno-receptor con el sitio aceptor es la de incrementar los niveles de ARNm unido a los ribosomas: este efecto puede observarse después de 15-40 horas de administrar andrógenos (en la rata). Los niveles de ARN polimerasa I unida a la cromatina se incrementan 1 hora después de la inyección de andrógenos, mientras que los de ARN polimerasa II, se incrementan más tarde (Liang et al., 1977). Las respuestas provocadas por la unión del complejo hormona-receptor con los sitios aceptores, ocurren en diferentes temporalidades, de tal manera que pueden dividirse en: iniciales, tempranas y tardías. Sin embargo, están profundamente integradas, es decir, componentes sintetizados tempranamente son necesarios para procesos tardíos. La producción inicial de ARN ribosomal es un prerrequisito para la síntesis proteica y esta a su vez es esencial para la síntesis de ADN, una respuesta tardía (Mainwaring, 1979, Robinson y Spelsberg, 1997).

Por definición, una respuesta hormonal debe ser reversible o finita, acorde con esto, el complejo andrógeno-receptor, ocupa los sitios aceptores por un lapso de 12 a 16 horas, después de lo cual los abandona o es degradado, por procesos no totalmente comprendidos. La salida del complejo deja espacio disponible para otros complejos recientemente formados. El receptor mismo (que es una proteína)

es sintetizado continuamente, o bien, reciclado del núcleo al citoplasma (Mainwaring, 1979).



**Fig. 4.** Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas (Tomada de Clark et al, 1992)

## 1.6 Fármacos antihormonales

### 1.6.1. Antiandrógenos

Los antagonistas de las hormonas esteroideas son compuestos que compiten con dichas hormonas por la unión al receptor. En general, su efecto es el de evitar la disponibilidad de órganos blanco para las hormonas (Dauvois y Parker, 1993).

Se conocen dos tipos de fármacos antiandrogénicos: a) los de características esteroideas, como el acetato de ciproterona, los cuales actúan suprimiendo la secreción de gonadotrofinas y por lo tanto disminuyen la testosterona plasmática,

sin embargo, debido a su estructura esteroidal, también tienen propiedades progestacionales (Estevez Carrizo, 2001). El primer antiandrógeno fue el acetato de ciproterona y fue sintetizado en Berlín en la década de los 50's, pero su uso en la práctica clínica sucedió hasta 1960, y actualmente es de los antiandrógenos más ampliamente utilizados (Neumann, 2005). Tiene 100% de biodisponibilidad, una corta vida media (2 a 8 horas) y un tiempo de eliminación de 60 horas. Se encuentra principalmente unido a albúmina y es metabolizado por 15 $\beta$ -hidroxilación (Schneider, 2003), y b) los no esteroidales (también llamados antiandrógenos puros), que a diferencia de los primeros, no poseen otras propiedades salvo las antiandrogénicas. En este segundo grupo se incluye a la flutamida, que fue el primer compuesto descubierto que tenía las características antes mencionadas. Este se une con alta afinidad al receptor a andrógenos. *In vivo* es transformado a 4-hidroxiflutamida por el hígado, lo que resulta en un incremento de su afinidad por el receptor a andrógenos (Kemppainen et al., 1992, Dauvois y Parker, 1993, Labrie, 1993). Aún cuando el acetato de ciproterona y la flutamida no comparten similitudes estructurales, ambas se unen al receptor a andrógenos y actúan como inhibidores competitivos (Gaillard-Moguilewsky, 1991, Clark et al., 1992).

#### 1.6.1.1. Mecanismo de acción

La flutamida ejerce su efecto antiandrogénico al competir con la testosterona y su principal metabolito, la dihidrotestosterona, por los sitios de unión de los andrógenos con los receptores citoplásmicos en las células blanco; además inhibe la unión nuclear de los andrógenos y forma complejos inactivos (Labrie, 1993, Zuo et al., 2002), disminuyendo así la acumulación nuclear de complejos activos hormona-receptor y la síntesis de DNA (Clark et al., 1992, Zuo et al., 2002). Su acción no promueve la reducción en los niveles de testosterona (McLeod, 1993).

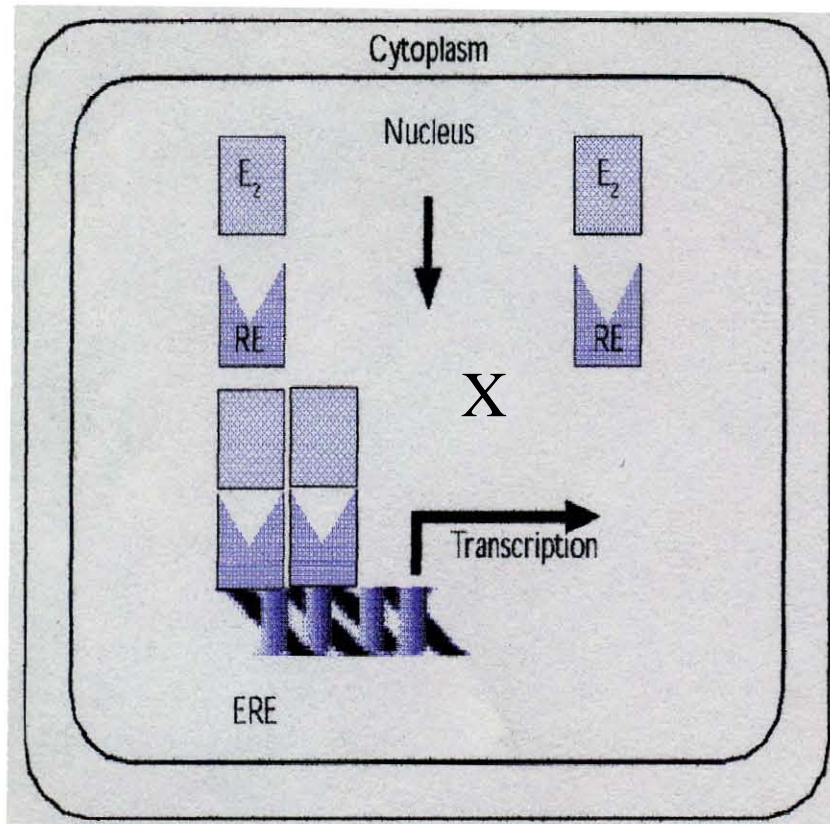
## 1.6.2 Antiestrógenos

El tamoxifen es un compuesto sintético no esteroidal, que se une al receptor de estrógenos ya que tiene alta afinidad por el mismo; una vez ingerido, se convierte en el hígado en 4-hidroxitamoxifen y esta conversión incrementa la afinidad por el receptor (Jordan et al., 1977). Presenta propiedades agonistas y antagonistas, por lo que se le considera un modulador selectivo del receptor a estrógenos, y puede actuar de estas diferentes maneras dependiendo del órgano blanco (Barrón-González et al., 2001). La estructura trans del tamoxifen se comporta como antagonista, mientras que la forma cis es un agonista débil. Su actividad antiestrogénica se debe a que su estructura molecular incluye un residuo de alquilamida (Dauvois y Parker, 1993).

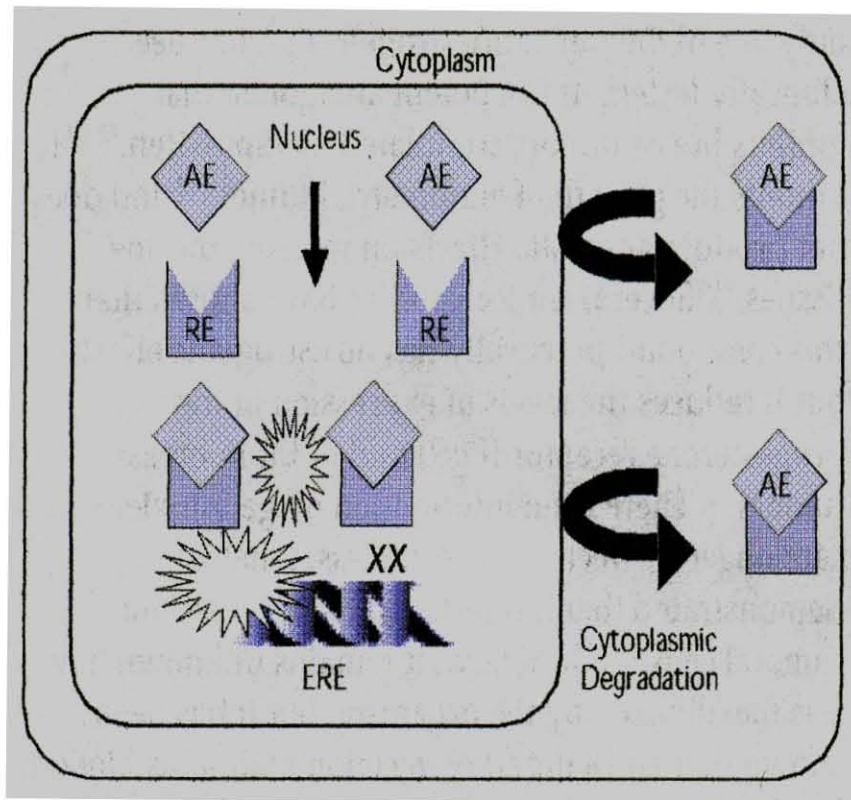
### 1.6.2.1. Mecanismo de acción

La acción del tamoxifen comienza con la unión de este compuesto al receptor a estrógenos, lo cual permite la dimerización del receptor, así como la unión de este complejo (tamoxifen-receptor) al elemento de respuesta a estrógenos (ERE), presente en algunos genes. Sin embargo, no activa los genes de respuesta estrogénica (Dauvois y Parker, 1993); Estudios realizados en ADN proveen evidencia de que este antagonista no inhibe la actividad de unión al ADN, al menos *in vitro*. Esto ha sido confirmado *in vivo* en dos tipos de transfecciones experimentales: primero, el tamoxifen es capaz de estimular la transcripción de un plásmido reportero, la magnitud de la respuesta depende del gen promotor y del tipo celular; segundo, ensayos de competencia han demostrado que el receptor es capaz de competir por la unión al ADN blanco, aún cuando se encuentra formando un complejo con el tamoxifen (Dauvois y Parker, 1993). El efecto antiestrogénico es ejercido a través de inhibir la actividad del factor de transcripción TAF-2, presente en el receptor, pero no de TAF-1, el cual permanece activo. Este mecanismo es, en principio, la causa de su actividad como agonista/antagonista. El mecanismo se torna más complejo si consideramos las evidencias que sugieren

que el tamoxifen se une de manera diferente a los sitios TAF, dependiendo de la dosis, donde TAF-2 tiene la mayor afinidad. Así los efectos del tamoxifen a bajas concentraciones se deben al bloqueo de TAF-2, mientras que en altas concentraciones el receptor a estrógenos es bloqueado totalmente (bloqueo de TAF 1 y 2) (White y Parker, 1998, Barrón-González et al., 2001).



**Fig. 5.** Mecanismo de acción de los fármacos antihormonales tipo I o moduladores selectivos. El fármaco se une al receptor, hay dimerización y unión del complejo al sitio de respuesta a esteroides, pero no activa los genes de respuesta esteroideal. E<sub>2</sub>: hormona. RE: receptor a esteroides. ERE: elemento de respuesta a esteroides (Tomada de Barrón-González et al, 2001).



**Fig. 6.** Mecanismo de acción de los fármacos antihormonales tipo II o puros. El fármaco se une al receptor, pero no hay dimerización y tampoco unión al sitio de respuesta a esteroides, y por lo tanto no hay transcripción. El complejo antihormona-receptor sufre degradación. AE: antihormona. RE: receptor a esteroides. ERE: elemento de respuesta a esteroides (Tomada de Barrón-González et al, 2001).

## 1.7. La búsqueda de receptores a esteroides en invertebrados

### 1.7.1. parásitos

La existencia de receptores hormonales se ha reportado tanto en eucariontes simples, como en organismos más evolucionados, y se piensa que funcionan de manera análoga entre los diferentes organismos (Csaba, 1980, Feldman et al., 1982, Roth et al., 1982).



Un caso que llama la atención es el de *Trichomonas vaginalis*. Estudios *in vitro* indicaron que este parásito incrementaba su multiplicación con la adición de estradiol, mientras que *in vivo*, se demostró la necesidad de un estado altamente estrogenizado para que la infección pudiera establecerse (Stein y Cope, 1933, Azuma, 1968). Debido a los efectos que tienen los esteroides sobre este parásito, se inició la búsqueda de receptores estrogénicos y androgénicos, y mediante la técnica de binding, se determinó la existencia tanto del receptor a estrógenos como a andrógenos en *Trichomonas vaginalis*, además, la capacidad de unión a su agonista podía ser bloqueada mediante el uso de fármacos antihormonales (Hammill et al., 1985, Ford et al., 1987).

La presencia de receptores o de proteínas que se unen a esteroides en nemátodos había sido sugerida en varios estudios, donde se veía la influencia ejercida por la presencia de esteroides *in vivo* e *in vitro*. De tal forma, se inició la búsqueda de dichos receptores, mediante diversos abordajes. Así se descubrió la presencia de receptores a progesterona, testosterona y estradiol en el nemátodo *Nippostrongylus brasiliensis* (Majundar et al., 1987).

Los nemátodos de vida libre, como *Caenorhabditis elegans*, se han usado como modelo para diversos estudios, incluyendo los endócrinos, debido a que presentan muchas ventajas, entre las que destacan su pequeño tamaño, lo que los hace cultivables en grandes números bajo condiciones controladas, su rapidez de crecimiento, su facilidad de mantenimiento en laboratorio, además de que presentan todos los sistemas encontrados en los mamíferos, con excepción del sistema circulatorio (Hood et al., 2000).

En estos nemátodos se observó que la presencia de diferentes contaminantes del medio ambiente, tiene efectos sobre los órganos reproductivos, lo que sugirió la presencia de receptores a hormonas sexuales (Hoshi et al., 2003); los experimentos encaminados a determinar la existencia de tales receptores, confirmaron la existencia de 284 genes de la superfamilia de receptores nucleares (Gissendanner et al., 2004), de los cuales 15 son altamente conservados entre los metazoarios, y 5 de ellos están involucrados en la ecdisis en los insectos, proceso que es dependiente de ecdiesteroides, (Gissendanner et al., 2004), hormonas que

funcionan de manera análoga a estrógenos y andrógenos en mamíferos (De Loof y Huybrechts, 1998). Otra serie de receptores nucleares están involucrados en el metabolismo, el desarrollo reproductivo, y la expectativa de vida (Gerisch et al., 2001), así como en la resistencia a toxinas (Lindblom et al., 2001).

Finalmente, la presencia del receptor a estrógenos fue demostrada en los nemátodos de vida libre *Panagrellus redivivus* y *Caenorhabditis elegans*, usando la técnica de radioinmunoensayo. Se observó además, que el bloqueo de este receptor con ciertos contaminantes ambientales, causa una reducción en la fecundidad de los parásitos (Hood et al., 2000).

La presencia de receptores específicos en organismos primitivos, apoya el concepto de que la mayoría de los eucariontes poseen al menos algunos elementos del sistema de receptores hormonales a esteroides sexuales, siendo por lo tanto, un punto en común entre hongos, parásitos, y organismos superiores, como los mamíferos (Csaba, 1980, Roth et al., 1982).

En resumen, los hallazgos previos en los cisticercos de *Taenia crassiceps*, en el sentido de que modifican los niveles hormonales del hospedero (Larralde et al., 1995), así como la capacidad recién descubierta de producir testosterona a partir de androstendiol, tanto de los cisticercos de *Taenia crassiceps* como de *Taenia solium* (Gomez et al., 2000, Romano et al., 2003), autorizan a pensar en la existencia y actividad de ciertas enzimas de la vía esteroidogénica, que darán como resultado la producción de hormonas esteroides en estas dos especies de cisticercos. Además, es posible que los cisticercos necesiten producir esteroides sexuales para su desarrollo, para lo cual necesitarían contar con receptores específicos, para que dichos esteroides pudieran ejercer su efecto.

Todos estos antecedentes en conjunto, nos llevaron a plantearnos la idea de la existencia de receptores, y su búsqueda, en los cisticercos estudiados en el presente proyecto.

## 2. HIPÓTESIS

- 1) Si los cisticercos de *Taenia solium* y de *Taenia crassiceps* tienen actividad de  $17\alpha$ -hidroxilasa, deberán ser capaces de transformar progesterona en  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona.
- 2) Si los cisticercos *Taenia solium* y de *Taenia crassiceps* tienen actividad de  $3\beta$ -HSD, deberán ser capaces de transformar DHEA en androstenediona.
- 3) Si los cisticercos *Taenia solium* y de *Taenia crassiceps* tienen actividad de  $17\beta$ -HSD, deberán ser capaces de transformar DHEA en androstenediol, estrona en estradiol, y estradiol en estrona.
- 4) Si los andrógenos y los estrógenos son necesarios para el desarrollo de los cisticercos, su acción deberá efectuarse vía un receptor específico, el cual se podrá detectar.
- 5) Si los andrógenos y los estrógenos son necesarios para el desarrollo de los cisticercos, entonces los antiandrógenos y los antiestrógenos disminuirán la incorporación de timidina en los cisticercos de *Taenia solium in vitro*.
- 6) Si los andrógenos son necesarios para el desarrollo de los cisticercos, entonces los antiandrógenos disminuirán la proliferación de los cisticercos de *Taenia crassiceps in vivo*.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. General

Estudiar la producción de hormonas esteroides y la presencia de sus receptores en cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*, así como el efecto de los antiandrógenos y los antiestrógenos sobre la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* de los cisticercos antes mencionados.

### 3.2. Particulares

1) Estudiar el metabolismo y producción de esteroides en cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*.

a) Determinar actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilasa.

b) Determinar actividad de 3 $\beta$ -HSD.

c) Determinar actividad de 17 $\beta$ -HSD.

d) Determinar actividad de 17 $\beta$ -HSD en el sentido reductivo.

e) Determinar actividad de 17 $\beta$ -HSD en el sentido oxidativo.

2) Determinar la existencia del receptor a estrógenos en cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*.

3) Determinar la existencia del receptor a andrógenos en cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*.

4) Determinar el efecto del uso de antiandrógenos y antiestrógenos sobre la incorporación de timidina y metabolismo *in vitro* de los cisticercos de *Taenia solium*.

a) Estudios con acetato de ciproterona y flutamida.

b) Estudios con tamoxifen.

5) Determinar el efecto del uso de antiandrógenos sobre la proliferación *in vivo* de los cisticercos de *Taenia crassiceps*.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

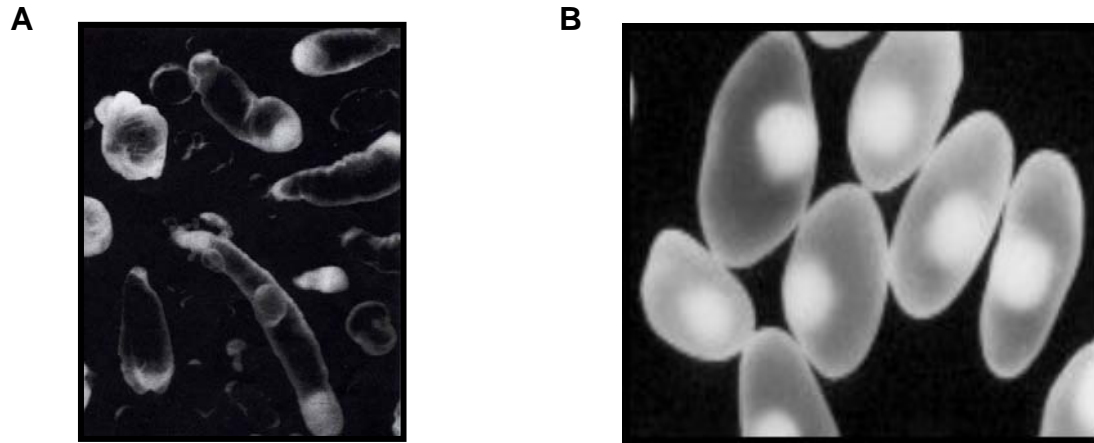
### 4.1. Parásitos

#### 4.1.1. Obtención de los parásitos

Para obtener cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF), se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c ANn, infectados intraperitonealmente con cisticercos de *Taenia crassiceps*. Después de 8 semanas de parasitadas, fueron sacrificadas bajo anestesia con cloroformo, se abrió la cavidad abdominal y se obtuvieron los parásitos. Estos fueron lavados con un amortiguador salino de fosfatos estéril (PBS), seguido de varios lavados con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen Corporation, Auckland, N.Z) estéril adicionado con antibióticos para eliminar restos celulares del huésped.

Los cisticercos de *Taenia solium* fueron disecados de la carne de cerdos parasitados y colocados en PBS estéril. Posteriormente, bajo un microscopio de disección, les fue retirada la capa de tejido fibroso que los rodeaba. Se seleccionaron los cisticercos que lucían translúcidos y enteros. Los que se

rompieron durante el proceso fueron desechados. Los experimentos fueron hechos por triplicado y de cada animal se hicieron al menos 3 repeticiones.



**Fig. 7.** Cisticercos de *Taenia crassiceps* (A) y de *Taenia solium* (B).

## 4.2. Metabolismo y producción de esteroides

Una vez lavados, se colocó 1 ml de la suspensión de cisticercos (60 cisticercos aprox.) en viales que contenían 2 ml de DMEM adicionado con antibióticos + 0.1% de albúmina sérica bovina y se añadieron 0.3  $\mu$ Ci de  $^3$ H-progesterona (1, 2, 6, 7- $^3$ H progesterona 93.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) ó  $^3$ H-dehidroepiandrosterona (1, 2, 6, 7- $^3$ H DHEA, 74.0 Ci/mmol, New products, MS, Dupont Boston ) ó  $^3$ H-estradiol (2, 4, 6, 7- $^3$ H estradiol, New Products, MS, Dupont Boston) ó  $^3$ H-estrone (2, 4, 6, 7- $^3$ H estrone, 65.00 Ci/mmol, New Products, MS, Dupont Boston) y se incubaron durante 3 horas a 36°C en un baño María con agitación constante. Las hormonas marcadas radioactivamente (trazadores, marcadores ó tracers) antes mencionadas también se añadieron a viales con medio DMEM libre de parásitos y se incubaron de la manera antes descrita y fueron utilizados como blancos (controles).

Pasadas 3 horas, se retiró el sobrenadante (2 ml) y se colocó en otro vial (previamente rotulado) y se congeló. Los parásitos permanecieron en sus viales y fueron congelados para posteriormente realizar la cuantificación de proteínas.

El procedimiento para los cisticercos de *Taenia solium* fue similar: los parásitos se lavaron abundantemente con PBS estéril, y después se hicieron 3 lavados con medio DMEM + antibióticos.

Después de lavados, se colocaron 8 cisticercos en viales que contenían 2 ml de medio DMEM + antibióticos + 0.1% de albúmina sérica bovina y 0.3  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -progesterona ó  $^3\text{H}$ -dehidroepiandrosterona (DHEA) ó  $^3\text{H}$ -estradiol ó  $^3\text{H}$ -estrone, y se incubaron durante 3 horas a  $36^\circ\text{C}$  en un baño María con agitación constante.

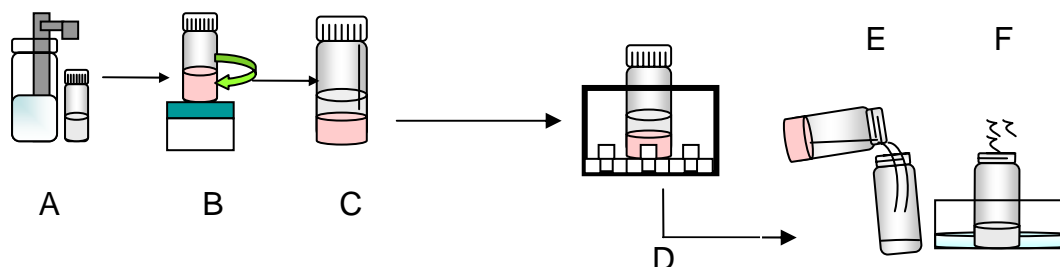
Los trazadores antes mencionados también se añadieron a viales con medio DMEM libre de parásitos y se incubaron de la manera antes descrita y fueron utilizados como blancos (controles).

Pasadas 3 horas, se retiró el sobrenadante (2 ml) y se colocó en otro vial (previamente rotulado) y se congeló. Los parásitos permanecieron en sus viales y fueron congelados.

### **4.3. Extracción de esteroides del medio de cultivo**

El medio de cultivo, sin los parásitos, se descongeló a temperatura ambiente. Una vez descongelado, se colocaron 5 ml de éter anhidro por cada ml de medio, para extraer los esteroides. Se taparon los viales y se agitaron con vórtex durante 1 min/vial, teniendo cuidado de que el nivel no suba hasta la tapa, para evitar contaminación por radioactividad. Posteriormente, se esperaron 20 minutos a que se separaran las fases. La acuosa quedaba abajo, la etérea quedaba arriba. Por otra parte, en un recipiente se colocó hielo seco y acetona industrial y se colocaron los viales durante 15 minutos para que se congelara la fase acuosa. Una vez congelada la fase acuosa, se recuperó la fase etérea, que se vació en viales nuevos (previamente rotulados), pero sin taparlos. Se dejó que el éter se evaporara hasta sequedad en baño María a  $37^\circ\text{C} \pm 2$  (aprox. 2 horas). Se repitió todo el proceso por cada ml de medio, la fase etérea se recuperó en los viales

previamente utilizados. Una vez completado el proceso por segunda ocasión, se taparon los viales, se rotularon las tapas y se llevaron a un cuarto frío a 4°C.



**Fig. 8.** Proceso de extracción de las hormonas esteroides. A: Se agrega éter a la muestra. B: agitación con vortex. C: separación de fases. D: Congelación. E: recuperación de la fase acuosa. F: Evaporación en baño María.

## 4.4. Cromatografía en capa delgada (TLC)

### 4.4.1. Técnica de cromatografía

Para la cromatografía en capa delgada primeramente se prepara la placa de sílica gel (20 x 20 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Germany), para lo cual se trazan carriles de 1.5 cm de ancho.

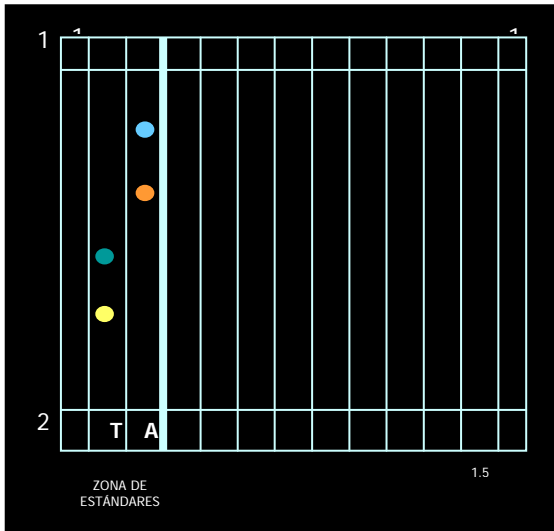
Se preparan fracciones de 300 µl de estándares (Steraloids Inc. pureza 99.99%) disueltos previamente en acetona grado HPLC y se siembran 5 µl en los primeros carriles.

En los experimentos donde se utilizó la progesterona como precursor, se empleó hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona como estándares internos. Cuando la dehidroepiandrosterona (DHEA) fue empleada como precursor, se utilizó androstenediol, androstenediona y testosterona como estándares internos. En los experimentos donde se utilizó el estradiol como precursor, se empleó



androstenediona, testosterona y estrona como estándares internos. Finalmente, cuando la estrona se utilizó como precursor, se empleó androstenediona, testosterona y estradiol como estándares internos.

Por otro lado, las muestras extraídas fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de etanol grado HPLC, se agitaron durante 1 minuto en vortex y se sembraron 40  $\mu$ l en los carriles correspondientes de la placa, evaporando con nitrógeno. La placa se colocó entonces en la cámara cromatográfica durante aproximadamente 2 horas, esta cámara contenía el sistema diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) que es el ideal para separar los esteroides de nuestro interés. Pasadas las 2 horas, se retiró la placa de la cámara y se dejaron evaporar los solventes. Los estándares se detectaron en las placas, usando luz ultravioleta y se revelaron con  $H_2SO_4$  seguido de calor a 120° C. Se cuadrículó la placa, utilizando la región correspondiente a los estándares. La región correspondiente a las muestras se recortó y colocó en viales con líquido de centelleo. Finalmente, la radioactividad se cuantificó en un espectrómetro de centelleometría. Debido a que siempre hay pequeñas cantidades de radioactividad presentes en las incubaciones control (medio con todos los suplementos, pero sin cisticercos), su porcentaje fue calculado y restado de los valores correspondientes obtenidos en las incubaciones con cisticercos. Los resultados se expresaron en porcentaje de transformación de sustrato para cada metabolito identificado, después de 3 horas de incubación en presencia del precursor. Con la finalidad de corroborar nuestros hallazgos las muestras se desarrollaron en un segundo sistema de solventes, que se seleccionó después de varios ensayos por ser el más adecuado para separar los esteroides que nos interesaba identificar. El sistema empleado fué benceno-metanol (9:1 v/v).



**Fig. 9.** Esquema de una placa cromatográfica dividida en carriles (izquierda). Tanques de cromatografía (derecha).

## 4.5. Western Blot

### 4.5.1. Lisis de los tejidos

Se utilizaron placenta humana y músculo de cerdo, como controles positivos, ya que se ha reportado previamente la existencia de receptores a andrógenos y estrógenos en estos tejidos (Stanley et al., 1980, Hirota et al., 1981, McCormick et al., 1981, Snochowski et al., 1981, Younes et al., 1982, Horie et al., 1992, Doumit et al., 1996).

Los diferentes tejidos utilizados (placenta humana, músculo de cerdo, cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*) se lavaron 3 veces con PBS adicionado con el inhibidor de proteasas PMSF 1 mM.

Posteriormente las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron con ayuda de un mortero. El polvo recuperado se resuspendió en la solución de lisis RIPA (Tris-HCl pH 7.6, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol 10%, Tritón X-100

1%, desoxicolato de sodio 0.5% y SDS 0.2%), en presencia de los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM y de la mezcla de inhibidores Complete™ (No. Cat. 1 697 498, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 15 min a 4°C. A continuación las muestras se sonicaron 3 veces durante 30 segundos a 5 W en un sonicador de punta y se centrifugaron 15 minutos a 10,500 rpm. Al sobrenadante recuperado se le cuantificó la concentración de proteínas por un método comercial basado en el ensayo de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) (Peterson, 1979).

#### **4.5.2. Análisis de Western Blot**

Los extractos proteicos se diluyeron 1:5 con amortiguador de muestra para electroforesis (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 10%), y se hirvieron por 10 min. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (Laemmli, 1970), con un voltaje de 90 V durante 2 horas aprox. Posteriormente los geles se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (No. Cat. RPN2020E, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) (Towbin et al., 1979). Para corroborar la eficiencia de la transferencia, los geles se tiñeron con solución de Coomasie (azul de Coomasie R-250 0.025%, metanol 40% y ácido acético 7%). Para bloquear las cargas inespecíficas de las proteínas, la membrana de nitrocelulosa se incubó 3 hrs a temperatura ambiente con solución bloqueadora (leche Svelty's 3%, albúmina sérica bovina 1%, suero fetal bovino 2%, PBS + Tween-20 0.05% y azida de sodio 0.02%). Posteriormente, la membrana bloqueada se incubó a 4°C durante toda la noche, con los anticuerpos primarios desarrollados en ratón, contra el receptor a andrógenos (dilución 1:100, No. cat. sc-7305, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, U.S.A) o el receptor  $\alpha$  de estrógenos (dilución 1:100, No. cat. sc-787, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, U.S.A). A continuación la membrana se lavó con abundante solución de PBS + Tween-20 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Después se empleó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón, conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:10,000, No. Cat. 62-6520, Zymed Laboratories, San

Francisco, CA, U.S.A). La membrana se lavó nuevamente con PBS + Tween-20 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. La inmunodetección se reveló en placas autorradiográficas (No. Cat. RPN 2103K, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), con el sistema de quimioluminiscencia ECL+ Plus (No. Cat. RPN 2132, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), que reacciona con la peroxidasa.

## **4.6. Cultivo**

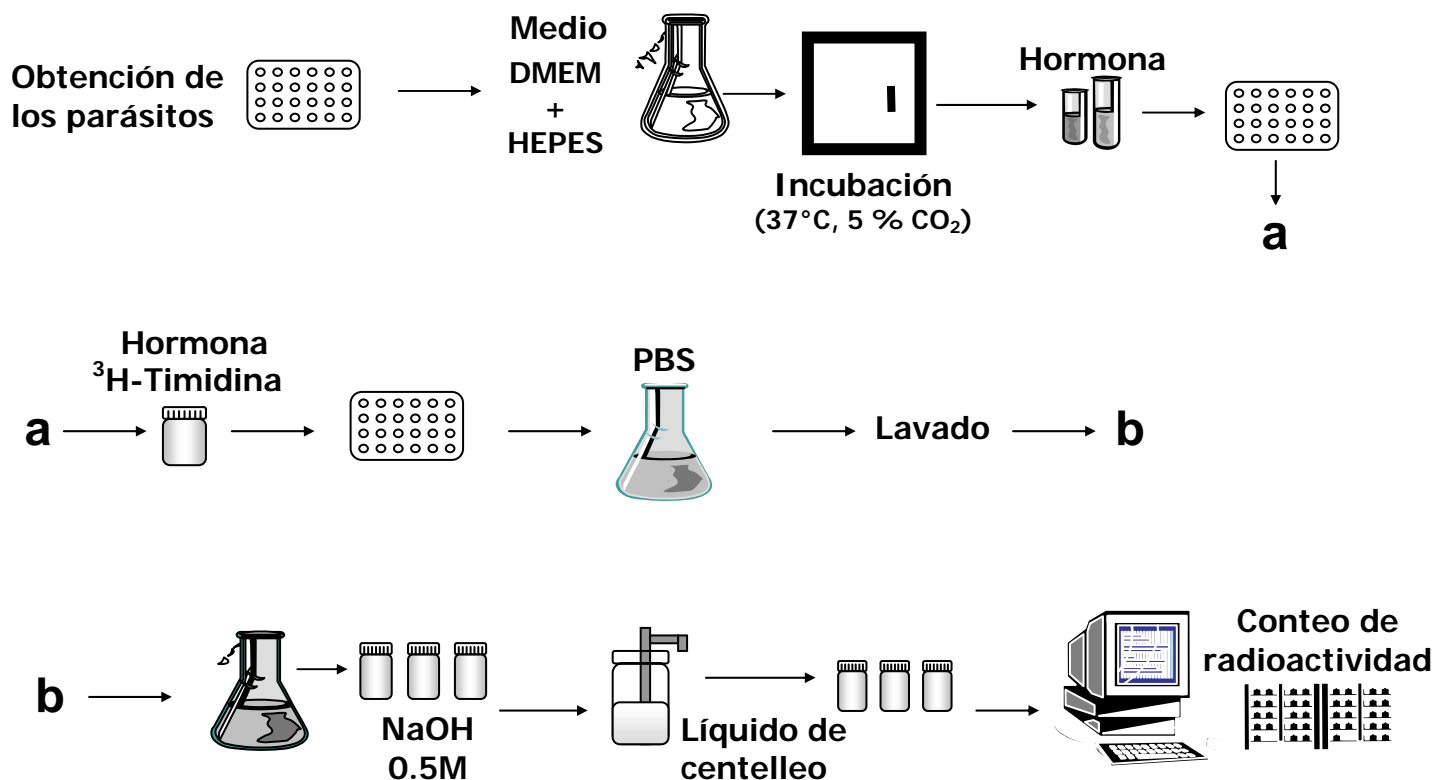
Es sabido que entre los efectos biológicos de los esteroides, en particular, andrógenos y estrógenos están la diferenciación celular, la maduración y la proliferación celular (George y Wilson, 1994), esta última puede ser medida con relativa facilidad en el laboratorio.

Dado que trabajos previos del laboratorio mostraron que los cisticercos sintetizan testosterona y estrógenos, hormonas que podrían ser importantes para el desarrollo del parásito, se decidió investigar si la presencia de sustancias que interfieren con la unión al receptor de andrógenos y estrógenos podría afectar la proliferación celular del parásito. Para esto se utilizó el cultivo del parásito, y la proliferación se evaluó mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Este compuesto es un análogo de las bases nitrogenadas del ADN, de tal manera que aquellas células de nueva creación, serán capaces de tomar este compuesto del medio e incorporarlo en su doble hélice, y como la timidina está marcada radioactivamente, se puede medir la cantidad de radioactividad por centelleometría, de tal manera que a mayor cantidad de radioactividad, mayor cantidad de timidina incorporada, o sea, mayor proliferación celular.

### **4.6.1. Técnica de cultivo**

Los cisticercos de *Taenia solium* o de *Taenia crassiceps*, fueron abundantemente lavados con PBS, seguido de 3 lavados con medio DMEM + antibióticos.

Después de lavados se pusieron 5 parásitos en cada pozo de la caja multipozos, donde había 2 ml de medio DMEM + antibióticos, y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de este periodo, los parásitos fueron lavados con medio estéril, e incubados otras 48 horas, en presencia de flutamida (Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) o acetato de ciproterona (Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) o tamoxifen (Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) + <sup>3</sup>H-timidina (methyl-<sup>3</sup>H thymidine, 51.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech). Después de este tiempo, se separó el medio y los parásitos fueron lisados con 1 ml de NaOH 0.5 N en viales. Una vez lisados, se añadieron 5 ml de líquido de centelleo y la radioactividad se contó por centelleometría. Los resultados se expresaron como la <sup>3</sup>H-timidina capturada por los parásitos después de 24 horas de incubación en presencia de los fármacos antes mencionados.



**Fig. 10.** Metodología para el cultivo de los parásitos con <sup>3</sup>H-timidina, para evaluar proliferación celular.

## 4.7. Administración *in vivo* de flutamida

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los cisticercos de *Taenia crassiceps* así como los de *Taenia solium*, tienen la capacidad de producir testosterona a partir de un precursor con poca actividad biológica como es la androstendiona (Gomez et al., 2000, Romano et al., 2003). Es sabido que la testosterona al mismo tiempo que hormona, también es un precursor, por una parte de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona, el andrógeno de mayor actividad biológica y por otra, de estradiol, un estrógeno de alta actividad biológica. Sin embargo esto no descarta la posibilidad de que la testosterona pueda actuar por sí misma.

Pensando en esta posibilidad decidimos utilizar el antiandrógeno flutamida, que es empleado ampliamente en medicina para el tratamiento de cáncer de próstata (Neumann, 2005, Estevez Carrizo, 2001).

### 4.7.1. Procedimiento experimental

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c ANn, que fueron inoculados intraperitonealmente con 20 cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF, a las 4 semanas de edad, en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Pocos días después de la inoculación, los cisticercos empiezan a reproducirse por gemación, y después de pocos meses pueden llegar a ser cientos o incluso miles, la curva de proliferación muestra un comportamiento lineal entre la semana 4 y la 16 post-inoculación (Larralde et al., 1995).

Para desarrollar este experimento se utilizaron 10 ratones hembras en cada grupo, con 10 semanas de parasitadas y se les administró 25 mg/kg/día de flutamida o vehículo vía subcutánea, durante 10 días (Gye y Ohsako, 2003, Kim et al., 2002).

Los animales fueron pesados diariamente. Después de este periodo, los animales se sacrificaron bajo anestesia con cloroformo y los cisticercos fueron extraídos de la cavidad abdominal, colocados en una probeta donde se midió su volumen total y posteriormente contados de la siguiente manera: se contó la cantidad de

cisticercos que había en 100  $\mu$ l y esto se hizo por quintuplicado, se obtuvo la media y con esta cantidad se calculó el número existente en el volumen total. Los ovarios y úteros de todos los ratones se pesaron en una balanza de precisión marca Sartorius Research.

#### **4.8. Análisis estadístico**

La media aritmética y la desviación standar fueron calculadas de los replicados de cada incubación para cada precursor.

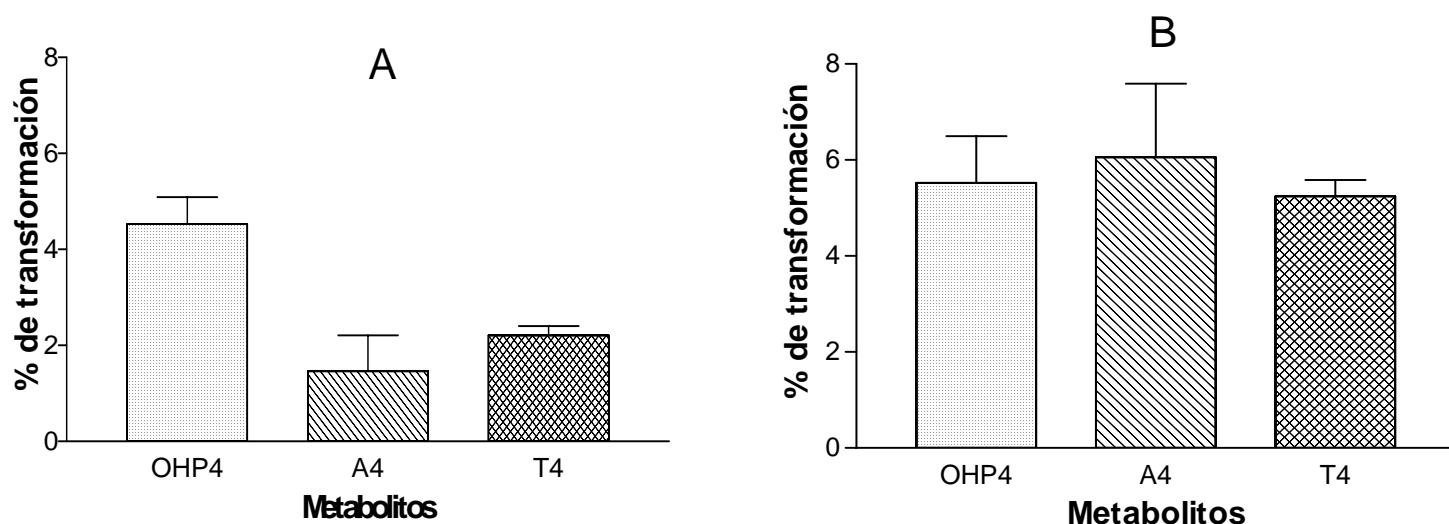
La evaluación estadística de los resultados fue realizada mediante la prueba de t de student, y para ello se empleó un paquete computacional para estadística (GraphPad Prism 2.01 for windows).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Taenia crassiceps*

#### 5.1.1. Metabolismo de esteroides

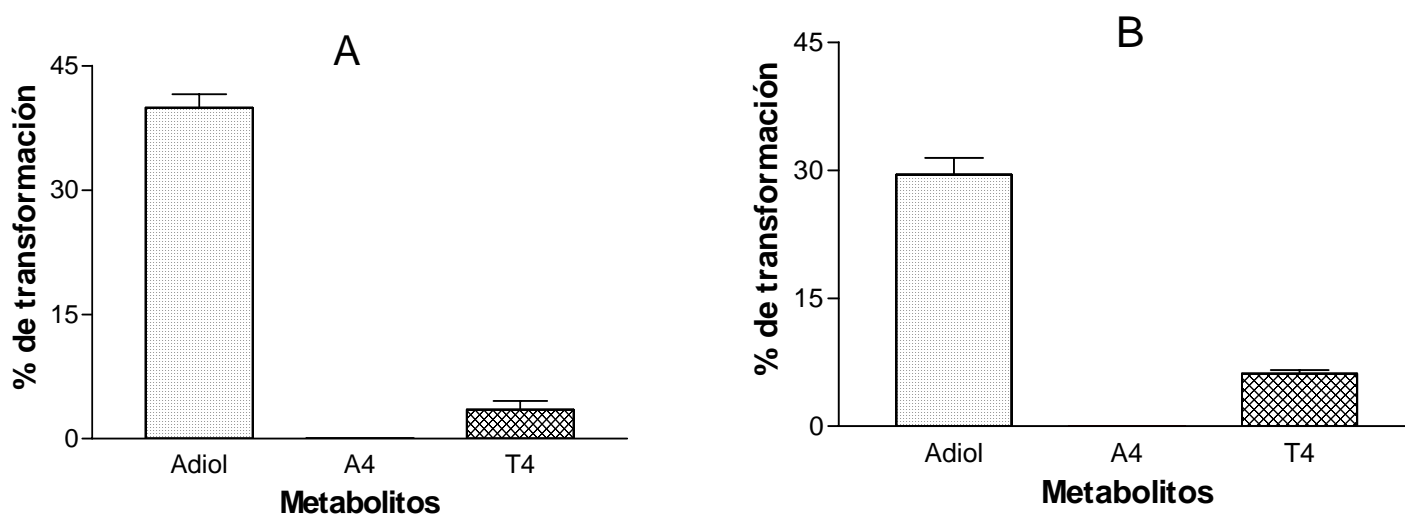
La figura 11 muestra que los cisticercos de *T. crassiceps* son capaces de transformar  $^3\text{H}$ -progesterona en  $^3\text{H}$ -hidroxiprogesterona (4.52%),  $^3\text{H}$ -androstenediona (1.46%) y  $^3\text{H}$ -testosterona (2.2%).



**Fig. 11.** Metabolismo de progesterona por los cisticercos de *T. crassiceps*. La progesterona radioactiva fue metabolizada principalmente a hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona. Las placas cromatográficas fueron desarrolladas con diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de sustrato transformado después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. OHP4: Hidroxiprogesterona. A4: Androstendiona. T4: Testosterona.

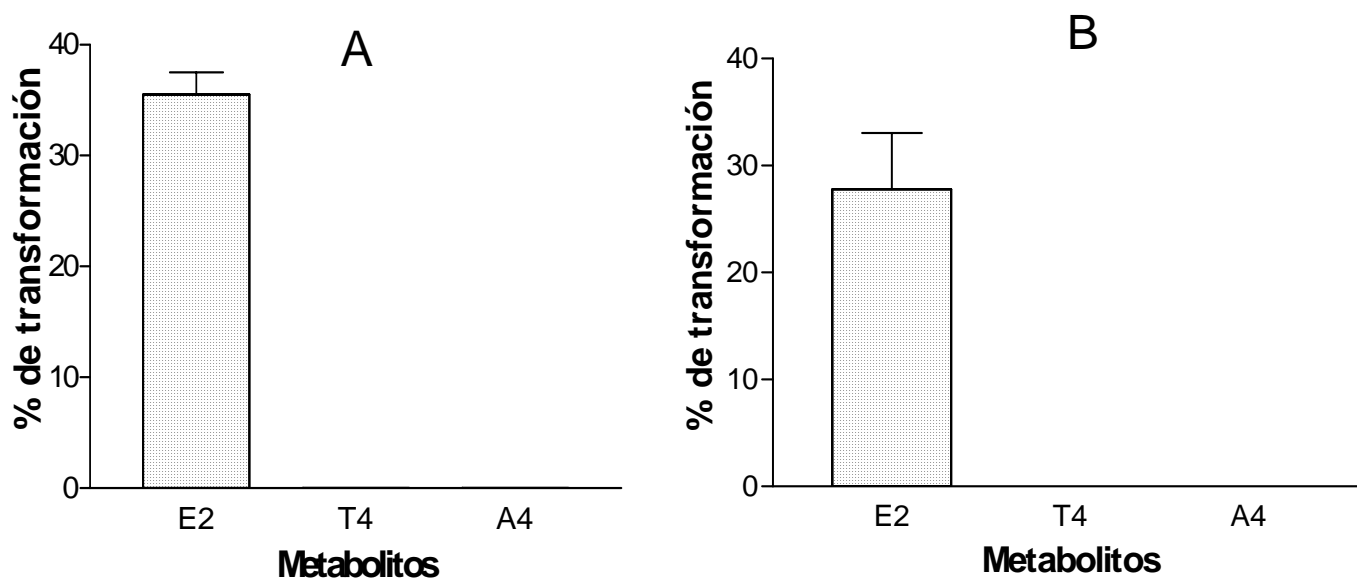


La figura 12 muestra que en bioensayo de 3 horas, los cisticercos de *T. crassiceps* son capaces de transformar  $^3\text{H}$ -DHEA en  $^3\text{H}$ -androstenediol (39.95%) y  $^3\text{H}$ -testosterona (3.49%). No se encontró androstenediona.



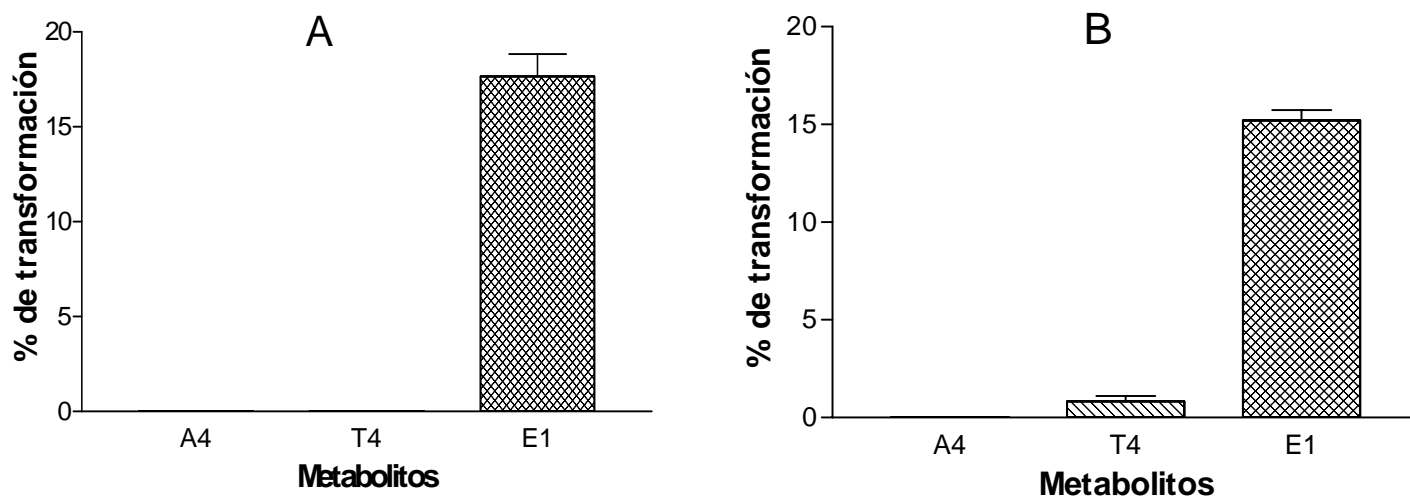
**Fig. 12.** Metabolismo de DHEA radioactiva por los cisticercos de *T. crassiceps*. Se produjo una importante cantidad de androstenediol y en menor proporción, testosterona. No se detectó androstenediona. Las placas de cromatografía fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación del sustrato después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. Adiol: Androstendiol. A4: Androstenediona. T4: Testosterona.

La figura 13 muestra que los cisticercos de *T. crassiceps* son capaces de transformar  $^3\text{H}$ -estrona en  $^3\text{H}$ -estradiol (35.51%). No se encontró testosterona ni androstenediona.



**Fig. 13.** Metabolismo de estrona radioactiva por los cisticercos de *T. crassiceps*. Se produjo estradiol como el principal metabolito. Las placas cromatográficas fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación del sustrato después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. E2: Estradiol. T4: Testosterona. A4: Androstendiona.

La figura 14 muestra que los cisticercos de *T. crassiceps* son capaces de transformar  $^3\text{H}$ -estradiol en  $^3\text{H}$ -estrona (1765%).

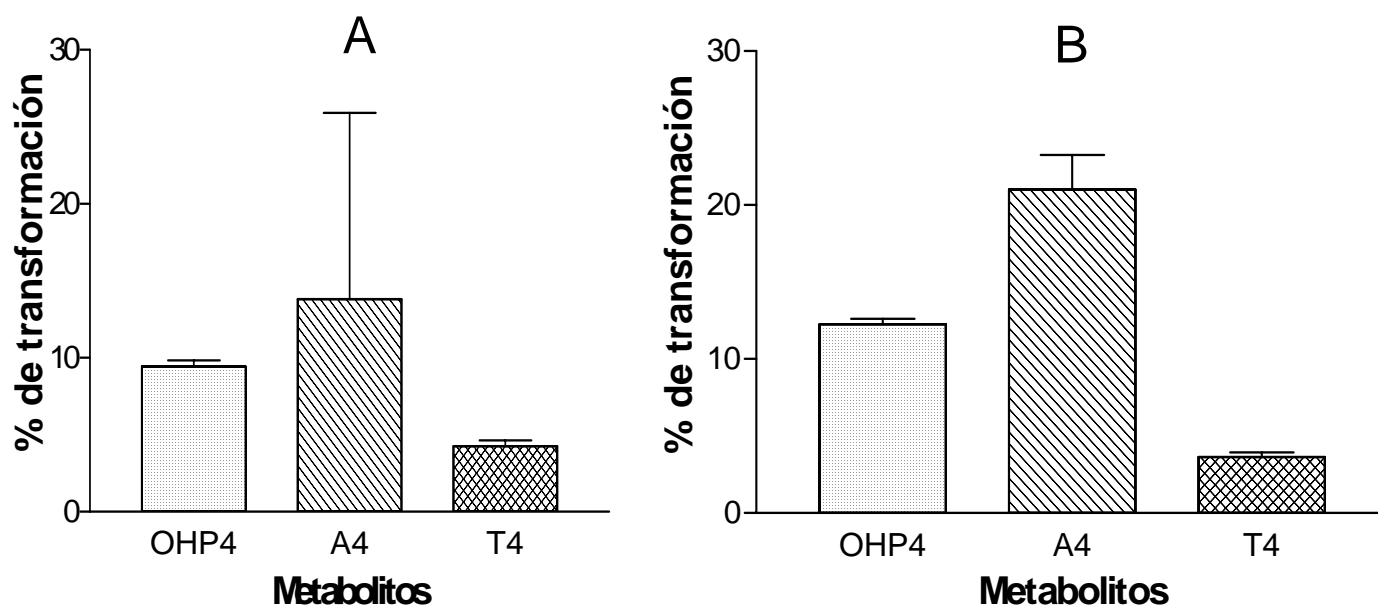


**Fig. 14.** Metabolismo de estradiol radioactivo por los cisticercos de *T. crassiceps*. Se produjo estrona como el principal metabolito. Las placas de cromatografía fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación del sustrato después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. A4: Androstendiona. T4: Testosterona. E1: Estrona.

## 5.2. *Taenia solium*

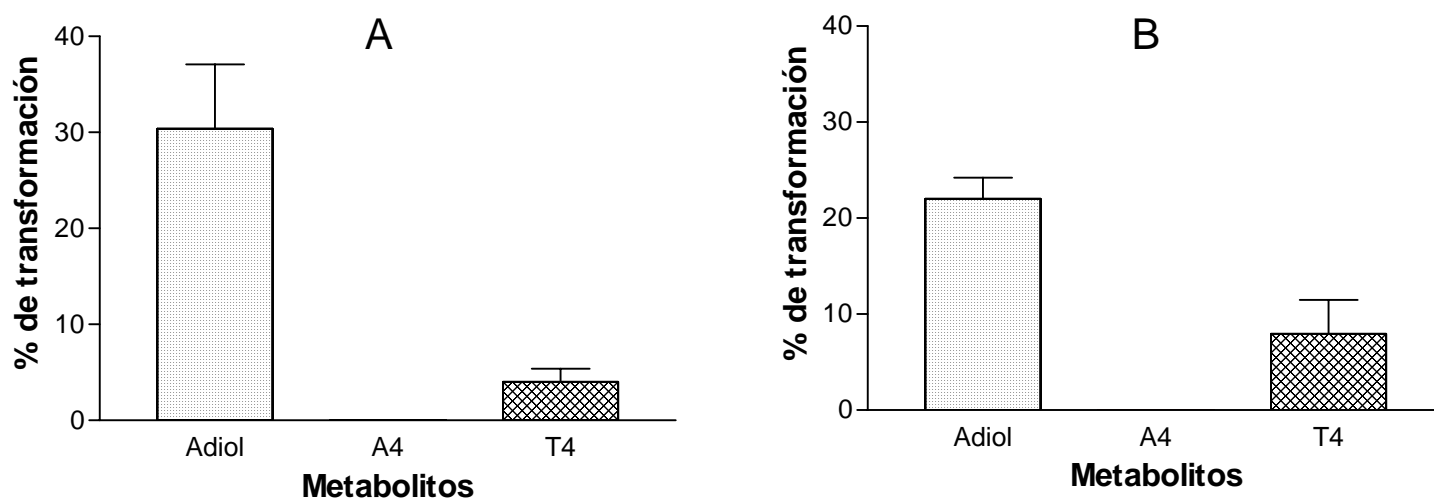
### 5.2.1. Metabolismo de esteroides

La figura 15 muestra que los cisticercos de *T. solium* son capaces de producir  $^3\text{H}$ -hidroxiprogesterona (9.44%),  $^3\text{H}$ -androstenediona (13.8%) y  $^3\text{H}$ -testosterona (4.26%) a partir de  $^3\text{H}$ -progesterona.



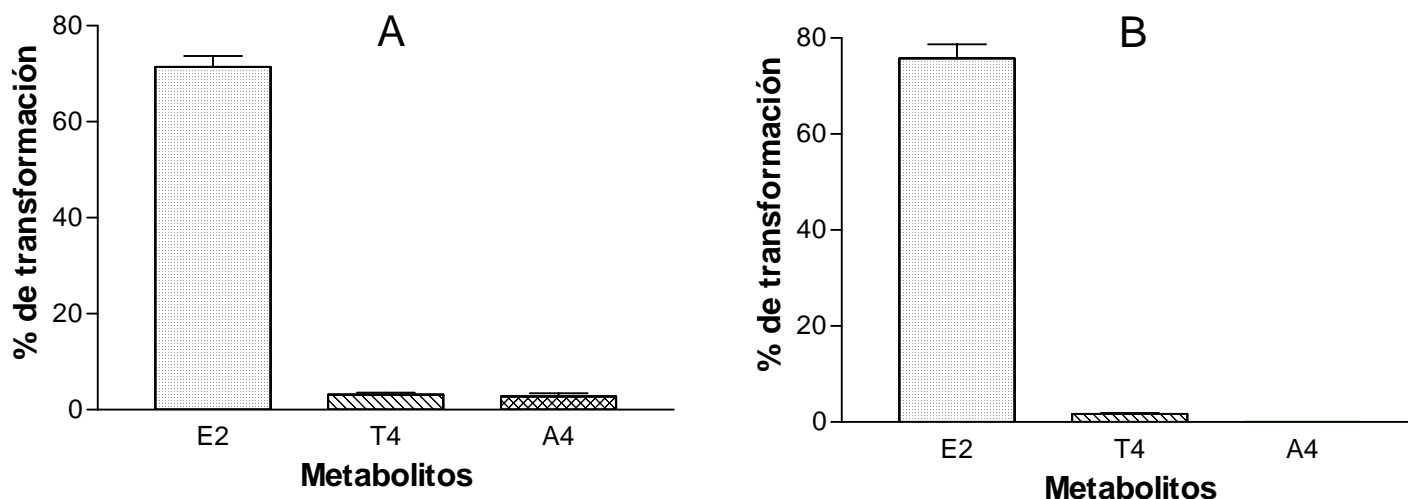
**Fig. 15.** Metabolismo de progesterona tritiada por los cisticercos de *T. solium*. El metabolismo produjo hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona. Las placas cromatográficas fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó en benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación del sustrato después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. OHP4: Hidroxiprogesterona. A4: Androstendiona. T4: Testosterona.

La figura 16 muestra que los cisticercos de *T. solium* son capaces de transformar 3H-DHEA en 3H-androstenediol (30.38%) y 3H-testosterona (4.0%). No se encontró androstenediona.



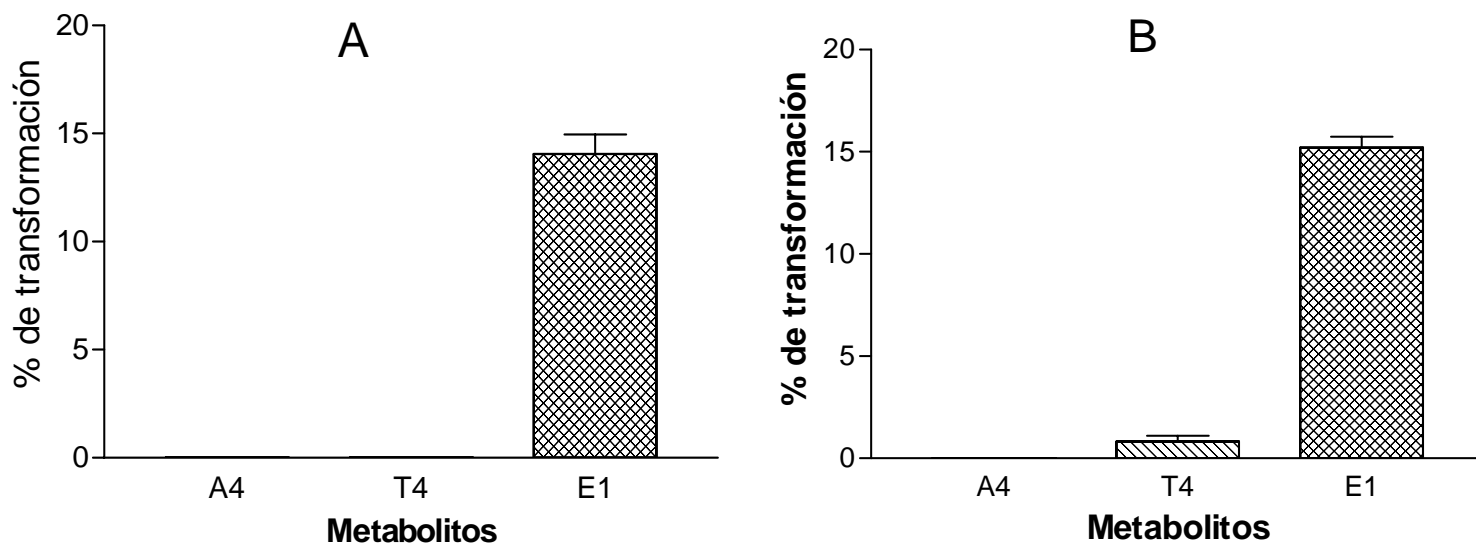
**Fig. 16.** Metabolismo de  $^3\text{H}$ -DHEA por los cisticercos de *T. solium*. Se produjo una importante cantidad de androstenediol y en una proporción más baja, testosterona. No se detectó androstenediona. Las placas cromatográficas fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó en benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje del sustrato transformado después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. Adiol: Androstendiol. A4: Androstendiona. T4: Testosterona.

La figura 17 muestra que los cisticercos de *T. solium* son capaces de transformar  $^3\text{H}$ -estrona en  $^3\text{H}$ -estradiol (71.42%), y  $^3\text{H}$ -testosterona (3.18).



**Fig. 17.** Metabolismo de la estrona radioactiva por el cisticerco de *T. solium*. Se produjo estradiol como el principal metabolito. Las placas cromatográficas fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó en benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación del sustrato después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. E2: Estradiol. T4: Testosterona. A4: Androstenediona.

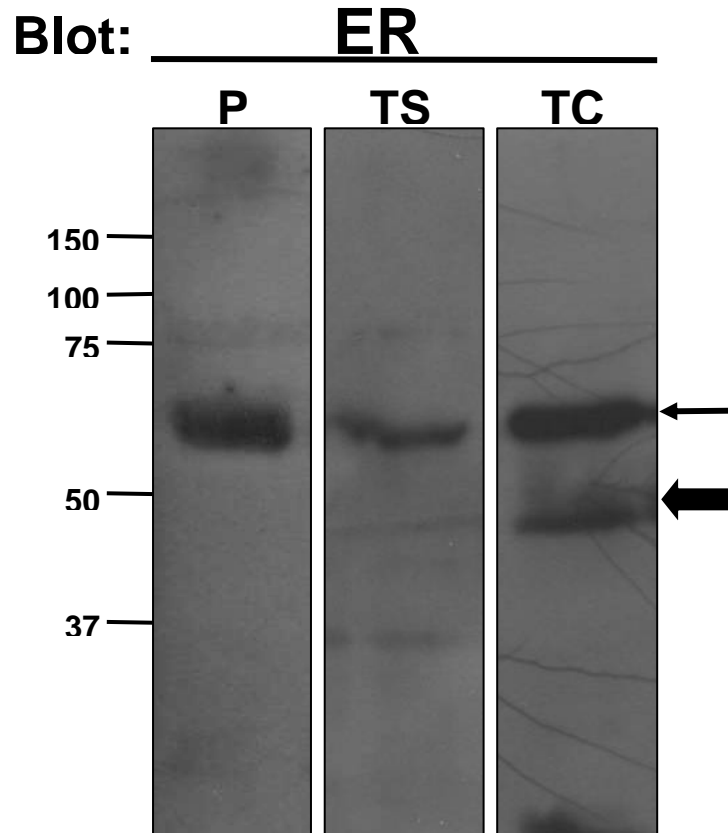
La figura 18 muestra que los cisticercos de *T. solium* son capaces de transformar  $^3\text{H}$ -estradiol en  $^3\text{H}$ -estrona (14.05%). No se encontró androstenediona ni testosterona.



**Fig. 18.** Metabolismo del estradiol radioactivo por los cisticercos de *T. solium*. Se produjo estrona como el principal metabolito. Las placas de cromatografía fueron desarrolladas en diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v) (Panel A) ó en benceno-metanol (9:1 v/v) (Panel B). Los resultados se expresan como el porcentaje de sustrato transformado después de 3h de incubación a 36°C. Los datos son la media  $\pm$  DS de 3 diferentes experimentos. A4: Androstenediona. T4: Testosterona. E1: Estrona.

### 5.2.2. Determinación de la presencia de receptores a andrógenos y estrógenos

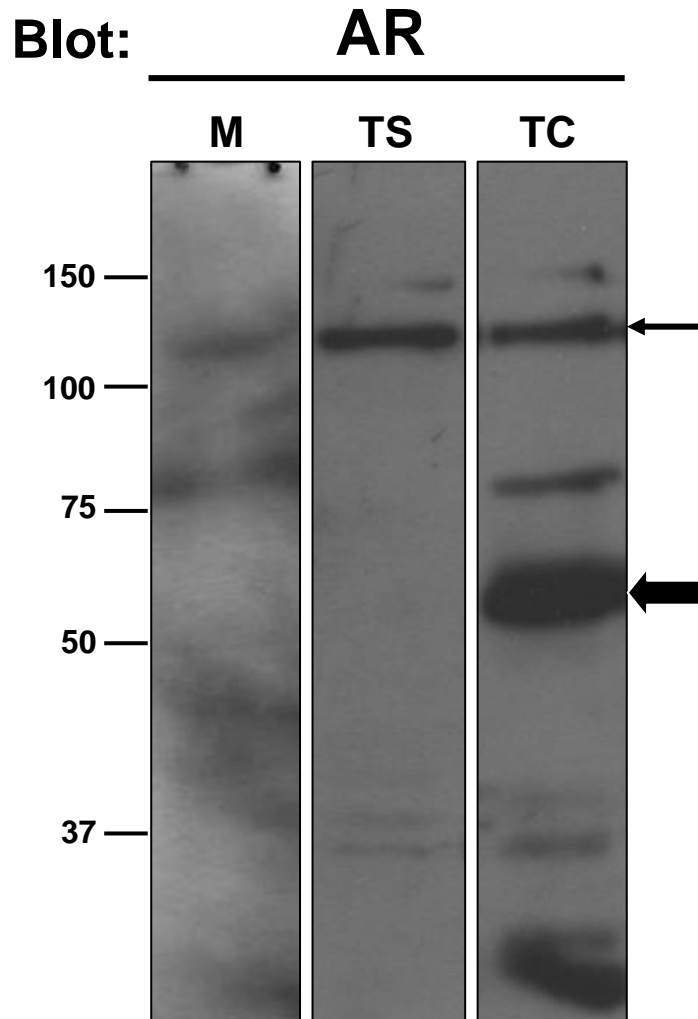
La figura 19 muestra la presencia del receptor  $\alpha$  a estrógenos en cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium* y en placenta humana como control, mediante la técnica de Western Blot.



**Fig. 19.** Inmunodetección del receptor  $\alpha$  de estrógenos en cisticercos de *Taenia solium* (TS) y de *Taenia crassiceps* (TC). 50  $\mu$ g de extractos proteícos totales se separaron en un SDS-PAGE y posteriormente se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-receptor  $\alpha$  de estrógenos. Un extracto de placenta humana (P) fue usado como control positivo. La flecha indica el peso del receptor. Nótese que existe degradación del receptor en *Taenia crassiceps*, señalada por una flecha de bloque. Los números a la izquierda señalan los marcadores de peso molecular en kDa.



La figura 20 muestra la presencia del receptor a andrógenos en cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium* y en músculo de cerdo como control, demostrada por la técnica de Western Blot.

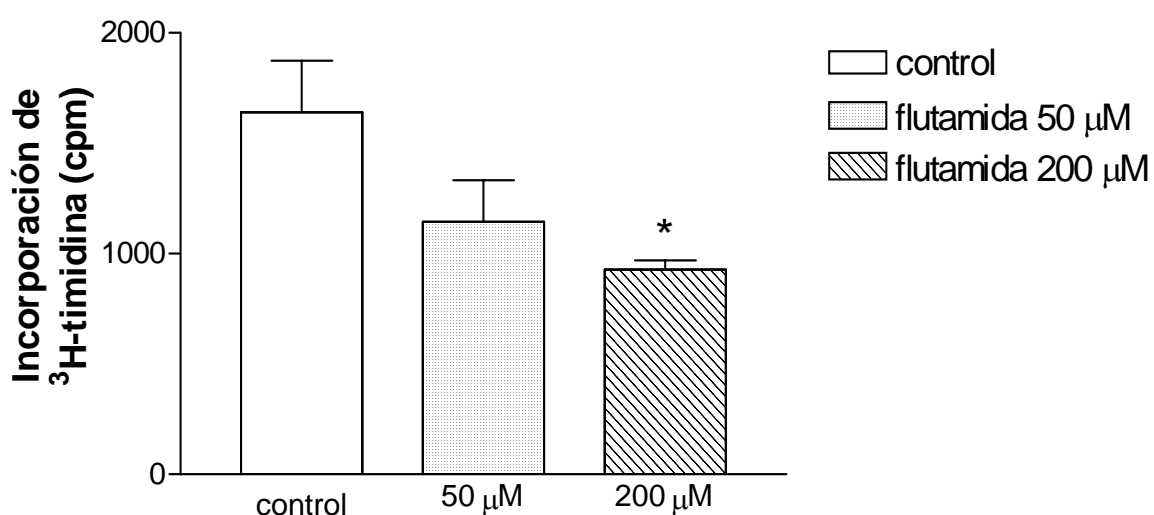


**Fig. 20.** Inmunodetección del receptor a andrógenos en cisticercos de *Taenia solium* (TS) y de *Taenia crassiceps* (TC). 50  $\mu$ g de extractos proteicos totales se separaron en un SDS-PAGE y posteriormente se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-receptor a andrógenos. Un extracto de músculo de cerdo (M) fue usado como control positivo. La flecha indica el peso esperado para el receptor. Nótese que existe una importante degradación del receptor en *Taenia crassiceps*, que es señalada con una flecha de bloque. Los números a la izquierda señalan los marcadores de peso molecular en kDa.

### 5.2.3. Efecto de la administración de antiandrógenos y antiestrógenos *in vitro*.

#### 4.2.3.1. Antiandrógenos

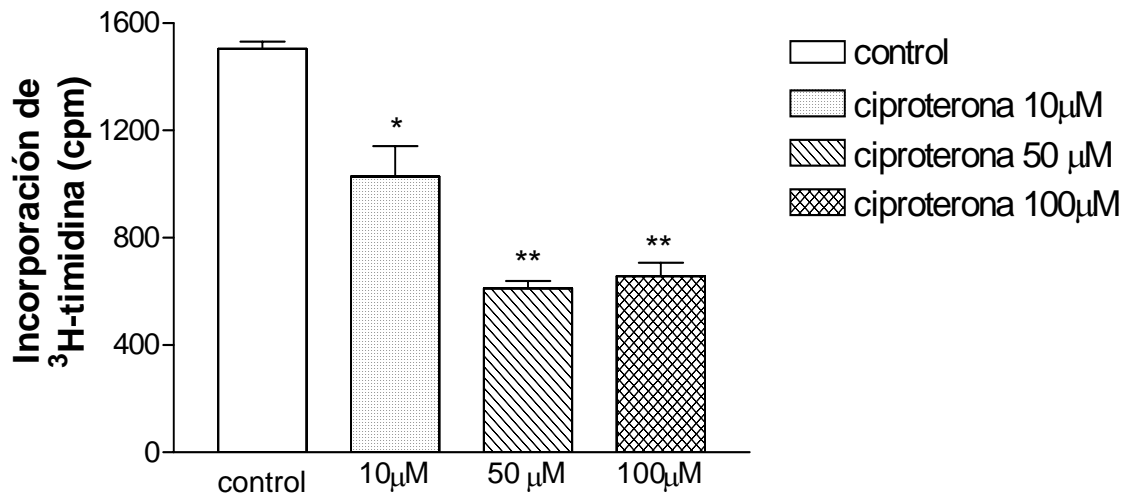
La figura 21 muestra la curva dosis-respuesta a flutamida, en cisticercos de *Taenia solium* cultivados con diferentes dosis de flutamida en presencia de  $^3\text{H}$ -timidina. Se observa una relación dosis dependiente, ya que a mayor dosis del fármaco, menor incorporación de timidina, lo que sugiere una menor proliferación celular.



**Fig. 21.** Efecto de la flutamida sobre la incorporación de timidina en *Taenia solium*. Los parásitos fueron cultivados por 24h en presencia o ausencia de 50 o 200  $\mu\text{M}$  de flutamida. Se encontró una reducción en la incorporación de timidina, dependiente de la dosis del antiandrógeno. Los datos muestran la media  $\pm$  DS de dos diferentes experimentos.

\*  $p < 0.05$  vs el control.

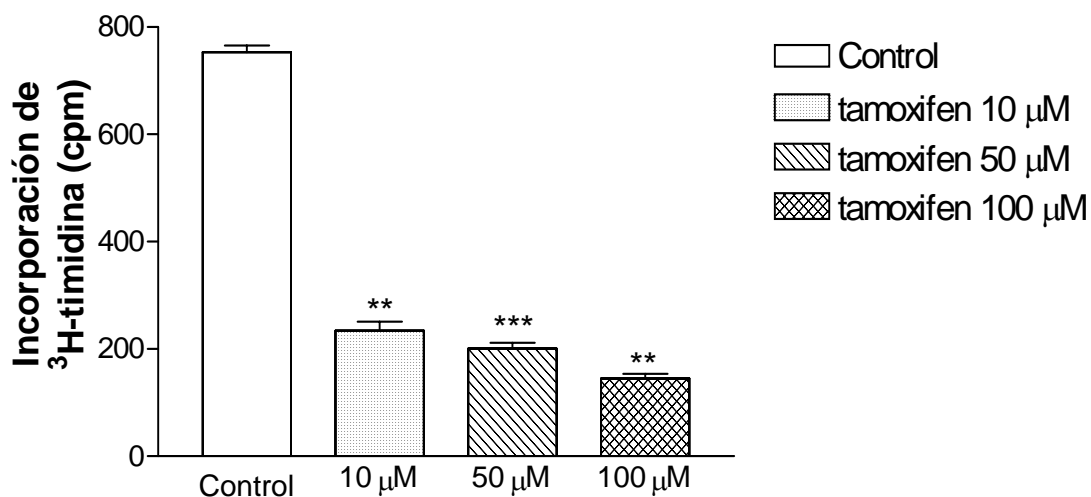
La figura 22 muestra la curva dosis-respuesta al acetato de ciproterona, donde se observa una relación dosis dependiente, ya que al aumentar la dosis del antiandrógeno, disminuye la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina a los cisticercos de *Taenia solium*.



**Fig. 22.** Efecto del acetato de ciproterona sobre la incorporación de timidina en *Taenia solium*. Los parásitos fueron cultivados en presencia o ausencia de 10, 50 ó 100 μM de ciproterona por 24 h. Se encontró una reducción de la incorporación de timidina, dependiente de la dosis del antiandrógeno. Los datos muestran la media  $\pm$  DS de dos diferentes experimentos. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs el control.

### 5.2.3.2. Antiestrógenos

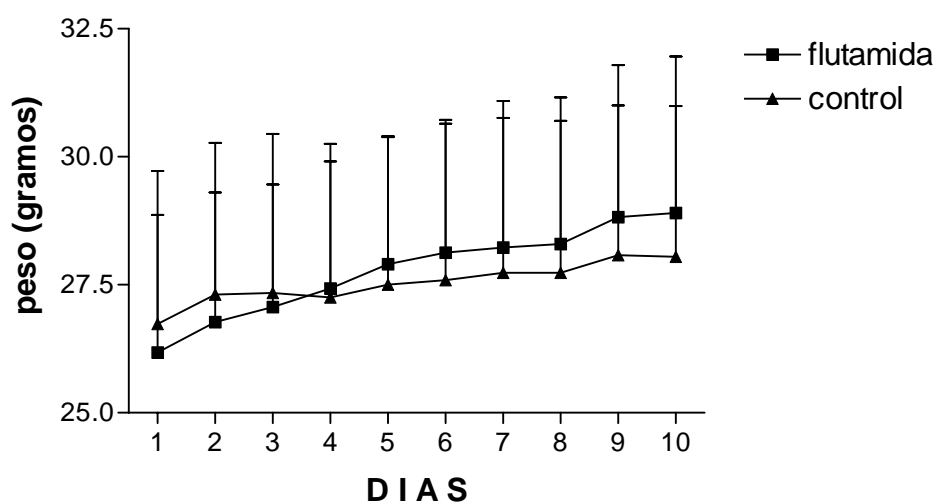
La figura 23 muestra la curva dosis-respuesta a tamoxifen, en los cisticercos de *Taenia solium*, donde se observa una relación dosis dependiente. Se aprecia que al aumentar la dosis del antiestrógeno, disminuye significativamente la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los cisticercos de *Taenia solium*.



**Fig. 23.** Efecto del tamoxifen sobre la proliferación celular de *T. solium*. Los parásitos fueron cultivados en presencia o ausencia de 10, 50 ó 100 $\mu\text{M}$  de tamoxifen por 24h. Se encontró una reducción significativa en la incorporación de timidina, dependiente de la dosis de tamoxifen. Los datos muestran la media  $\pm$  DS de dos diferentes experimentos. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs el control.

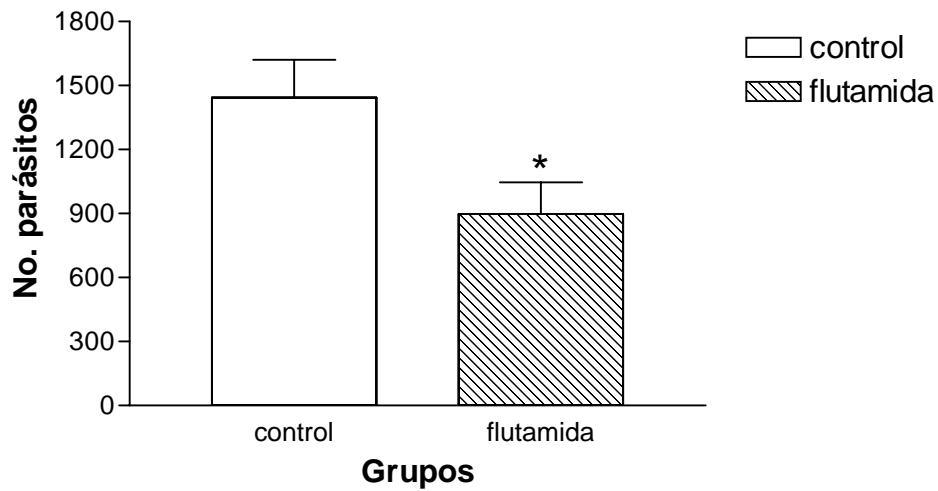
### 5.3. Efecto de la administración *in vivo* de flutamida

La figura 24 muestra la curva del peso corporal de ratones hembras parasitadas con *T. crassiceps*, del grupo control y del grupo tratado con flutamida. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.



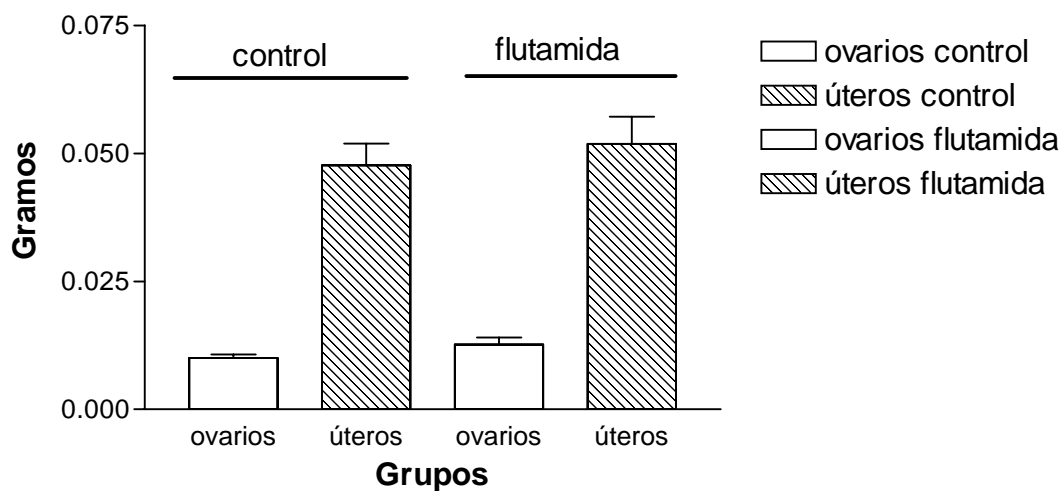
**Fig. 24.** Evolución del peso corporal de ratones hembras control y de tratadas con flutamida por 10 días. Los datos muestran la media  $\pm$  DS de dos diferentes experimentos. n=10 en cada grupo.

La figura 25 muestra el efecto de la flutamida sobre la reproducción del cisticerco de *Taenia crassiceps* en la cavidad abdominal de ratones hembra con 10 semanas de parasitadas. Se observa una diferencia del 38% en el número de cisticercos en el grupo tratado con flutamida.



**Fig. 25.** Número de parásitos después de 10 días de administración de flutamida o de vehículo. La flutamida redujo significativamente este parámetro. Los datos muestran la media  $\pm$  DS de dos diferentes experimentos. n=10 en cada grupo. \*  $p < 0.05$ .

La figura 26 muestra el peso de los ovarios y del útero de las hembras tratadas con flutamida y las del grupo control. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.



**Fig. 26.** Peso de los ovarios y úteros de las ratones hembras tratadas con flutamida o con vehículo. Los datos expresan la media  $\pm$  DS de dos diferentes experimentos. n=10 en cada grupo.

## 6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que los metacéstodos tanto de *Taenia solium* como de *Taenia crassiceps* tienen la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas sexuales a partir de diferentes precursores hormonales. Esto significa que los parásitos tienen la maquinaria enzimática necesaria para transformar precursores esteroideos en sus diferentes metabolitos.

La incubación con progesterona tritiada produjo hidroxiprogesterona, androstendiona y testosterona, lo que sugiere la presencia y actividad de una serie de enzimas similares a la  $17\alpha$ -hidroxilasa, a la  $17,20$  liasa y a la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) tanto en los cisticercos de *Taenia solium* como en los de *Taenia crassiceps*. Estas enzimas son parte de la ruta  $\Delta 4$  de la vía esteroidogénica, que parece estar activa en los cisticercos.

La incubación de los cisticercos con DHEA tritiada produjo androstendiol y testosterona, pero no androstendiona, lo que sugiere la presencia y actividad de enzimas similares a la  $17\beta$ -HSD y a la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^{5-4}$  isomerasa ( $3\beta$ -HSD). El hecho de que no encontráramos androstendiona cuando la DHEA fue el precursor, sugiere la existencia de 2 enzimas  $3\beta$ -HSD diferentes, una que transforma androstenediol en testosterona, presente en los cisticercos y otra que transforma DHEA en androstendiona, al parecer ausente en los cisticercos. El hecho de que los cisticercos no produzcan androstendiona a partir de DHEA, sugiere también que está incompleta la vía esteroidogénica en ambos parásitos. Previamente, Gómez y colaboradores, encontraron que *Taenia crassiceps* no transforma pregnenolona en ningún metabolito (Gomez et al., 2000). Esto, junto con nuestros hallazgos sugieren de manera clara la ausencia de las enzimas que convierten esteroides de la ruta  $\Delta 5$  en esteroides de la ruta  $\Delta 4$ , excepto para el caso de la formación de testosterona a partir de androstendiol.

La interconversión entre estradiol y estrona, sugiere que los cisticercos tienen actividad de una enzima similar a la  $17\beta$ -HSD en ambos sentidos (oxidativo y reductivo), con preferencia por la vía reductiva. Gómez y colaboradores,



encontraron que *Taenia crassiceps* tiene la capacidad de transformar androstenediona en testosterona, pero no viceversa, lo que sugiere actividad de la enzima  $17\beta$ -HSD, con preferencia por la vía reductiva (Gomez et al., 2000), de manera similar a nuestros hallazgos para la producción de estradiol. Probablemente el cisticerco necesita producir esteroides activos para crear un micro-ambiente propicio para un crecimiento y desarrollo óptimos.

En este sentido, Morales y colaboradores, encontraron que la castración de los cerdos machos, incrementa la prevalencia de la cisticercosis que pasa de un 23 a un 50 %. La gestación es una condición que también incrementa la prevalencia, de un 28 a un 59%. De tal manera que las condiciones endócrinas caracterizadas por bajos niveles de andrógenos ó altos niveles de hormonas femeninas, probablemente incrementan la susceptibilidad de los cerdos a la cisticercosis por *Taenia solium* (Morales et al., 2002), tal como se observa en ratones parasitados con *Taenia crassiceps* (Larralde et al., 1995).

Nuestros hallazgos indican que los cisticercos de *Taenia solium* pueden metabolizar la progesterona y formar diferentes metabolitos, así, en la hembra gestante, que tiene altos niveles de progesterona, el cisticerco podría tomar a esta hormona de la circulación y usarla para su propio beneficio (establecimiento, crecimiento, desarrollo), ya sea utilizando directamente a la hormona, vía su unión a un receptor específico, o bien, metabolizándola a subsiguientes metabolitos y haciendo uso de ellos. En este sentido, también podrían usar a la testosterona como sustrato para producir estrógenos.

Como lo indica la metodología de TLC, el blanco, es decir el medio de cultivo más el precursor que se procesó en las mismas condiciones que los grupos experimentales, se restó a los datos obtenidos en dichas muestras. El análisis estadístico mostró que los blancos fueron significativamente diferentes de los datos de las muestras que contenían cisticercos. Solamente la androstendiona encontrada en el metabolismo de la progesterona por *Taenia crassiceps* no fue significativamente diferente del control, sin embargo, el hecho de haber encontrado testosterona en dichos experimentos, sugiere fuertemente la presencia de la enzima 17, 20 liasa, necesaria para la formación de androstendiona a partir

de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona. Por lo tanto, es probable que la androstendiona haya sido rápidamente convertida a testosterona por el cisticerco de *Taenia crassiceps* y de ahí su escasa presencia en el ensayo.

En el presente trabajo sugerimos que son las enzimas presentes en los cisticercos las responsables de la transformación de precursores en metabolitos, sin embargo, cabe la posibilidad de que dichas enzimas en realidad pertenezcan al hospedero. Se ha reportado la presencia de proteínas del hospedero en el líquido del cisticerco de *Taenia crassiceps*, pero dichas proteínas no tienen un peso mayor a 32 kDa (Lamsam y McManus, 1990). El peso molecular de las enzimas de la vía esteroidogénica es más del doble, ya que oscila entre los 75 y los 80 kDa (Luu-The, 2001). En la hipótesis de que los cisticercos podrían incorporar las enzimas del hospedero, debería el parásito incorporar intactas todas las enzimas necesarias para procesos tan complejos como la síntesis de andrógenos y estrógenos a partir de progesterona y de DHEA, lo que supone la existencia de enzimas esteroidogénicas de las vías  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ , en los tejidos en los que se encuentra el parásito. Si suponemos que los parásitos toman prestadas las enzimas del hospedero, estas provendrían del músculo en el caso de *Taenia solium* y del peritoneo en el caso de *Taenia crassiceps* y no se han reportado tales enzimas en estos tejidos. Futuros experimentos pueden aclarar este punto.

Por otra parte sabemos que: 1) los cisticercos son capaces de producir testosterona a partir de androstenediona, 2) la flutamida, un fármaco que impide la unión de los andrógenos a su receptor, disminuye la incorporación de timidina en el cisticerco de *Taenia solium* y 3) el receptor a andrógenos está presente en los cisticercos de *Taenia solium*. Estos tres datos indican que la testosterona juega un papel importante en la biología de este parásito. Es posible entonces que el parásito utilice la producción endógena de testosterona para su propio desarrollo como lo hacen los embriones de aves y mamíferos, y que metabolice la testosterona del hospedero a estrógenos, lo que favorece su desarrollo, y al mismo tiempo inhiba la respuesta celular del hospedero hacia el parásito.

Tomados todos juntos, estos hallazgos indican que tanto *Taenia solium* como *Taenia crassiceps* son capaces de sintetizar hormonas esteroides en el estadio de

metacésto y por lo tanto, la enzima 17 $\beta$ -HSD y otras enzimas importantes de la vía esteroidogénica, estarían presentes en el parásito. La potencia biológica de los estrógenos y de los andrógenos es regulada por las enzimas 17 $\beta$ -HSD's, que son las enzimas clave y exclusivas, implicadas en la formación e inactivación de los esteroides sexuales, aunque difieren de manera marcada en su especificidad por el sustrato (Martel et al., 1992, Luu-The, 2001), además de que la actividad catalizada por cada tipo de 17 $\beta$ -HSD es unidireccional (El Alfy et al., 1999, Luu-The, 2001). Hasta la fecha, se han estudiado, aislado y caracterizado siete enzimas 17 $\beta$ -HSD: los tipos 1, 3, 5 y 7 catalizan la reacción reductiva, mientras que los tipos 2, 4 y 8 catalizan la reacción oxidativa (Luu-The, 2001). No sabemos si las enzimas presentes en los cisticercos son similares a las reportadas, pero futuros experimentos podrán aclarar este punto.

Tanto los andrógenos como los estrógenos están involucrados en la proliferación, la diferenciación y la maduración celular, entre otras funciones biológicas, en mamíferos y aves (George y Wilson, 1994).

Los resultados de estudios previos de nuestro laboratorio y los datos que son parte de esta tesis demostraron que los cisticercos de *Taenia solium* y de *Taenia crassiceps*, son capaces de sintetizar andrógenos y estrógenos (Gomez et al., 2000, Romano et al., 2003, Jiménez et al., 2004, Valdéz et al., 2005). Además nos interesó saber si estas hormonas están involucradas en la proliferación celular de los cisticercos, vía la unión a un receptor específico. Nuestros resultados indican que los fármacos flutamida y acetato de ciproterona, drogas que impiden la unión de los andrógenos con su receptor, inhiben la incorporación de timidina en los cisticercos de *Taenia solium*, de manera similar a lo encontrado en *Taenia crassiceps* (Romano et al., 2003). La flutamida por sí misma tiene actividad antiandrogénica, tanto *in vivo* como *in vitro*. El metabolito hidroxiflutamida es mucho más activo que la flutamida misma (Simard et al., 1986, Zuo et al., 2002), y esta última necesita de la presencia de hidroxilasas, que *in vivo* están presentes en el hígado. El hecho de que hayamos encontrado efecto de la flutamida sugiere dos posibilidades: 1) que el fármaco haya actuado como tal, sin ser transformado a otros metabolitos, o bien, 2) que el cisticerco tenga la capacidad de hidroxilar a

la flutamida y que por lo tanto ésta actúe al metabolizarse a otros compuestos en el parásito.

Si consideramos que en general, para que una hormona ejerza su efecto, debe unirse a un receptor, y que cuando se usaron sustancias que bloquean al receptor de andrógenos, encontramos una disminución en la incorporación de timidina, los resultados sugirieron fuertemente que el efecto visto es mediado por un receptor específico, que juega un papel importante en la vida de *Taenia solium*.

El tamoxifen, fármaco que impide la unión de los estrógenos a su receptor específico, también disminuye la proliferación celular en *Taenia solium*, y por lo tanto sugiere que también serían importantes los estrógenos para el parásito. Sin embargo este comportamiento es diferente a lo encontrado en los cisticercos de *Taenia crassiceps*, donde el tamoxifen no inhibió la proliferación celular (datos no publicados).

En este punto es necesario mencionar que para el desarrollo de estos experimentos, no se utilizó el ligando natural del receptor a andrógenos o a estrógenos, ya que la intención fué saber si los antiandrógenos y los antiestrógenos, impiden la unión de la hormona producida por los mismos cisticercos (Valdéz et al., 2005). Asimismo, es necesario recordar que los cisticercos fueron incubados primero en presencia de suero bovino fetal, de donde pueden tomar los precursores necesarios para la formación de la testosterona o el estradiol endógenos.

No sabemos con exactitud qué grupo celular está dejando de proliferar a causa de los antiandrógenos y los antiestrógenos en el cisticerco de *Taenia solium*, debido a limitaciones propias de la metodología. Pero experimentos hechos con la técnica histológica de autorradiografía a hormonas o antihormonas marcadas radioactivamente podrían aclarar este punto (Anderson y Greenwald, 1969). Al inyectar a la circulación *in vivo* el antiandrógeno o antiestrógeno marcado radioactivamente, éste difunde por todo el cuerpo del animal, en este caso el cisticerco y, al llegar a alguna célula blanco se une al receptor a esteroides y se acumula allí, tal como lo hacen las hormonas naturales (Simerly et al., 1990). La presencia de las antihormonas radioactivas se observa al identificar, por medio del

microscopio óptico, la acumulación de granos negros en la placa autorradiográfica que se impresionó al estar en contacto con el corte de tejido. Dicha placa autorradiográfica contiene una emulsión que consiste generalmente en cristales de bromuro de plata en gelatina. Las partículas beta emitidas por la antihormona tritiada ionizan a los cristales de plata; éstos son subsecuentemente reducidos durante el periodo de exposición (que puede durar desde 4 hasta 12 meses) y, de esta manera, se tornan visibles (Morrell y Pfaff, 1981). Se ha asumido que la captura nuclear y la retención de una hormona o antihormona es indicativa de la presencia de un sistema de receptores (Sheridan et al., 1981). El empleo de ésta técnica sería útil para conocer los grupos de células sensibles a las antihormonas. Reportes previos indican la presencia de ADN que codifica para el receptor a andrógenos en el cisticerco de *Taenia crassiceps* (Escobedo et al., 2004). Sin embargo, existen cambios post-transcripcionales que pueden conducir a que la proteína nunca se exprese. En este trabajo, nos avocamos a la búsqueda de las proteínas (receptores a andrógenos y estrógenos) mediante la técnica de Western Blot y fuimos capaces de localizarlas en ambas especies de cisticercos estudiados. De tal manera que estos hallazgos confirman que el ARNm encontrado por Escobedo y colaboradores para *Taenia crassiceps* llega a producir la proteína del receptor de andrógenos, y por otra parte, representan el primer reporte de la existencia de estos receptores en los cisticercos de *Taenia solium*. Finalmente, ya sabiendo que los cisticercos son capaces de producir hormonas esteroides, que tienen receptores a dichas hormonas y que éstos pueden ser bloqueados por fármacos específicos *in vitro*, cabía preguntarse si la flutamida también podría bloquear la proliferación de *Taenia crassiceps in vivo*. Después de inyectar flutamida vía s. c., durante 10 días, a ratones hembras de 10 semanas de parasitadas con cisticercos de *Taenia crassiceps*, los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en la carga parasitaria en los ratones tratados, en comparación con aquellos a los que sólo se les inyectó vehículo. El tratamiento no afectó el peso corporal, ni el peso del útero de los animales tratados. Este órgano fue escogido por dos razones: 1) debido a que previamente se reportó que tiene receptores a andrógenos (Terada et al., 1990, Tuckerman et

al., 2000), y por lo tanto, serviría como control para evaluar posibles repercusiones sobre el animal, y 2) se reportó previamente que el peso de los úteros de las hembras parasitadas, aumentaba después de 8 semanas de infección (Larralde et al., 1995). Además, los andrógenos estimulan la hipertrofia e inducen el crecimiento del miometrio en ratas ovariectomizadas, mediante la expresión de una serie de genes involucrados en la remodelación tisular, en la señalización celular y en el metabolismo. Estos genes estimulados se sobreponen con los estimulados por estrógenos, pero otros son específicos (Nantermet et al., 2005). El tratamiento con flutamida tampoco pareció afectar el estado general de los animales, ya que siempre se mostraron dinámicos y con buen apetito. Un punto particular que llama la atención es: si los animales tratados con flutamida tienen menor carga parasitaria, ¿Porqué no hay diferencias en el peso corporal con respecto al grupo control? Desafortunadamente, las hembras de los diferentes grupos no fueron pesadas después de remover, una vez sacrificadas, los parásitos de la cavidad abdominal, lo que podría haber contestado esta pregunta. Sin embargo, la diferencia, si la hay, es de pocos gramos, y ésta pudo haber quedado enmascarada con las diferencias individuales en el peso corporal de los animales. No sabemos qué sucede con los cisticercos de la cavidad abdominal de los ratones, aunque suponemos que podría existir: a) un proceso de apoptosis ó b) una ausencia de proliferación ó c) una combinación de ambos eventos. Si sólo existiera una detención de la proliferación, esperaríamos que la cantidad de cisticercos al principio y al final del tratamiento fuera similar. Sin embargo, la cantidad de cisticercos hallados después del tratamiento, es incluso menor a la encontrada por Larralde y colaboradores en hembras con 8 semanas de parasitadas ( $998.9 \pm 519.22$ ) (Larralde et al., 1995), lo que hace pensar en un proceso de apoptosis, sin que esto descarte la posibilidad de que la proliferación también se encuentre afectada. Futuros experimentos donde se utilicen marcadores de apoptosis podrían aclarar este punto.

El hecho de que exista una disminución de la carga parasitaria en los animales tratados, en conjunto con los resultados *in vitro* y la presencia de receptores a

esteroides en los cisticercos, permiten pensar en una posible manipulación hormonal o antihormonal para el tratamiento de la cisticercosis.

esteroides en los cisticercos, permiten pensar en una posible manipulación hormonal o antihormonal para el tratamiento de la cisticercosis.

## 7. CONCLUSIONES

### 7.1. Cisticerco de *Taenia crassiceps*

- Es capaz de transformar progesterona en:  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, androstenediona, testosterona y estradiol, lo que sugiere que tiene actividad de  $17\alpha$ -hidroxilasa, 17, 20 liasa,  $17\beta$ -HSD y aromatasa.
- Este cisticerco también es capaz de transformar DHEA en androstenediol y testosterona lo que sugiere que tiene actividad de  $17\beta$ -HSD y  $3\beta$ -HSD.
- Por otra parte, también es capaz de interconvertir estradiol y estrona, lo que sugiere que tiene actividad de  $17\beta$ -HSD en ambos sentidos, aunque existe una preferencia por el sentido reductivo, es decir, por la conversión de estrona en estradiol.

### 7.2. Cisticerco de *Taenia solium*

- Este cisticerco es capaz de transformar progesterona en:  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona, lo que sugiere que tiene actividad de  $17\alpha$ -hidroxilasa; 17,20 liasa y  $17\beta$ -HSD.
- También es capaz de transformar DHEA en androstenediol y testosterona, lo que sugiere que tiene actividad de  $17\beta$ -HSD y  $3\beta$ -HSD.
- Finalmente, los resultados indican que este cisticerco también es capaz de interconvertir estradiol y estrona, lo que sugiere que tiene actividad de  $17\beta$ -HSD, en ambos sentidos, aunque existe una clara tendencia por utilizar el sentido reductivo, es decir, convertir estrona en estradiol.



- Tanto los cisticercos de *Taenia solium* como los de *Taenia crassiceps* poseen receptores a andrógenos y a estrógenos.

De los resultados obtenidos se puede concluir que tanto los antiandrógenos flutamida como acetato de ciproterona, así como el antiestrógeno tamoxifen, son capaces de disminuir la captación de timidina, lo que estaría indicando que existe una disminución en la proliferación celular. Es decir, las células que forman al parásito ya no se están renovando, o lo hacen a un ritmo más lento. Esto sugiere que tanto los andrógenos como los estrógenos tienen una importante participación en el crecimiento y desarrollo del parásito.

### **7.3. Administración *in vivo* de flutamida**

Los resultados obtenidos indican que en hembras con 10 semanas de parasitadas, 10 días de tratamiento con flutamida disminuyen la carga parasitaria de *Taenia crassiceps*, sin afectar el peso del animal, ni el de sus ovarios y útero.

## 8. LITERATURA CITADA

Al Qarawi, A.A. 2005. Infertility in the dromedary bull: a review of causes, relations and implications. *Anim Reprod. Sci.* 87:73-92.

Al Qarawi, A.A., H.M.Omar, H.A.Abdel-Rahman, S.A.El Mougny, y M.S.El Beley. 2004. Trypanosomiasis-induced infertility in dromedary (*Camelus dromedarius*) bulls: changes in plasma steroids concentration and semen characteristics. *Anim Reprod. Sci.* 84:73-82.

Anderson, C.H. y G.S.Greenwald. 1969. Autoradiographic analysis of estradiol uptake in the brain and pituitary of the female rat. *Endocrinology* 85:1160-1165.

Ansar, A.S., W.J.Penhale, y N.Talal. 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* 121:531-551.

Azuma, T. 1968. A study of the parasitizing condition of *Trichomona vaginalis* with special reference to the relationship between estrogen and the growth of *Trichomona vaginalis*. *J. Jpn. Obstet. Gynecol.*C50.

- Barker, G.C., J.G.Mercer, H.H.Rees, y R.E.Howells. 1991. The effect of ecdysteroids on the microfilarial production of *Brugia pahangi* and the control of meiotic reinitiation in the oocytes of *Dirofilaria immitis*. *Parasitol. Res.* 77:65-71.
- Barrón-González, A., J.Arias-Martínez, y I.Castro-Romero. 2001. Antiestrogens: mechanism of action and clinical applications. *Salud Pública de México* 43:1-7.
- Barthelemy, M., C.Gabrion, y G.Petit. 2004. Reduction in testosterone concentration and its effect on the reproductive output of chronic malaria-infected male mice. *Parasitol. Res.* 93:475-481.
- Beato, M., P.Herrlich, y G.Schutz. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857.
- Beckage, N.E. 1991. Host-parasite hormonal relationships: a common theme? *Exp. Parasitol.* 72:332-338.
- Beyer, C. y O.González-Flores. 2000. Mecanismos moleculares de acción de las hormonas esteroides en mamíferos. *En: Genética y biomedicina molecular*. P.Gariglio, E.Orozco, L.Orozco, R.López Revilla, y V.Madrid, editors. LIMUSA-NORIEGA EDITORES, Mexico. 253-265.
- Briggs, M.H. 1972. Metabolism of steroid hormones by schistosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 280:481-485.

Brinkmann, A.O., P.Klaasen, G.G.Kuiper, J.A.van der Korput, J.Bolt, W.de Boer, A.Smit, P.W.Faber, H.C.van Rooij, v.K.Geurts, y . 1989. Structure and function of the androgen receptor. *Urol. Res.* 17:87-93.

Brodie, A.M.H. 1983. Biosynthesis, metabolism, and secretion of ovarian steroid hormones. *En: Comprehensive endocrinology: The ovary.* G.B.Serra, editor. Raven press, New York. 1-17.

Brouwers, J.F., J.J.Van Hellemond, L.M.van Golde, y A.G.Tielens. 1998. Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96:49-58.

Bundy, D.A. 1988. Gender-dependent patterns of infections and disease. *Parasitol. Today* 4:186-189.

Catelli, M.G. y J.Mester. 1983. The mechanism of action and effects of ovarian steroids. *En: Comprehensive endocrinology: The ovary.* G.B.Serra, editor. Raven press, New York. 19-43.

Clark, J.H., W.T.Schrader, y B.T.O'Malley. 1992. Mechanisms of action of steroid hormones. *En: Williams Textbook of Endocrinology.* J.D.Wilson y D.W.Foster, editors. Saunders Company, Philadelphia. 35-90.

Cleator, M., C.J.Delves, R.E.Howells, y H.H.Rees. 1987. Identity and tissue localization of free and conjugated ecdysteroids in adults of *Dirofilaria immitis* and *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:93-105.

Cowan, B.D. 1997. Steroid Biosynthesis. *En: Clinical Reproductive Medicine.*  
B.D.Cowan y D.B.Seifer, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 11-20.

Csaba, G. 1980. Phylogeny and ontogeny of hormone receptors: the selection theory of receptor formation and hormonal imprinting. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 55:47-63.

Dauvois, S. y M.G.Parker. 1993. Mechanism of action of hormone antagonists. *En: Steroid hormone action. Frontiers in molecular biology.* John Willey and sons, USA.

de Aluja, A. y G.Vargas. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28:65-77.

De Loof, A. y R.Huybrechts. 1998. "Insects do not have sex hormones": a myth? *Gen. Comp Endocrinol.* 111:245-260.

Delvalle, B. 1989. Larvae of *Taenia crassiceps* (Cestoda): host specificity and localisation. *Parasitol. Res.* 76:181-182.

Díaz-Chico, B. y D.Navarro. 1996. Receptores hormonales nucleares. *En: Tratado de Endocrinología Básica y Clínica*. J.A.F.Tresguerres, E.Aguilar, J.Devesa, y B.Moreno, editors. Síntesis, Madrid. 65-90.

Dorais, F.J. y G.W.Esch. 1969. Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* 25:395-398.

Doumit, M.E., D.R.Cook, y R.A.Merkel. 1996. Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells in vitro. *Endocrinology* 137:1385-1394.

Edwards, D.P. 2000. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 5:307-324.

El Alfy, M., V.Luu-The, X.F.Huang, L.Berger, F.Labrie, y G.Pelletier. 1999. Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology* 140:1481-1491.

Enmark, E. y J.A.Gustafsson. 1999. Oestrogen receptors - an overview. *J. Intern. Med.* 246:133-138.

Escobedo, G., C.Larralde, A.Chavarria, M.A.Carbon, y J.Morales-Montor. 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* 90:1235-1244.

Escobedo, G., C.W.Roberts, J.C.Carrero, y J.Morales-Montor. 2005. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21:588-593.

Estevez Carrizo, F. 2001. Hormonoterapia del cáncer de próstata. Farmacología clínica. *Revista Médica del Uruguay* 17:10-16.

Evershed, R.P., J.G.Mercer, y H.H.Rees. 1987. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of ecdysteroids. *J. Chromatogr.* 390:357-369.

Feldman, D., Y.Do, A.Burshell, P.Stathis, y D.S.Loose. 1982. An estrogen-binding protein and endogenous ligand in *Saccharomyces cerevisiae*: possible hormone receptor system. *Science* 218:297-298.

Fleming, M.W. 1985. *Ascaris suum*: role of ecdysteroids in molting. *Exp. Parasitol.* 60:207-210.

Ford, L.C., H.A.Hammill, R.J.DeLange, D.A.Bruckner, F.Suzuki-Chavez, K.L.Mickus, y T.B.Lebherz. 1987. Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of antihormones. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156:1119-1121.

Freeman, R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40:969-990.

Gaillard-Moguilewsky, M. 1991. Pharmacology of antiandrogens and value of combining androgen suppression with antiandrogen therapy. *Urology* 37:5-12.

Garcia, H.H. y O.H.Del Brutto. 2000. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14:97-119, ix.

George, F.W. y J.D.Wilson. 1994. Sex determination and differentiation. *En: Physiology of Reproduction*. E.Knobil y J.D.Neill, editors. Raven Press, New York. 3-28.

Gerisch, B., C.Weitzel, C.Kober-Eisermann, V.Rottiers, y A.Antebi. 2001. A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Dev. Cell* 1:841-851.



Gissendanner, C.R., K.Crossgrove, K.A.Kraus, C.V.Maina, y A.E.Sluder. 2004. Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 266:399-416.

Gomez, Y., R.A.Valdez, C.Larralde, y M.C.Romano. 2000. Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cisticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74:143-147.

Green, S., P.Walter, V.Kumar, A.Krust, J.M.Bornert, P.Argos, y P.Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.

Grogl, M., J.J.Estrada, G.MacDonald, y R.E.Kuhn. 1985. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J. Parasitol.* 71:433-442.

Grossman, C.J. 1984. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr. Rev.* 5:435-455.

Gye, M.C. y S.Ohsako. 2003. Effects of flutamide in the rat testis on the expression of occludin, an integral member of the tight junctions. *Toxicol. Lett.* 143:217-222.

Hammill, H.A., R.J.DeLange, K.L.Mickus, F.Suzuki-Chavez, y L.C.Ford. 1985. Dihydrotestosterone and estradiol receptors in *Trichomonas vaginalis*. *Recent. Adv. Chemother.* 1:263-264.

Hawk, M.W., K.Shahlaie, K.D.Kim, y J.H.Theis. 2005. Neurocysticercosis: a review. *Surg. Neurol.* 63:123-132.

Heinlein, C.A. y C.Chang. 2001. Role of chaperones in nuclear translocation and transactivation of steroid receptors. *Endocrine* 14:143-149.

Heinlein, C.A. y C.Chang. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr. Rev.* 23:175-200.

Hirota, K., T.Gomi, R.Kishimoto, M.Iguchi, K.Hayakawa, y H.Nakagawa. 1981. Androgen receptor in human placental villi. *J. Biochem. (Tokyo)* 89:153-160.

Hood, T.E., E.J.Calabrese, y B.M.Zuckerman. 2000. Detection of an estrogen receptor in two nematode species and inhibition of binding and development by environmental chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 47:74-81.

Horie, K., K.Takakura, K.Imai, S.Liao, y T.Mori. 1992. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium. *Hum. Reprod.* 7:1461-1466.

Hoshi, H., Y.Kamata, y T.Uemura. 2003. Effects of 17beta-estradiol, bisphenol A and tributyltin chloride on germ cells of *Caenorhabditis elegans*. *J. Vet. Med. Sci.* 65:881-885.

Huerta, L., L.I.Terrazas, E.Sciutto, y C.Larralde. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J. Parasitol.* 78:471-476.

Huerta, M., A.S.de Aluja, G.Fragoso, A.Toledo, N.Villalobos, M.Hernandez, G.Gevorkian, G.Acerro, A.Diaz, I.Alvarez, R.Avila, C.Beltran, G.Garcia, J.J.Martinez, C.Larralde, y E.Sciutto. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20:262-266.

Jeffcoate, I.A., G.Fishwick, K.Bairden, J.Armour, y P.H.Holmes. 1990. Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: the role of prolactin. *Res. Vet. Sci.* 48:295-300.

Jeng, S.S., W.C.Wan, y C.F.Chang. 1978. Existence of an estrogen-like compound in the ovary of the shrimp *Parapenaeus fissurus*. *Gen. Comp Endocrinol.* 36:211-214.

Jensen, E. 1962. On the mechanism of estrogen action. *Perspect. Biol. Med.* 6:47-59.

Jiménez, P., R.A.Valdéz, A.S.de Aluja, y M.C.Romano. 2004. The  $\Delta^4$  steroidogenic pathway is present in *Taenia solium* cysticerci. *12 th International Congress of Endocrinology.*

Jong-Brink, M., M.M.Elsaadany, y H.H.Boer. 1988. *Trichobilharzia ocellata*: interference with endocrine control of female reproduction of *Lymnaea stagnalis*. *Exp. Parasitol.* 65:91-100.

Jordan, V.C., M.M.Collins, L.Rowsby, y G.Prestwich. 1977. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J. Endocrinol.* 75:305-316.

Kemppainen, J.A., M.V.Lane, M.Sar, y E.M.Wilson. 1992. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *J. Biol. Chem.* 267:968-974.

Kim, H.S., J.H.Shin, H.J.Moon, T.S.Kim, I.H.Kang, J.H.Seok, I.Y.Kim, K.L.Park, y S.Y.Han. 2002. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol. Sci.* 67:52-62.

Kuiper, G.G., B.Carlsson, K.Grandien, E.Enmark, J.Haggblad, S.Nilsson, y J.A.Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.

Kuiper, G.G., E.Enmark, M.Pelto-Huikko, S.Nilsson, y J.A.Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:5925-5930.

Kurzchalia, T.V. y S.Ward. 2003. Why do worms need cholesterol? *Nat. Cell Biol.* 5:684-688.

Labrie, F. 1993. Mechanism of action and pure antiandrogenic properties of flutamide. *Cancer* 72:3816-3827.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lamsam, S. y D.P.McManus. 1990. Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 101 Pt 1:115-125.

Larralde, C., J.Morales, I.Terrazas, T.Govezensky, y M.C.Romano. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52:575-580.

Liang, T., J.L.Tymoczko, K.M.B.Chan, S.C.Hung, y S.Liao. 1977. Androgen action: Receptors and rapid responses. *En: Androgens and antiandrogens*. L.Martini y M.Motta, editors. Raven press, New York. 77-103.

Lin, Y.C., Y.Rikihisa, H.Kono, y Y.Gu. 1990. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniaeformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Exp. Parasitol.* 70:344-352.

Lindblom, T.H., G.J.Pierce, y A.E.Sluder. 2001. A C. elegans orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. *Curr. Biol.* 11:864-868.

Luu-The, V. 2001. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 76:143-151.

Mainwaring, W.I.P. 1979. The androgens. *En: Reproduction in mammals: Mechanisms of hormone action.* C.R.Austin y R.V.Short, editors. Cambridge University press, Cambridge. 117-156.

Maizels, R.M., A.Balic, N.Gomez-Escobar, M.Nair, M.D.Taylor, y J.E.Allen. 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201:89-116.

Maizels, R.M. y M.Yazdanbakhsh. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3:733-744.

Majundar, T.K., E.J.Parish, y L.W.Bone. 1987. Steroid analogs inhibit hormone binding by an extract from *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda). *Comp Biochem. Physiol B* 88:81-84.

Marshall, A.J. y W.D.Williams. 1985. Zoología de invertebrados. Reverté, S.A, Madrid.

Martel, C., E.Rheaume, M.Takahashi, C.Trudel, J.Couet, V.Luu-The, J.Simard, y F.Labrie. 1992. Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41:597-603.

McCormick, P.D., A.J.Razel, T.C.Spelsberg, y C.B.Coulam. 1981. Evidence for an androgen receptor in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140:8-13.

McKellar, Q.A. 1993. Interactions of *Ostertagia* species with their bovine and ovine hosts. *Int. J. Parasitol.* 23:451-462.

McKenna, N.J., R.B.Lanz, y B.W.O'Malley. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344.

McLeod, D.G. 1993. Antiandrogenic drugs. *Cancer* 71:1046-1049.

Mehlhorn, H. y G.Piekarsi. 1993. Fundamentos de parasitología. *En: Parásitos del hombre y de los animales domésticos.* O.D.Torres Quevedo, editor. Acribia, Madrid.

Mendis, A.H., H.H.Rees, y T.W.Goodwin. 1984. The occurrence of ecdysteroids in the cestode, *Moniezia expansa*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10:123-138.

Mendis, A.H., M.E.Rose, H.H.Rees, y T.W.Goodwin. 1983. Ecdysteroids in adults of the nematode, *Dirofilaria immitis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9:209-226.

Mercer, J.G., G.C.Barker, R.E.Howells, y H.H.Rees. 1990. Investigation of ecdysteroid excretion by adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38:89-95.

Mercer, J.G., A.E.Munn, C.Arme, y H.H.Rees. 1987a. Analysis of ecdysteroids in different developmental stages of *Hymenolepis diminuta*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:61-71.

Mercer, J.G., A.E.Munn, y H.H.Rees. 1987b. *Echinococcus granulosus*: occurrence of ecdysteroids in protoscoleces and hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24:203-214.

Meyer, F., H.Meyer, y E.Bueding. 1970. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochim. Biophys. Acta* 210:257-266.



Morales, J., C.Larralde, M.Arteaga, T.Govezensky, M.C.Romano, y G.Morali. 1996. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82:689-693.

Morales, J., T.Velasco, V.Tovar, G.Fragoso, A.Fleury, C.Beltran, N.Villalobos, A.Aluja, L.F.Rodarte, E.Sciutto, y C.Larralde. 2002. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 108:41-48.

Morales-Montor, J., S.Baig, C.Hallal-Calleros, y R.T.Damian. 2002a. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.* 100:209-216.

Morales-Montor, J., C.Hallal-Calleros, M.C.Romano, y R.T.Damian. 2002b. Inhibition of p-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 32:1379-1387.

Morales-Montor, J. y C.Larralde. 2005. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 131:287-294.

Morrell, J.I. y D.W.Pfaff. 1981. Autoradiographic technique for steroid hormone localization. *En: Neuroendocrinology of reproduction. Physiology and behavior.* N.T.Adler, editor. Plenum press, New York.

Muller, T., B.Varadi, P.Horn, y M.Bercsenyi. 2003. Effects of various hormones on the sexual maturity of European eel (*Anguilla anguilla* L.) females from farm and lakes. *Acta Biol. Hung.* 54:313-322.

Naftolin, F., K.J.Ryan, I.J.Davies, V.V.Reddy, F.Flores, Z.Petro, M.Kuhn, R.J.White, Y.Takaoka, y L.Wolin. 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog. Horm. Res.* 31:295-319.

Nagy, L., H.Y.Kao, D.Chakravarti, R.J.Lin, C.A.Hassig, D.E.Ayer, S.L.Schreiber, y R.M.Evans. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89:373-380.

Nantermet, P.V., P.Masarachia, M.A.Gentile, B.Pennypacker, J.Xu, D.Holder, D.Gerhold, D.Towler, A.Schmidt, D.B.Kimmel, L.P.Freedman, S.Harada, y W.J.Ray. 2005. Androgenic induction of growth and differentiation in the rodent uterus involves the modulation of estrogen-regulated genetic pathways. *Endocrinology* 146:564-578.

Neumann, F. 2005. Experimental basis for the clinical use of antiandrogens. *En: Regulation of androgen action. The proceedings of an International Symposium.* N.Bruchovsky, A.Chapdelaine, y F.Neumann, editors. Congressdruck R. Bruckner, Berlin (west). 43-49.

Noble, E.R. y G.A.Noble. 1976. Parasitology. The biology of animal parasites. Philadelphia, USA.

Obourn, J.D., N.J.Koszewski, y A.C.Notides. 1993. Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor. *Biochemistry* 32:6229-6236.

Peterson, G.L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100:201-220.

Phillips, W.J. y L.R.G.Cannon. 1973. Ecological observations on the commercial crab, *Portunus pelagicus* (L), and its parasite, *Sacculina Granifera* Boschma (Cirripedia: Rhizocephala). *J. Fish Diseases* 1:137-149.

Pratt, W.B., M.D.Galigniana, Y.Morishima, y P.J.Murphy. 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.* 40:41-58.

Raether, W. y H.Hanel. 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol. Res.* 91:412-438.

Reis-Henriques, M.A., D.Le Guellec, J.P.Remy-Martin, y G.L.Adessi. 1990. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B:303-309.

Rikihisa, Y., Y.C.Lin, y T.Fukaya. 1985. *Taenia taeniaeformis*: inhibition of rat testosterone production by excretory-secretory product of the cultured metacestode. *Exp. Parasitol.* 59:390-397.

Robinson, J.A. y T.C.Spelsberg. 1997. Mode of action at the cellular level with specific reference to the bone cells. *En: Estrogens and Antiestrogens*. R.Lindsay, D.W.Dempster, y V.C.Jordan, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 43-58.

Rodgers-Gray, T.P., J.E.Smith, A.E.Ashcroft, R.E.Isaac, y A.M.Dunn. 2004. Mechanisms of parasite-induced sex reversal in *Gammarus duebeni*. *Int. J. Parasitol.* 34:747-753.

Rogers, M.V. 1991. Do parasites express receptors for host lipoproteins? *Parasitol. Today* 7:117-120.

Romano, M.C., R.A.Valdez, A.L.Cartas, Y.Gomez, y C.Larralde. 2003. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:221-225.

Roth, J., D.LeRoith, J.Shiloach, J.L.Rosenzweig, M.A.Lesniak, y J.Havrankova. 1982. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular chemical messengers: implications for mammalian biology. *N. Engl. J. Med.* 306:523-527.

Rumjanek, F.D. y A.J.Simpson. 1980. The incorporation and utilization of radiolabelled lipids by adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1:31-44.

Sarti, E. 1997. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México* 39:225.

Saz, H.J. 1981. Energy generation in parasitic helminths. *En: The biochemistry of parasites*. G.M.Slutsky, editor. Pergamon press, London.

Schmidt, G.D. y Roberts.L.S. 1977. Foundations of parasitology. The C.V Mosby company, St. louis, Missouri, USA.

Schneider, H.P. 2003. Androgens and antiandrogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 997:292-306.

Sciutto, E., G.Fragoso, M.L.Diaz, F.Valdez, R.M.Montoya, T.Govezensky, C.Lomeli, y C.Larralde. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77:243-246.

Sciutto, E., G.Fragoso, A.Fleury, J.P.Laclette, J.Sotelo, A.Aluja, L.Vargas, y C.Larralde. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes. Infect.* 2:1875-1890.

Sheridan, P.J., J.M.Buchanan, y V.Anselmo. 1981. Autoradiographic and biochemical studies of hormone receptor localization. *J. Histochem. Cytochem.* 29:195-200.

Simard, J., I.Luthy, J.Guay, A.Belanger, y F.Labrie. 1986. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol. Cell Endocrinol.* 44:261-270.

Simerly, R.B., C.Chang, M.Muramatsu, y L.W.Swanson. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp Neurol.* 294:76-95.

Snochowski, M., K.Lundstrom, E.Dahlberg, H.Petersson, y L.E.Edqvist. 1981. Androgen and glucocorticoid receptors in porcine skeletal muscle. *J. Anim Sci.* 53:80-90.

Soulsby, E.J. 1987. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol. Lett.* 16:315-320.

Spolski, R.J., J.Corson, P.G.Thomas, y R.E.Kuhn. 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* 22:297-305.

Stanley, R.L., A.Milwidsky, P.K.Besch, y A.Milwidsy. 1980. Evidence for an androgen-binding component in the cytosol of the human term placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 136:1003-1005.

Stear, M.J., K.Bairden, Q.A.McKeller, I.Scott, S.Strain, y S.C.Bishop. 1999. The relationship between the number and size of nematodes in the abomasum and the concentration of pepsinogen in ovine plasma. *Res. Vet. Sci.* 67:89-92.

Stein, I. y E.Cope. 1933. *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 25:819-825.

Taylor, L.M., J.J.Parkins, J.Armour, P.H.Holmes, K.Bairden, A.M.Ibarra-Silva, S.K.Salman, y P.N.McWilliam. 1989. Pathophysiological and parasitological studies on *Ostertagia ostertagi* infections in calves. *Res. Vet. Sci.* 46:218-225.

Terada, N., R.Yamamoto, T.Takada, H.Taniguchi, N.Terakawa, W.Li, Y.Kitamura, y K.Matsumoto. 1990. Inhibitory effect of androgen on cell death of mouse uterine epithelium. *J. Steroid Biochem.* 36:305-310.

Terrazas, L.I., R.Bojalil, T.Govezensky, y C.Larralde. 1994. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 80:563-568.

Toenjes, S.A., R.J.Spolski, K.A.Mooney, y R.E.Kuhn. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 118 ( Pt 6):623-633.

Toledo, A., C.Cruz, G.Fragoso, J.P.Laclette, M.T.Merchant, M.Hernandez, y E.Sciutto. 1997. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.* 83:189-193.

Towbin, H., T.Staehelin, y J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:4350-4354.

Tschirren, B., H.Richner, y H.Schwabl. 2004. Ectoparasite-modulated deposition of maternal androgens in great tit eggs. *Proc. Biol. Sci.* 271:1371-1375.

Tuckerman, E.M., M.A.Okon, T.Li, y S.M.Laird. 2000. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil. Steril.* 74:771-779.

Twan, W.H., J.S.Hwang, y C.F.Chang. 2003. Sex steroids in scleractinian coral, *Euphyllia ancora*: implication in mass spawning. *Biol. Reprod.* 68:2255-2260.

Valdéz,R.A., P.Jiménez, Y.Gómez, y M.C.Romano. 2005. *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens *in vitro*. *Parasitol. Res.*



Voogt, P.A. y S.J.Dieleman. 1984. Progesterone and oestrone levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: A comparison with the corresponding levels in the female sea star. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A:635-639.

White, A.C., P.Robinson, y R.Kuhn. 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *En: Immunopathogenic aspects of disease induced by helminth parasites*. D.O.Freedman, editor. Basel, Karger, Chem. Immunol. 66, 209-230.

White, R. y M.G.Parker. 1998. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine-Related Cancer* 5:1-14.

Whitfield, P.J. 1982. Parasitic helminths. *En: Modern Parasitology*. F.E.G.Cox, editor. Blacwell scientific Publications, London.

Wilson, E.M. y F.S.French. 1976. Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. *J. Biol. Chem.* 251:5620-5629.

Younes, M.A., N.F.Besch, y P.K.Besch. 1982. Evidence for an androgen binding component in human placental cytosol. *J. Steroid Biochem.* 16:311-315.

Zhou, Z.X., M.V.Lane, J.A.Kemppainen, F.S.French, y E.M.Wilson. 1995.

Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol. Endocrinol.* 9:208-218.

Zhou, Z.X., C.I.Wong, M.Sar, y E.M.Wilson. 1994. The androgen receptor: an overview. *Recent Prog. Horm. Res.* 49:249-274.

Zuo, Z., Y.K.Tam, J.Diakur, y L.I.Wiebe. 2002. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-flutamide inclusion complex. II. Oral and intravenous pharmacokinetics of flutamide in the rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 5:292-298.

## 9. APÉNDICE I

### 9.1. Fundamentos de la cromatografía

La separación de mezclas de moléculas mediante la técnica de cromatografía en capa fina se basa en el principio del reparto entre dos fases. En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interaccione con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que no es miscible con la fase estacionaria, se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluír) a las moléculas en la muestra. Debido a que las distintas moléculas en la muestra presentan diferente coeficiente de partición, la fase móvil "lavará" a los distintos componentes con diferente eficiencia, de modo que aquellos que son más solubles en la fase móvil serán eluidos más rápido que los que sean preferentemente solubles en la fase estacionaria. El reparto entre dos fases sucede cuando una mezcla de moléculas disueltas en un solvente determinado se pone en contacto con otro solvente que no sea miscible con el primero, las moléculas disueltas se difundirán hacia la nueva fase hasta alcanzar una concentración en cada fase (solvente) que depende de la solubilidad relativa de dicha molécula en las fases.

En la cromatografía de capa fina, la fase estacionaria es una delgada capa de un soporte sólido granulado, tal como gel de sílica, alúmina u otros, que se depositan sobre una placa de vidrio, aluminio u otro soporte inerte. Para que adquiera firmeza y no se desmorone, la capa de fase estacionaria se aglutina con una pequeña cantidad de sulfato de calcio u otro agente cementante. Las muestras se aplican añadiendo pequeñas gotas de solución en un pequeño círculo cerca del extremo inferior de la placa. La gota se deja secar y si se desea poner más muestra se pueden aplicar más gotas, cuidando de que la mancha no se haga demasiado grande.

La placa seca se sumerge en un pequeño volumen de fase móvil (mezcla de solventes). La polaridad de la mezcla de solventes se elige de acuerdo a la mezcla de compuestos que se desea separar. En cromatografía de capa fina la fase estacionaria está hidratada, por lo que se le considera como la fase polar.

Como sólo la base de la placa queda sumergida, el solvente comienza a mojar la fase estacionaria y asciende por capilaridad. Al recorrer la fase móvil, la placa, va arrastrando a las sustancias apolares y aquellas más polares son retenidas por la fase estacionaria dando lugar a la separación. La placa desarrollada se deja secar y se revela con un reactivo que tiña a las sustancias de interés. La movilidad relativa o  $R_f$  es la relación entre la distancia recorrida por la mancha de un compuesto, dividida por la distancia recorrida por el frente de solvente al momento de sacar la placa del solvente.

En un sistema de cromatografía en capa fina bien caracterizado, las sustancias pueden identificarse comparando los valores de  $R_f$  con los de estándares, que se han analizado previamente o durante la cromatografía. Si se desea, las sustancias pueden recuperarse raspando la sílica de la placa del lugar en el que se detectó la mancha. Para ello, es necesario emplear métodos de revelado que no destruyan a la muestra.

## 10. APÉNDICE II

Durante el desarrollo del presente proyecto, se elaboraron 2 artículos, los cuales ya han sido aceptados para su publicación en dos diferentes revistas.

1. Valdéz, R. A; Jiménez, P; Cartas, A. L; Gómez, Y y Romano, M. C. 2006. *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens *in Vitro*. Parasitol. Res.
2. Jiménez, P; Valdéz, R. A y Romano, M. C. 2006. Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.

R. A. Valdéz · P. Jiménez · A. L. Cartas ·  
Y. Gómez · M. C. Romano

## ***Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens in vitro**

Received: 19 August 2005 / Accepted: 16 November 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** Cysticerci from *Taenia solium* develop in the pig muscle and cause severe diseases in humans. Here we report on the capacity of *T. solium* cysticerci to synthesize sex steroid hormones. *T. solium* cysticerci were dissected from infected pork meat. Parasites were incubated for different periods in culture media plus antibiotics and tritiated steroid precursors. Blanks and parasite culture media were extracted and analyzed by thin-layer chromatography (TLC) in two different solvent systems. In some experiments, the scoleces were incubated separately. Results showed that *T. solium* cysticerci transform [<sup>3</sup>H] androstenedione to [<sup>3</sup>H]testosterone in a time-dependent manner. The production was confirmed in two different solvent systems. The incubation with [<sup>3</sup>H]testosterone yielded only small amounts of [<sup>3</sup>H]androstenedione. The recrystallization procedure further demonstrated that the metabolite identified by TLC was testosterone. The isolated scoleces incubated in the presence of [<sup>3</sup>H]androstenedione yielded [<sup>3</sup>H]testosterone and small quantities of [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradiol. The results reported here demonstrate that *T. solium* cysticerci have the capacity to synthesize steroid hormones.

### **Introduction**

A body of evidence suggests that gender is important in the susceptibility to parasitic infections. These differences are due to many factors. The impact of the differences in the immunological response of males and females and the link for sex-steroids were reviewed by Zuk and McKean (1996), Roberts et al. (2001), Klein (2004), and Morales-Montor et al. (2004). The effect of hormones on the development of *Schistosoma* had been widely studied (for a review, see Mendonca et al. 2000; Salzet et al. 2000).

Cysticercosis is a disease caused by the larval stage of cestodes of the family *Taenidae* that affects many hosts including humans. *Taenia solium* cysticercosis is a serious public health problem in Mexico, Central and South America, India, and sub-Saharan Africa and is endemic in many underdeveloped countries. It is also the major reason that epilepsy is twice as common in developing countries as compared to developed countries (for a review, see White et al. 1997). Throughout the course of cysticerci infection, host–parasite interactions occur that deeply affect the immune response of the host (White et al. 1997). Experimental studies using the fast-growing ORF strain isolated by Freeman (1962) demonstrated that gender is important for *Taenia crassiceps* cysticerci development. Immunoendocrine interactions occur in the course of *T. crassiceps* cysticercosis (Huerta et al. 1992; Bojalil et al. 1993; Terrazas et al. 1994). We have shown that infection with *T. crassiceps* have an effect on steroid hormones and the behavior of the host (Larralde et al. 1995; Morales et al. 1996; Morales-Montor et al. 2002). These data made us interested in the endocrine physiology of the parasite itself.

Parasites such as *Schistosoma mansoni* synthesize, incorporate, and metabolize lipids (Meyer et al. 1970; Rumjanek and Simpson. 1980). These parasites also synthesize isoprenoid compounds (Foster et al. 1993) and produce different molecular species of phospholipids (Brouwers et al. 1998). Helminths also produce ecdysteroids (Mendis et al. 1983, 1984; Mercer et al. 1987a,b, 1990; Cleator et al. 1987; Fleming 1985; Evershed et al. 1987). The production and physiological significance of

---

R. A. Valdéz · A. L. Cartas · M. C. Romano (✉)  
Departamento de Fisiología,  
Biofísica y NC, CINVESTAV,  
14-740, 07000 México, DF, México  
e-mail: mromano@fisio.cinvestav.mx  
Tel.: +52-55-0613800  
Fax: +52-55-50613800

P. Jiménez  
Centro de Investigación en Reproducción Animal,  
CINVESTAV-UAT,  
62, 90000 Tlaxcala, TLAX, Mexico

Y. Gómez  
Departamento de Bioprocesos, UPIBI-IPN,  
07350 México, DF, México

male and female sex steroid hormones by parasites have received poor attention (for a review, see Romano et al. 2003). The synthesis of steroid hormones by *S. mansoni* was investigated by Briggs (1972), who found that these parasites had the capacity to perform several steps in the steroidogenic pathway. As no information about the capacity of *T. crassiceps* to synthesize steroid hormones was available, we investigated the ability of these cysticerci to synthesize steroid hormones in vitro (Gomez et al. 2000). We found that the parasites can transform [<sup>3</sup>H]androstenedione to [<sup>3</sup>H]testosterone. Preliminary results showed that *T. solium* cysticerci have the capacity to synthesize androgens (Romano et al. 2003).

In the present paper we analyze in detail the sex steroid hormone production by the complete *T. solium* cysticerci and demonstrate that the isolated scoleces produce testosterone and small quantities of estradiol.

## Materials and methods

### Parasites

*T. solium* cysticerci were dissected from the muscle of infected pigs killed by using head electroshock and posterior bleeding; the fibrous capsule that surrounded each parasite was carefully separated under a dissection microscope. After washing the cysticerci five times with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), the parasites were collected in DMEM. Only those cysticerci that looked translucent and healthy were selected to perform the experiments.

### Culture of whole cysticerci and isolated scolex

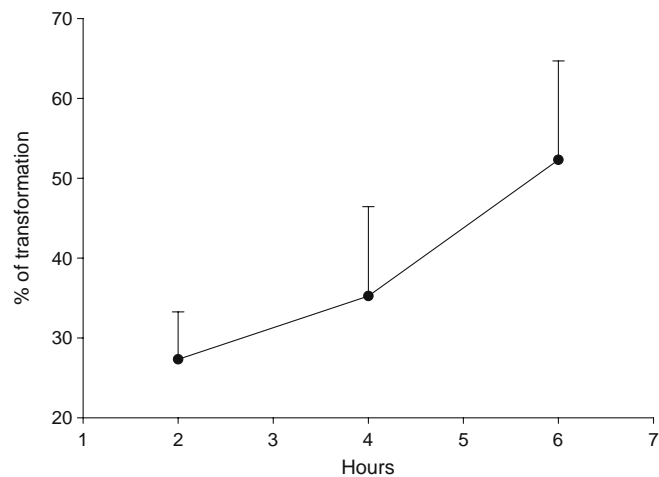
The cysticerci were placed in scintillation vials containing DMEM plus 0.1% bovine serum albumin (BSA) (eight cysticerci per vial) and washed twice with the same medium. Parasites were incubated in DMEM plus 0.1% BSA for 1 h at 37°C in a shaking water bath and the medium was then discarded. After this step, the medium was replenished and the corresponding tritiated precursor ([<sup>3</sup>H]androstenedione or [<sup>3</sup>H]testosterone) was added. The cysticerci were incubated for different periods at 37°C in a shaking bath. The tracer was also added to culture medium free of parasites (blank) and incubated as described above. After the incubation period, the culture medium was separated from the cysticerci and ether extracted; blank medium was also extracted. For the extraction procedure, cold diethyl ether (2 volumes) was added to the medium and the mixture immediately thawed. The organic phase was transferred to new vials and evaporated under nitrogen atmosphere at 37°C. The samples were reconstituted with 0.1 ml absolute ethanol. In some experiments the scoleces were dissected from the surrounding membranes and incubated for 3 h as described previously in this section for the complete cysticerci.

### Thin-layer chromatography

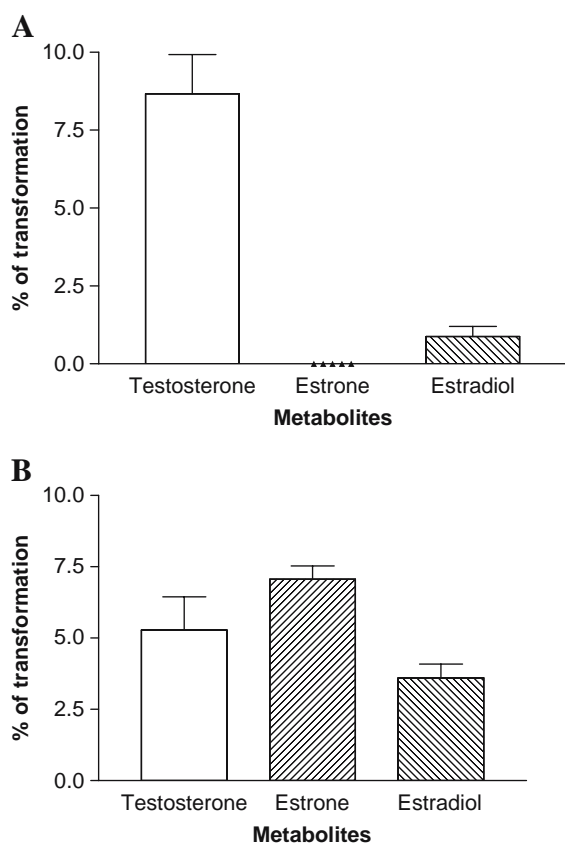
Thin-layer chromatography (TLC) was carried out by use of silica gel 60 F<sub>254</sub> precoated sheet plates (Merck, Darmstadt, Germany). Aliquots of the ethanolic samples were fractionated in two independent TLC systems. Some plates were developed with a mixture of methylene chloride–ethyl acetate (8:2 v/v) and others with a mixture of benzene–methanol (9:1). The standard steroids (Steraloids, Wilton, NH, USA) were detected in the plates by ultraviolet light and exposed to 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by heating at 120°C. Regions corresponding to authentic standards were cut and placed in vials containing scintillation liquid and radioactivity counted in a scintillation spectrometer. The recovery of radioactivity was estimated by comparing the difference between initial and final counts per minute. Results are expressed as the percentage of substrate transformation for each identified metabolite after incubation in the presence of the precursor.

### Recrystallization of testosterone

The cysticerci were prepared as described above and incubated in the presence of 0.1 μCi of [<sup>3</sup>H]androstenedione for 3 h. The samples were immediately ether extracted and dissolved in ethanol. The samples were then combined in a pool and dried under nitrogen atmosphere. The dried extracts were subsequently dissolved in ethanol containing 30 mg of cold testosterone so that the solution was nearly saturated with this steroid. HPLC-quality water was added by drops until the solution became turbid and crystals began to appear. The solution was kept at 4°C overnight to allow complete crystallization of the steroid. Recrystallization was conducted four times. The weight and the



**Fig. 1** Time course transformation of [<sup>3</sup>H]androstenedione to [<sup>3</sup>H]testosterone by *T. solium* cysticerci. The parasites were incubated in the presence of [<sup>3</sup>H]androstenedione. After 2, 4, and 6 h of incubation, cysticerci culture media were obtained and [<sup>3</sup>H]testosterone synthesis was investigated. TLC plates were developed in a mixture of methylene chloride–ethyl acetate (8:2 v/v). Values are expressed as mean percentage ± SD of data in triplicate



**Fig. 2** Percentage transformation of [<sup>3</sup>H]androstenedione to [<sup>3</sup>H]testosterone by *T. solium* cysticerci. To further corroborate the in vitro transformation of [<sup>3</sup>H]androstenedione to [<sup>3</sup>H]testosterone, the sample was divided into two aliquots and developed in **a** methylene chloride–ethyl acetate (8:2 v/v) or **b** benzene–methanol (9:1 v/v). Results are expressed as percentage of substrate transformation. *n*=5. Small quantities of estradiol were evident in this condition

radioactivity of the crystalline steroid were measured and the specific activity was calculated and expressed as counts per minute per milligram (Axelrod et al. 1965).

## Results

Figure 1 shows a temporal curve of [<sup>3</sup>H]testosterone production obtained after *T. solium* cysticerci were incubated for different periods in the presence of [<sup>3</sup>H]androstenedione. [<sup>3</sup>H]testosterone production increased

**Table 1** Comparison of the percentage transformation of [<sup>3</sup>H]androstenedione to [<sup>3</sup>H]testosterone or the reverse pathway by *T. solium* cysticerci

	Metabolites produced from [ <sup>3</sup> H]androstenedione	Metabolites produced from [ <sup>3</sup> H]testosterone
Intact cysticerci T	26.13±4.96	A <sub>4</sub> 0.7±0.5

Parasites were incubated for 3 h in the presence of the radioactive androgens. After this period, metabolites were detected in the culture media as described in “Materials and methods.” Plates were developed in methylene chloride–ethyl acetate (8:2 v/v). Data are mean±SD, *n*=10

**Table 2** Recrystallization of the testosterone produced in vitro by *T. solium* cysticerci

	Consecutive crystallization (cpm/mg)			
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
Testosterone	3,521.9	4,600.9	4,265.0	4,170.5

Data show specific activity obtained in authentic standard crystals formed in the presence of the pool of extracted radioactive incubation media from parasites. A mixture of ethanol and water was used as the solvent. Specific radioactivity of the crystals are expressed in counts per minute per gram of testosterone

with the time of culture, doubling the quantity after 6 h of incubation.

To confirm the nature of the metabolite characterized as [<sup>3</sup>H]testosterone in the culture medium of cysticerci, the samples were prepared as described in “Materials and methods,” aliquoted, and developed in two independent TLC systems. Figure 2a shows the result of a plate developed in a mixture of methylene chloride–ethyl acetate. In Fig. 2b, the same sample was fractionated by use of benzene–methanol. The transformation of [<sup>3</sup>H]androstenedione to testosterone was found in both solvent systems, which confirms that parasites synthesize and secrete this sex steroid hormone to the culture medium. Small amounts of [<sup>3</sup>H]17β-estradiol were also observed, mainly in the benzene–methanol system.

After demonstrating that *T. solium* cysticerci have the capacity to produce testosterone, we have investigated if the reverse pathway (testosterone to androstenedione) was also active in the parasites. Results shown in Table 1 indicate that in the presence of [<sup>3</sup>H]testosterone, the cysticerci produce only negligible quantities of androstenedione. These data show that the androstenedione to testosterone pathway is the preference pathway.

To further demonstrate the nature of the metabolite characterized as testosterone in TLC, we have performed a recrystallization procedure. The results showed that when testosterone authentic standards were mixed with the radioactive parasite samples, a constant specific activity of crystals was found in the consecutive recrystallization steps (Table 2).

We have also studied the capacity of the isolated scoleces to produce [<sup>3</sup>H]testosterone from [<sup>3</sup>H]androstenedione. Results showed that the metabolism of [<sup>3</sup>H]androstenedione by the embryos yielded [<sup>3</sup>H]testosterone after 3 h of incubation (Table 3). It is interesting to note that we also found good production of [<sup>3</sup>H]17β-estradiol.

**Table 3** Production of [<sup>3</sup>H]testosterone and [<sup>3</sup>H]estradiol from [<sup>3</sup>H]androstenedione by isolated *T. solium* scoleces

	Transformation (% , mean±SD)
T	17.65±3.8
E <sub>2</sub>	3.90±4.39

Dissected scoleces were incubated in culture media for 3 h. The synthesis of [<sup>3</sup>H]testosterone and [<sup>3</sup>H]estradiol was detected in the culture media by TLC. Plates were developed in methylene chloride–ethyl acetate (8:2 v/v). *n*=5



## Discussion

Data presented here indicate that the transformation of [ $^3\text{H}$ ] androstenedione to [ $^3\text{H}$ ]testosterone by *T. solium* cysticerci was time dependent (Fig. 1). Testosterone accumulates in the culture media of parasites, which means that the parasites have the ability and the corresponding enzymes that make it possible to incorporate and metabolize the steroid precursor from the culture media. The metabolite synthesized from the precursor was transformed to the androgen [ $^3\text{H}$ ]testosterone, which was accumulated in the medium and increasing its concentration throughout the course of the experiment. We also found that the conversion of [ $^3\text{H}$ ]androstenedione to testosterone was much more efficient than the transformation of [ $^3\text{H}$ ]testosterone to [ $^3\text{H}$ ]androstenedione (Table 1). Thus, it seems that this part of the steroidogenic pathway of the cysticercus functions like that of mammalian and avian gonads.

The cysticercus is the larval stage of *T. solium*, which is a hermaphrodite helminth. In the adult stage, the worms have testes and ovaries in the proglottids, which are the reproductive units of the *Taenia*. Willms et al. (2003) described the characteristics of the early stages of spermatocyte lobules in the strobilae proglottids. Similar to other species, cysticerci could have groups of steroidogenic cells that will be part of the adult gonads, and which could be the site for the transformation of radioactive steroid precursors as shown in this paper.

That testosterone was found when the same sample was developed in two different TLC solvent systems (Fig. 2) strongly suggests that the metabolite identified by TLC was indeed testosterone. Furthermore, the specific activity of samples subjected to repeated crystallization remained constant, which indicates that the steroid assayed was in fact testosterone; this technique added strong evidence for the nature of the hormone identified by TLC as testosterone. We also studied [ $^3\text{H}$ ]androstenedione metabolism by the isolated *T. solium* scoleces and found that they not only transformed the precursor to [ $^3\text{H}$ ]testosterone, but also synthesized a significant amount of [ $^3\text{H}$ ]estradiol (Table 2). Data presented here are the first demonstration of the ability of *T. solium* to aromatize androgens to estrogens. Conversion of androgens to estrogens needs the presence and activity of the enzyme P450 aromatase; therefore, the present results strongly suggest that *T. solium* cysticerci have the corresponding enzyme. Several studies had shown that estrogens were found in many invertebrates such as mollusks, crustaceans, and echinoderms (Sandor and Mehdi 1979). However, there is a paucity of information about estrogen production by parasites. In this regard, Briggs (1972) showed that *S. mansoni* have the ability to convert estrone to estradiol, a reaction that needs the activity of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; however, he did not investigate the synthesis of estrogens from androgens, a process that involves P450 aromatase activity.

To speculate on the role of endogenous androgen production for the parasite, we should point out that sex

steroids are importantly involved in the differentiation and development of the gonads in mammals and birds (George and Wilson 1994). Therefore, androgens produced by the parasites could be playing a crucial role in *T. solium* development. We showed that a culture of *T. crassiceps* cysticerci in the presence of flutamide, an androgen receptor blocker, significantly affected the [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation to these parasites (Romano et al. 2003), which suggests that cysticerci need androgen receptors for its development. A high susceptibility of females to *T. crassiceps* infection was shown by Dorais and Esch (1969), Sciuotto et al. (1991), and Bojalil et al. (1993); gonadectomy changed the sex-associated susceptibility of male and female mice to the infection (Larralde et al. 1995). It is interesting to note that males infected with *T. crassiceps* cysticerci had abnormal levels of estrogens and androgens that might facilitate the increment in the parasite's load observed throughout the course of the infection (Larralde et al. 1995). Androgens are the precursors for estrogens and so the testosterone produced by a huge charge of cysticerci might be aromatized to estrogens in the host tissues and contribute to the estrogen-rich microenvironment that favors the growth of the parasite in *T. crassiceps* cysticercosis infection. Because of their chemical characteristics, steroids easily diffuse throughout the cell membranes, spread to the host tissues, and eventually reach the circulation with a possible impact on the host immunity.

In summary, the present results demonstrate the capacity of *T. solium* cysticerci to synthesize androgens and estrogens when incubated with steroid precursors and strongly suggest that the parasites have active steroidogenic enzymes like 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and P450 aromatase.

**Acknowledgements** We thank Dr. Aline S. de Aluja for helpful discussion of the results and Dr. Edda Sciuotto for providing us with the *T. solium* infected pig meat.

## References

- Axelrod LR, Matthijssen C, Goldzieher JW, Pulliam JE (1965) Definitive identification of microquantities of radioactive steroids by recrystallization to constant specific activity. *Acta Endocrinol* 49(Suppl 99):1–77
- Bojalil R, Terrazas LI, Govensky T, Sciuotto E, Larralde C (1993) Thymus-related cellular immune response in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 79:384–389
- Briggs MH (1972) Metabolism of steroid hormones by schistosomes. *Biochim Biophys Acta* 280:481–485
- Brouwers JFHM, Van Hellemond JJ, van Golde, LMG Tielens AG (1998) Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 96:49–58
- Cleator M, Delves CJ, Howells RE, Rees HH (1987) Identity and tissue localization of free and conjugated ecdysteroids in adults of *Dirofilaria immitis* and *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 25:93–105
- Dorais FJ, Esch GW (1969) Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp Parasitol* 25:395–398
- Evershed RP, Mercer JG, Rees HH (1987) Capillary gas chromatography/mass spectrometry of ecdysteroids. *J Chromatogr* 390:357–369

- Fleming MW (1985) *Ascaris suum*: role of ecdysteroids in molting. *Exp Parasitol* 60:207–210
- Foster JM, Pennock JF, Marshall I, Rees HH (1993) Biosynthesis of isoprenoid compounds in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 61:275–284
- Freeman RS (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool* 40:969–990
- George FW, Wilson JD (1994) Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neill JD (eds) *Physiology of reproduction*. Raven, New York, pp 3–28
- Gomez Y, Valdez RA, Larralde C, Romano MC (2000) Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cysticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:143–147
- Huerta L, Terrazas LI, Sciutto E, Larralde C (1992) Immunological mediation of gonadal effects in experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Parasitol* 78:471–476
- Klein SL (2004) Hormonal immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 26:247–264
- Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC (1995) Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:575–580
- Mendis AHW, Rose ME, Rees HH, Goodwin TW (1983) Ecdysteroids in adults of the filarial nematode *Diriofilaria immitis*. *Mol Biochem Parasitol* 9:209–226
- Mendis AHW, Rees HH, Goodwin TW (1984) The occurrence of ecdysteroids in the cestode *Moniezia expansa*. *Mol Biochem Parasitol* 10:123–138
- Mendonca RL, Escriva H, Bouton V, Pierce RJ (2000) Hormones and nuclear receptors in *Schistosoma* development. *Parasitol Today* 16:233–240
- Mercer JG, Munn AE, Rees HH (1987a) *Echinococcus granulosus*: occurrence of ecdysteroids in protoscolexes and hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 24:203–214
- Mercer JG, Munn AE, Arme C, Rees HH (1987b) Analysis of ecdysteroids in different developmental stages of *Hymenolepis diminuta*. *Mol Biochem Parasitol* 25:61–71
- Mercer JG, Barker GC, Howells RE, Rees HH (1990) Investigation of ecdysteroid excretion by adult *Diriofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol Biochem Parasitol* 39:89–96
- Meyer F, Meyer H, Bueding E (1970) Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochem Biophys Acta* 210:257–266
- Morales J, Larralde C, Arteaga M, Govezensky T, Romano MC, Morali G (1996) Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J Parasitol* 82:689–693
- Morales-Montor JJ, Hallal-Calleros C, Romano MC, Damian RT (2003) Inhibition of P-450 aromatase prevents feminization and induces protection during cysticercosis. *Int J Parasitol* 32:1379–1387
- Morales-Montor J, Chavarria A, De Leon MA, Del Castillo LI, Escobedo EG, Sanchez EN, Vargas JA, Hernandez-Flores M, Romo-Gonzalez T, and Larralde C (2004) Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *J Parasitol* 90:531–546
- Roberts CW, Walker W, Alexander J (2001) Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 14:476–488
- Romano MC, Valdéz RA, Cartas AL, Gómez Y, Larralde C (2003) Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:221–225
- Rumjanek FD, Simpson AJG (1980) The incorporation and utilization of radiolabelled lipids by adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1:31–44
- Salzet M, Capron A, Stefano GB (2000) Molecular crosstalk in host–parasite relationships: *Schistosoma*– and leech–host interactions. *Parasitol Today* 16:536–540
- Sandor T, Mehdi AZ (1979) Steroids and evolution. In: Barrington, EJW (ed) *Hormones and evolution*. Academic, New York, pp 1–72
- Sciutto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Lomeli C, Govezensky T, Montoya RM, Larralde C (1991) Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 77:243–246
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1994) A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 80:563–568
- White AC Jr, Robinson P, Kuhn R (1997) *Taenia solium* cysticercosis: host–parasite interactions and the immune response. In: Freedman, DO (ed) *Immunopathogenic aspects of disease induced by helminth parasites*. *Chem Immunol* 66:209–230
- Willms K, Caro JA, Robert L (2003) Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidae, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitol Res* 90:479–488
- Zuk M, McKean KA (1996) Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int J Parasitol* 26:1009–1023

> >JSBMB 2005-8966 (Revised)  
> >'Metabolism of steroid hormones ...'  
> >by P. Jimenez et al.  
> >  
> >Dear Dr Romano,

It is a pleasure to inform you that the referee is happy with the modifications made and that this paper is now accepted for publication and scheduled for inclusion in the June 2006 issue of the "Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology" (Vol. 99/4-5).

The paper will be sent to Elsevier in due course and you will receive the corresponding proofs directly from the printer at a later date, by e-mail whenever possible.

Please note that the editorial office is ahead of schedule and that it may be a while before you receive the proofs.

I will send you an official letter to let you know when the manuscripts for the June issue are being sent to Elsevier.

Yours sincerely,

Sandra MacDonald

JSBMB Editorial Office, Paris, France

The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology

Dr J.R. PASQUALINI, Editor-in-Chief

Institut de Puériculture et de Périnatalogie

6 Boulevard Brune

75014 Paris, FRANCE

Tel.: 33-1-4539 9109

Fax: 33-1-4542 6121

e-mail: [jorge.pasqualini@wanadoo.fr](mailto:jorge.pasqualini@wanadoo.fr)

## **Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci**

Jiménez, P<sup>a, b</sup>; Valdéz, R. A<sup>c</sup> and Romano, M. C<sup>c, \*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UAT, Apdo. Postal 62, 90000 Tlaxcala, Tlax., México

<sup>b</sup>Programa en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. FMVZ, UNAM, México, D.F.

<sup>c</sup>Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV del IPN, Apdo. postal 14-740, 07000 México, D. F., México

\* Corresponding author:

Dr. Marta C. Romano

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

CINVESTAV

Apdo. Postal 14-740

07000, México, D.F., México

Tel.: (525) 50-61-38-00, ext. 5186 and 3961

fax: (52-55) 50-61-38-00, ext. 5109

E-mail address: [mromano@fisio.cinvestav.mx](mailto:mromano@fisio.cinvestav.mx)

## Abstract

Previous *in vitro* experiments showed that both, *Taenia. crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci have the ability to metabolize exogenous androstenedione to testosterone. Here we evaluate on the capacity of both cysticerci to synthesize several sex steroid hormones, using different hormonal precursors. Experiments using thin layer chromatography (TLC) showed that both cysticerci were able to produce  $^3\text{H}$ -hydroxyprogesterone,  $^3\text{H}$ -androstenedione and  $^3\text{H}$ -testosterone when  $^3\text{H}$ -progesterone was used as the precursor. They also synthesized  $^3\text{H}$ -androstenediol and  $^3\text{H}$ -testosterone when  $^3\text{H}$ -dehydroepiandrosterone was the precursor. In addition, both cysticerci interconverted  $^3\text{H}$ -estradiol and  $^3\text{H}$ -estrone. These results, strongly suggest the presence and activity of the  $\Delta^4$  and  $\Delta^5$  steroid pathway enzymes,  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase-like enzyme ( $3\beta$ -HSD), that converts androstenediol into testosterone; and the  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase that interconverts estradiol and estrone, in both types of cysticerci.

Keywords: Parasites; *Taenia solium*; *Taenia crassiceps*; cysticerci; steroid hormones

## Introduction

The cysticercus is the larval stage of an adult hermaphrodite tapeworm. The *Taenia solium* (*T. solium*) cysticercus is a complex organism composed by a scolex that will develop the adult *Taenia*, and a capsular tegument formed by a sincitial structure.

Sex steroids produced at early stages of development are critical for the differentiation of gonads during the prenatal and perinatal development in mammals and birds [1]. Male and female sex hormones, occur in all vertebrates so far studied. However the occurrence of steroid hormones in invertebrates is less known and the physiological significance of its presence remains unclear. Nevertheless, there are several studies that had shown the steroid production by invertebrates: *Mytilus edulis* L, a marine mollusc produce progesterone, androstenedione, testosterone, 17 $\beta$ -estradiol and estrone [2], the shrimp *Parapenaeus fissurus* produce an estrogen-like compound [3], progesterone and estrogen are produced by male and female of the sea star, *Asterias rubens* [4], *Schistosoma mansoni* produce a variety of steroid hormones from different precursors [5].

The immunoendocrine interactions that occur between host and parasites had been studied in an experimental model, the *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) cysticerci [6-10]. We are interested in the physiology of reproduction of the parasite itself. The data in the literature indicate that occurrence and physiological significance of male and female sex steroids in parasites have received poor attention.

Our group found that both, *T. crassiceps* and *T. solium* cysticercus have the ability to metabolize exogenous androstenedione (A4) to testosterone (T4) *in vitro* [11-13].

The aim of this work was to have insight into the capacity of both, the *T. solium* and the *T. crassiceps* cysticerci, to synthesize sex steroid hormones using several hormonal precursors.

## Material and methods

### Parasites

*Taenia solium* cysticerci were dissected out from the muscle of infected pigs sacrificed by using head electro shock and posterior bleeding; the fibrous capsule that surrounded each parasite was carefully separated under a dissection microscope. After washing five

times the cysticerci with PBS, the parasites were washed twice with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus antibiotics. Only those cysticerci that looked translucent were selected to perform the experiments.

We used the fast growing ORF strain of *Taenia crassiceps* cysticerci because of its ability to multiply rapidly in the mouse peritoneal cavity [14]. Cysticerci used in the experiments were aseptically harvested from the peritoneal cavity of ether anesthetized Balb/c female mice after 3-5 months of infection. Washing of parasites was as described [11].

### Bioassay

Eight *Taenia solium*'s cysticerci or 500  $\mu$ l of *Taenia crassiceps*' cysticerci were placed in each vial containing 2 ml DMEM plus antibiotics plus 0.1% BSA and incubated for 3 h at 37°C in a shaking water bath in the presence of 0.3  $\mu$ Ci of  $^3$ H-progesterone (1, 2, 6, 7- $^3$ H progesterone 93.0 Ci/mmol, Amersham pharmacia biotech) or  $^3$ H-dehydroepiandrosterone ( $^3$ H-DHEA) (1, 2, 6, 7- $^3$ H DHEA, 74.0 Ci/mmol, New products, MS, Dupont Boston ) or  $^3$ H-estrone (2, 4, 6, 7- $^3$ H estrone, 65.00 Ci/mmol, New products, MS, Dupont Boston) or  $^3$ H-estradiol (2, 4, 6, 7- $^3$ H estradiol, New products, MS, Dupont Boston). The tracers were also added to culture media free of parasites and incubated as described above as a blank. After the incubation period, parasites were separated and 2 volumes of cold anhydrous ether were added and the mixture immediately thawed. The organic phase was transferred to new vials and evaporated under nitrogen atmosphere at 37°C. The samples were reconstituted with 100  $\mu$ l of absolute ethanol.

### Thin layer chromatography

Progesterone (P4), hydroxyprogesterone (OHP4), androstenedione (A4) and testosterone (T4) were used as internal standards in the experiments where  $^3$ H-progesterone was the precursor. DHEA, androstenediol (Adiol), androstenedione and testosterone were used when  $^3$ H-DHEA was the precursor. Androstenedione, testosterone, estrone (E1) and estradiol (E2) were used when  $^3$ H-estrone or  $^3$ H-estradiol were the steroid precursors. TLC was carried out using silica gel sheets plates (20 x 20

Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Germany). Aliquots of 40 ml of the ethanolic samples were supplemented with standard steroids and further fractionated in two independent TLC systems. Some plates were developed with a mixture of dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) and other with a mixture of benzene-methanol (9:1 v/v). The standard steroids (Steraloids, Wilton, NH) were detected in the plates by ultraviolet light and exposed to 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> followed by heating at 120°C. Regions corresponding to authentic standards were cut and placed in vials containing scintillation liquid and radioactivity counted in a scintillation spectrometer. The recovery of radioactivity was estimated by comparing the difference between initial and final cpm. Results are expressed as the percentage of substrate transformation for each identified metabolite, after incubation in the presence of the precursor.

## Results

Figures 1 and 5 show the metabolism of <sup>3</sup>H-progesterone by *T. solium* cysticerci (Fig. 1) and *T. crassiceps* cysticerci (Fig. 5). The parasites yielded hydroxyprogesterone (R<sub>f</sub>=0.324), androstenedione (R<sub>f</sub>=0.524) and testosterone (R<sub>f</sub>=0.281) as the products when the plates were developed with dichlorometane-ethyl acetate (Fig. 1a and 5a). To corroborate this fact, samples were developed in a benzene-methanol mixture with similar results (Fig. 1b and 5b). For R<sub>f</sub> values please see table 1.

Metabolism of <sup>3</sup>H-DHEA by cysticerci is shown in figures 2 (*T. solium* cysticerci) and 6 (*T. crassiceps* cysticerci). The parasites yielded androstenediol (R<sub>f</sub>=0.221), and testosterone (R<sub>f</sub>=0.281) as the products when the plates were developed with dichlorometane-ethyl acetate (Fig. 2a and 6a). To corroborate this fact, samples were developed in a benzene-methanol mixture with similar results (figs. 2b and 6b). For R<sub>f</sub> values please see table 1.

Cysticerci yielded an important quantity of estradiol, approximately 70% of transformation was founded when *T. solium* cysticerci were incubated with estrone.

*T. crassiceps* cysticerci also transformed estrone into estradiol efficiently, however, transformation was lower than the one observed for *T. solium*. Estradiol was the only one significant product (R<sub>f</sub>=0.443), when the plates were developed in dichlorometane-ethyl acetate (Fig. 3a, *T. solium*; Fig. 7a, *T. crassiceps*), To corroborate this fact, samples were developed in a benzene-methanol mixture and E<sub>2</sub> was again detected



(Figs. 3b and 7b). However, the compounds that run like A4 and T4 were not detected in the second solvent system. For Rf values please see table 1.

The incubation of both cysticerci in the presence of  $^3\text{H}$ -estradiol yielded estrone as the only one significant product, when the plates were developed in dichlorometane-ethyl acetate (Rf=0.718) (Fig. 4a and 8a), or in a benzene-methanol system (Figs. 4b and 8b). Compounds that run like T4 and A4 were not present when the samples were developed in dichlorometane-ethyl acetate system (For Rf values please see table 1).

## Discussion

Our study demonstrates that both, *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci have the ability to synthesize several sex steroid hormones, when incubated in the presence of different steroid hormone precursors. The findings reported here strongly suggest that the parasites have the enzymatic machinery to transform steroid precursors into metabolites. Incubation of cysticerci with tritiated progesterone, yielded hydroxyprogesterone, androstenedione and testosterone, suggesting the presence and activity of a  $17\alpha$ -hydroxylase-like enzyme,  $17, 20$  liase-like enzyme and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-like enzyme ( $17\beta$ -HSD) in both *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci. These enzymes are part of the  $\Delta^4$  steroidogenic pathway, that therefore seems to be active in both types of cysticerci.

On the other side, cysticerci incubated in the presence of  $^3\text{H}$ -DHEA, yielded androstenediol and testosterone, but not androstenedione, suggesting the presence and activity of  $17\beta$ -HSD and a  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase-like ( $3\beta$ -HSD) enzymes. The fact that we couldn't find androstenedione using DHEA as a precursor, suggests the existence in the parasite of the  $3\beta$ -HSD enzyme, that transforms androstenediol in testosterone. But the fact that the cysticerci did not synthesize androstenedione from DHEA, suggests that they lack the corresponding  $3\beta$ -HSD enzyme, present in the gonads of other species. Previously, Gomez et al, found that *T. crassiceps* did not transform pregnenolone into any metabolite [11], these results together with our findings strongly suggest the absence of some of the enzymes that converts  $\Delta^5$  steroids into  $\Delta^4$  steroids.

The interconversion between estradiol and estrone (figs. 3, 4, 7 and 8) suggest the activity of  $17\beta$ -HSD enzymes that could be working in both ways, with preference for

the reductive one. Gomez et al, found that *T. crassiceps* cysticerci have the ability to transform androstenedione into testosterone but not viceversa, suggesting activity of 17 $\beta$ -HSD with preference for the reductive way [11], as we found for the estradiol production in this work. A possible explanation is that the cysticerci need to produce strong androgens and estrogens to create an optimum micro-environment for their growth and development. To this regard we should point out that endogenous production of sex steroids is involved in the differentiation and development of the gonads of many species [1]. Estrogens and androgens produced by the parasites could be playing a crucial role in *T. solium* and *T. crassiceps* development. We had previously shown that culture of *T. crassiceps* cysticerci in the presence of the androgen blocker flutamide, significantly affected the <sup>3</sup>H-thymidine incorporation to these parasites [12], which suggests the cysticerci needs androgen receptors for its development.

In the other hand, several papers have shown that the hormonal milieu influences the development of cysticercosis in the mice. High susceptibility of females to *T. crassiceps* infection was shown by Dorais and Esch [15], Sciutto et al [6], and Terrazas et al [7]; gonadectomy changed the sex-associated susceptibility of male and female mice to the infection [8]. Males infected with *T. crassiceps* cysticerci had abnormal levels of estrogens and androgens that might facilitate the increment in parasite's load observed throughout the course of the infection [8]. Immunoendocrine interactions might support these changes [16-18]. Androgens are the precursors for estrogens and so the testosterone produced by the huge charge of cysticerci that can be frequently observed in the pig, might be aromatized to estrogens in the host tissues. Because of their chemical characteristics, steroids easily diffuse throughout the cell membranes [19-21], spread to the host tissues, and promote a number of responses in the immune cells [17]. All together, these findings indicate that the *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci are capable to synthesize steroid hormones at this embryonic stage. Therefore, 17 $\beta$ -HSD and other important enzymes of the steroidogenic pathway seems to be present in both cysticerci. The biological potency of estrogens and androgens is regulated by 17 $\beta$ -HSDs, the key and exclusive enzymes involved in the formation and inactivation of sex steroids and that differ markedly in their substrate specificity [22,23]. Interestingly, the activity catalyzed by each type of 17 $\beta$ -HSD is unidirectional [23,24]. There are seven 17 $\beta$ -HSD so far studied, isolated and characterized: type 1, 3, 5 and 7 that catalyzes the reductive reaction, while types 2, 4 and 8 catalyze de oxidative reaction [23]. We don't

know if the enzymes present in the cysticerci are similar to the reported ones, but future experiments will clarify this point.

### **Acknowledgements**

Authors would like to thank Dr. Aline S. De Aluja and Dr. Carlos Larralde who kindly provided us with parasites.

We also wish to thank Jesús Velázquez and Armando Vargas for their technical assistance.

### **References**

- [1] F.W. George, J.D. Wilson, Sex determination and differentiation, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), *Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, 1994, pp. 3-28.
- [2] M.A. Reis-Henriques, D. Le Guellec, J.P. Remy-Martin, G.L. Adessi, Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B (1990) 303-309.
- [3] S.S. Jeng, W.C. Wan, C.F. Chang, Existence of an estrogen-like compound in the ovary of the shrimp *Parapenaeus fissurus*. *Gen. Comp Endocrinol.* 36 (1978) 211-214.
- [4] P.A. Voogt.S.J. Dieleman, Progesterone and oestrone levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: A comparison with the corresponding levels in the female sea star. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A (1984) 635-639.
- [5] M.H. Briggs, Metabolism of steroid hormones by schistosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 280 (1972) 481-485.
- [6] E. Scitutto, G. Fragoso, M.L. Diaz, F. Valdez, R.M. Montoya, T. Govezensky, C. Lomeli, C. Larralde, Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77 (1991) 243-246.

- [7] L.I. Terrazas, R. Bojalil, T. Govezensky, C. Larralde, A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 80 (1994) 563-568.
- [8] C. Larralde, J. Morales, I. Terrazas, T. Govezensky, M.C. Romano, Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52 (1995) 575-580.
- [9] J. Morales, C. Larralde, M. Arteaga, T. Govezensky, M.C. Romano, G. Morali, Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82 (1996) 689-693.
- [10] J. Morales-Montor, C. Hallal-Calleros, M.C. Romano, R.T. Damian, Inhibition of p-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 32 (2002) 1379-1387.
- [11] Y. Gomez, R.A. Valdez, C. Larralde, M.C. Romano, Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cysticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74 (2000) 143-147.
- [12] M.C. Romano, R.A. Valdez, A.L. Cartas, Y. Gomez, C. Larralde, Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85 (2003) 221-225.
- [13] P. Jiménez, R.A. Valdéz, A.S. de Aluja, M.C. Romano, The  $\Delta^4$  steroidogenic pathway is present in *Taenia solium* cysticerci. 12 th International Congress of Endocrinology (2004).
- [14] R.S. Freeman, Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40 (1962) 969-990.
- [15] F.J. Dorais.G.W. Esch, Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* 25 (1969) 395-398.

- [16] A.C. White, P. Robinson, R. Kuhn, *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response, in: D.O. Freedman (Ed.), Immunopathogenic aspects of disease induced by helminth parasites, Basel, Karger, Chem. Immunol. 66, 1997, pp. 209-230.
- [17] S.L. Klein, Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. Parasite Immunol. 26 (2004) 247-264.
- [18] C.W. Roberts, W. Walker, J. Alexander, Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. Clin. Microbiol. Rev. 14 (2001) 476-488.
- [19] J.H. Clark, W.T. Schrader, B.T. O'Malley, Mechanisms of action of steroid hormones, in: J.D. Wilson, D.W. Foster (Eds.), Williams Textbook of Endocrinology, Saunders Company, Philadelphia, 1992, pp. 35-90.
- [20] J.H. Clark, K.M. Shailaja, Actions of ovarian steroid hormones, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), The Physiology of Reproduction, Raven press, New York, 1994, pp. 1011-1062.
- [21] M.C. Luke, D.S. Coffey, The male sex accessory tissues: Structure, androgen action, and physiology, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), The Physiology of Reproduction, Raven press, New York, 1994, pp. 1435-1488.
- [22] C. Martel, E. Rheaume, M. Takahashi, C. Trudel, J. Couet, V. Luu-The, J. Simard, F. Labrie, Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 41 (1992) 597-603.
- [23] V. Luu-The, Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 76 (2001) 143-151.
- [24] M. El Alfy, V. Luu-The, X.F. Huang, L. Berger, F. Labrie, G. Pelletier, Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. Endocrinology 140 (1999) 1481-1491.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** *T. solium* cysticerci was capable of produce androgens from progesterone, its metabolism yielded hydroxyprogesterone (OHP4), androstenedione (A4) and testosterone (T4). The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing four samples each.

**Fig. 2.** Metabolism of  $^3\text{H}$ -DHEA by *T. solium* cysticerci yielded an important quantity of androstenediol (Adiol) and in lower proportion, testosterone (T4). We were unable to detect androstenedione (A4). The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing six samples each.

**Fig. 3.** Metabolism of radioactive estrone by *T. solium* cysticerci yielded estradiol (E2) as a major metabolite. The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing five samples each.

**Fig. 4.** Metabolism of radioactive estradiol by *T. solium* cysticerci yielded estrone (E1) as a major metabolite, The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing four samples each.

**Fig. 5.** *T. crassiceps* cysticerci was capable to produce androgens from progesterone, its metabolism yielded hydroxyprogesterone (OHP4), androstenedione (A4) and testosterone (T4). The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing four samples each.

**Fig. 6.** Metabolism of radioactive DHEA by *T. crassiceps* cysticerci yielded an important quantity of androstenediol (Adiol) and in lower proportion, testosterone (T4). We were unable to detect androstenedione (A4). The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing six samples each.

**Fig. 7.** Metabolism of radioactive estrone by *T. crassiceps* cysticerci yielded estradiol (E2) as a major metabolite. The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing five samples each.

**Fig. 8.** Metabolism of radioactive estradiol by *T. crassiceps* cysticerci yielded estrone (E1) as a major metabolite. The TLC plates were developed with dichloromethane-ethyl acetate (8:2 v/v) (A) or benzene-methanol (9:1 v/v) (B). Results are expressed as the percentage of substrate transformation after 3h incubation at 36°C. Data are mean  $\pm$  SD of two different experiments containing four samples each.

**Table 1**

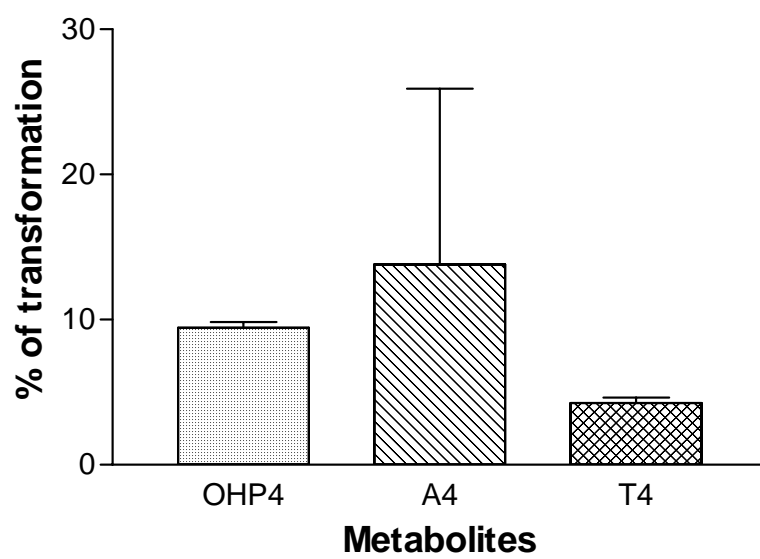
Thin layer chromatography behavior of steroid metabolites

Metabolite	Rf values of metabolites	
	dichloromethane/ethyl acetate (8:2 v/v)	benzene/methanol (9:1 v/v)
Progesterone	0.62	0.81
Hydroxyprogesterone	0.32	0.53
DHEA	0.38	0.68
Androstenediol	0.22	0.45
androstenedione	0.52	0.75
Testosterone	0.28	0.43
Estrone	0.71	0.58
Estradiol	0.44	0.3



Figure 1

A



B

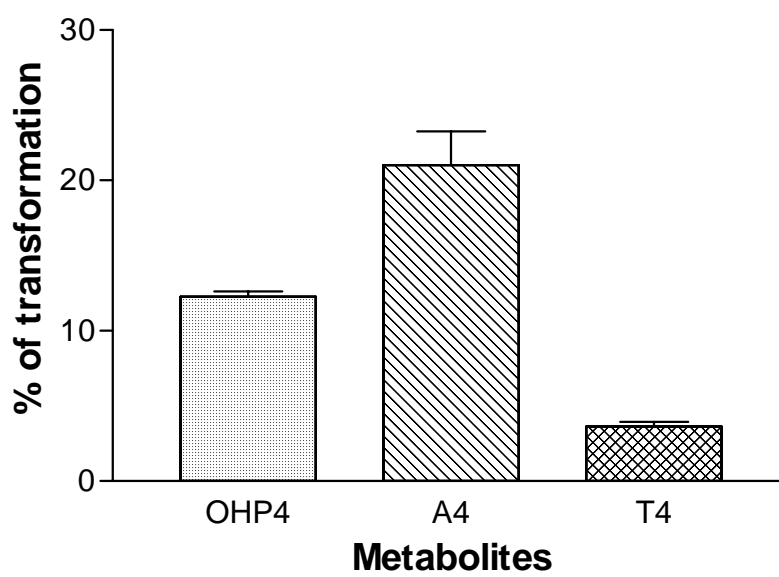
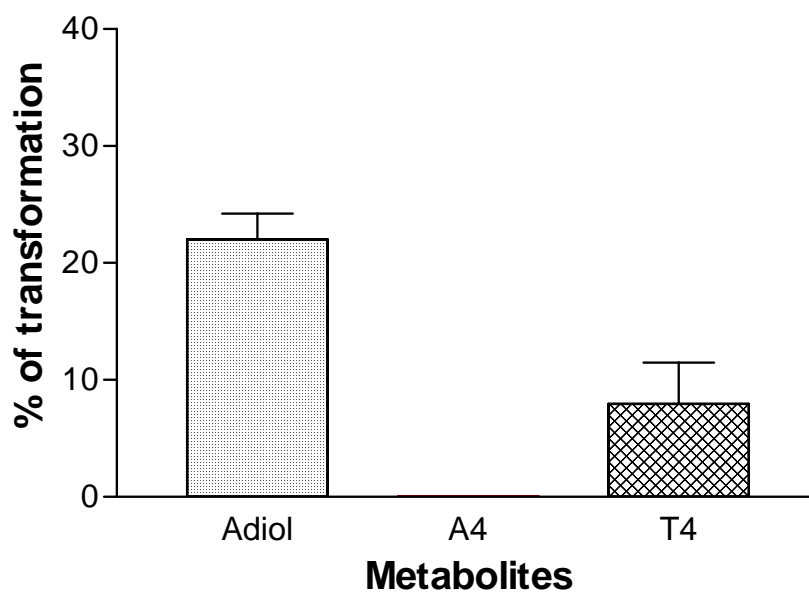


Figure 2

**A**



**B**

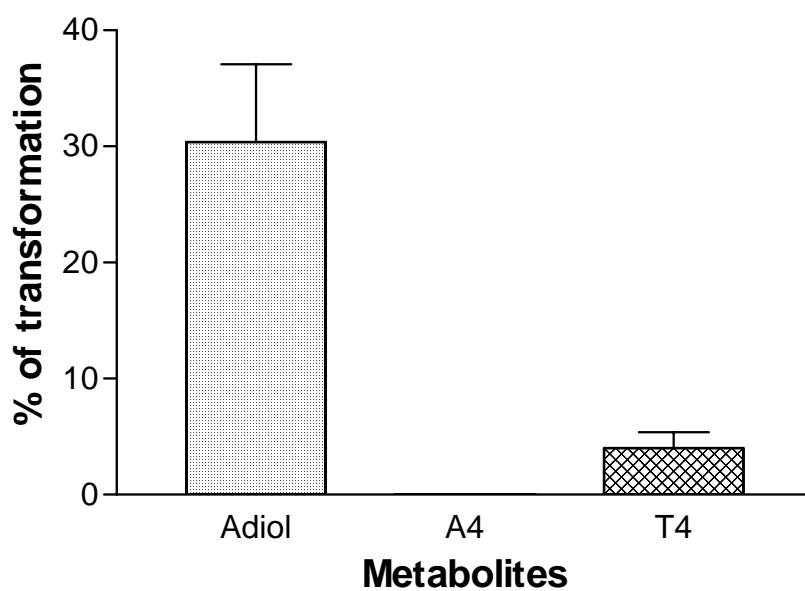
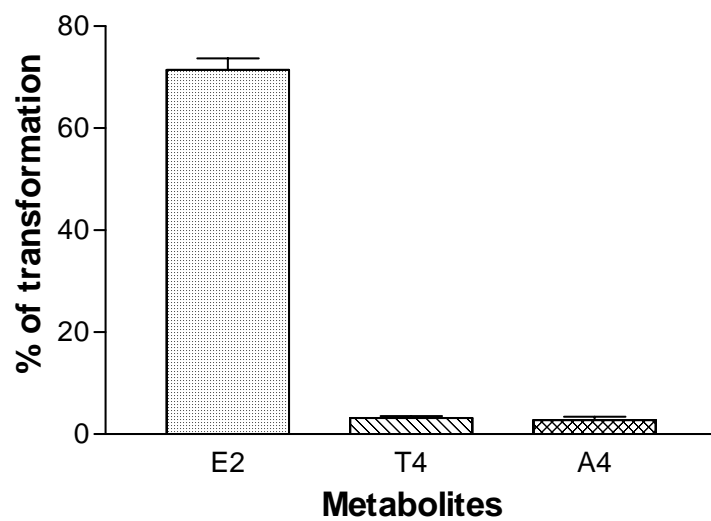


Figure 3

**A**



**B**

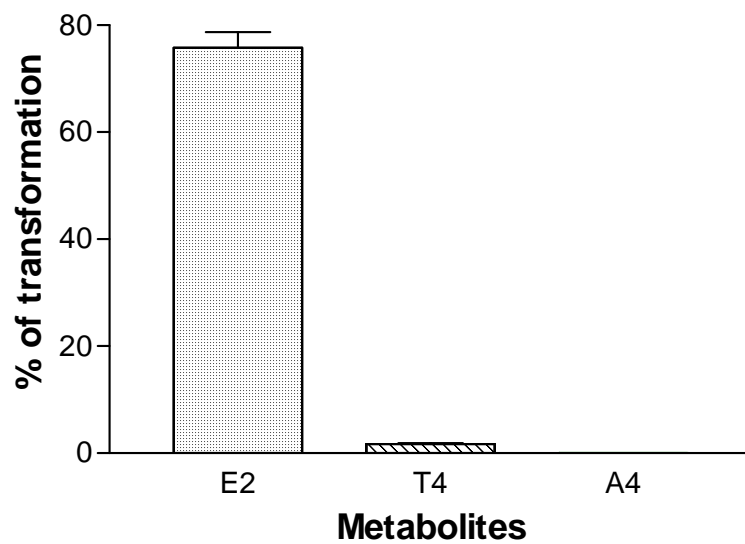
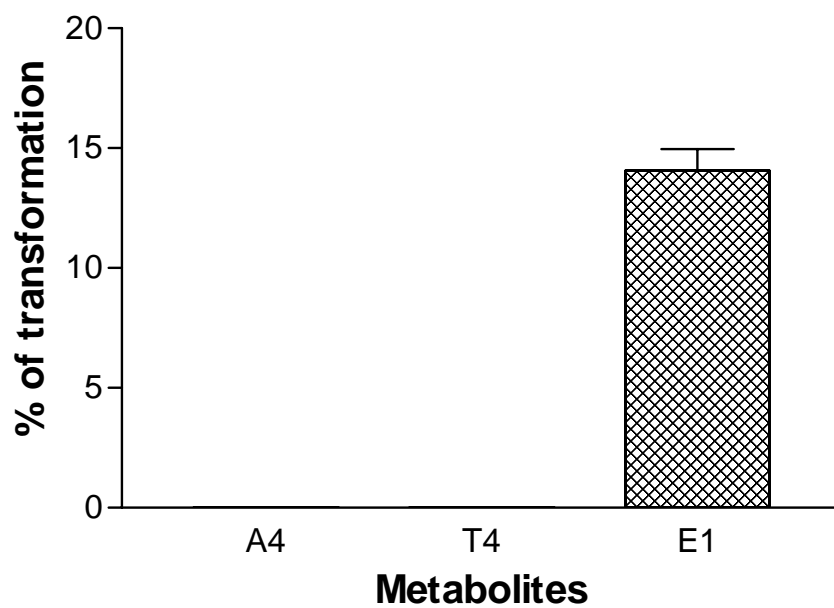


Figure 4

**A**



**B**

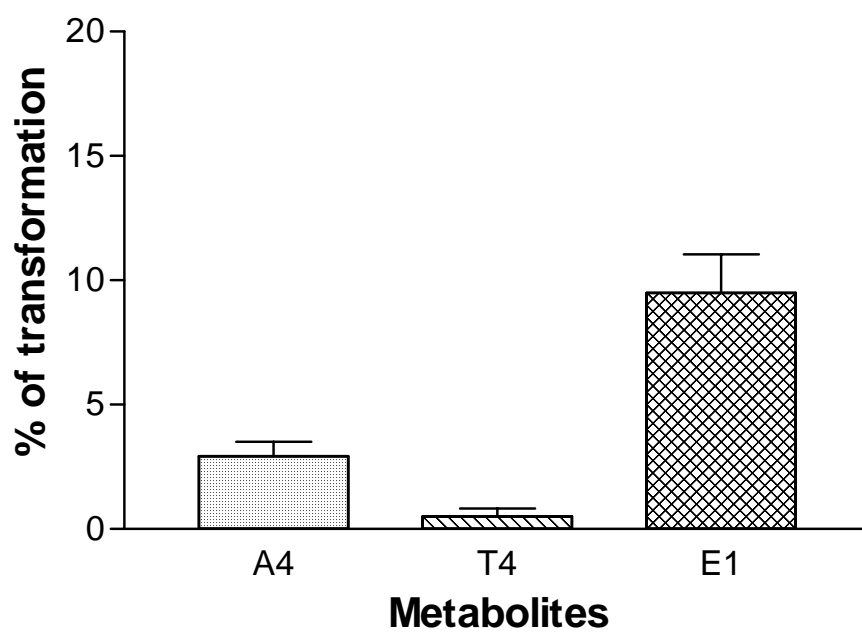
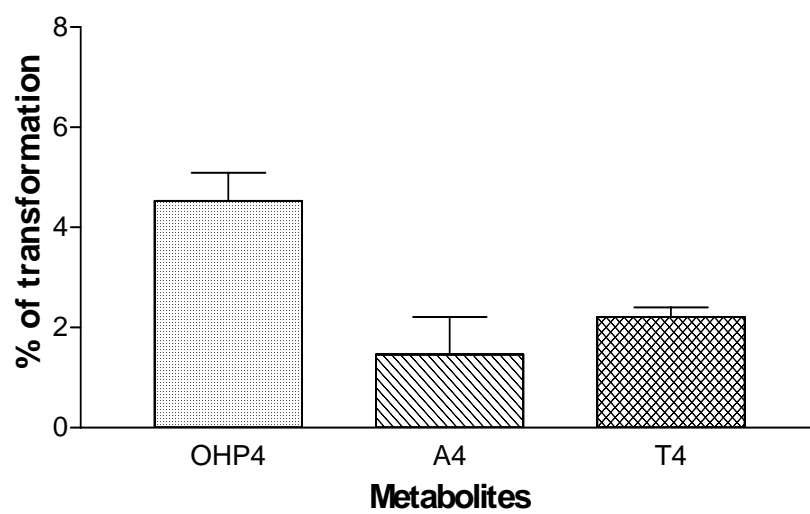


Figure 5

**A**



**B**

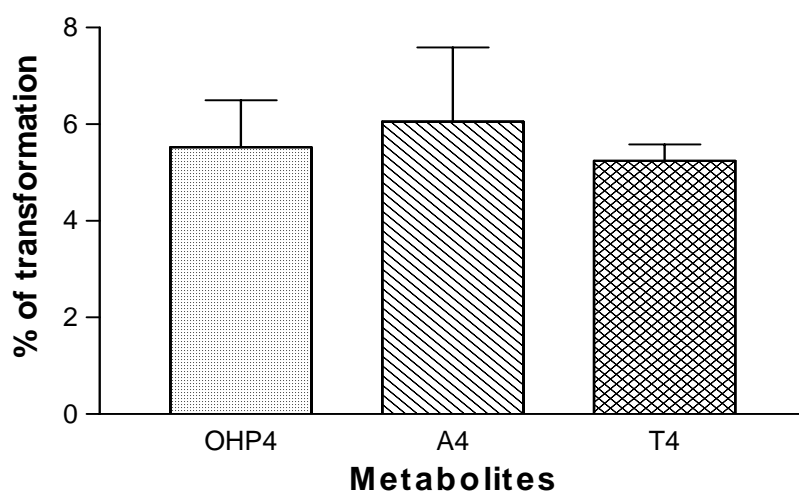
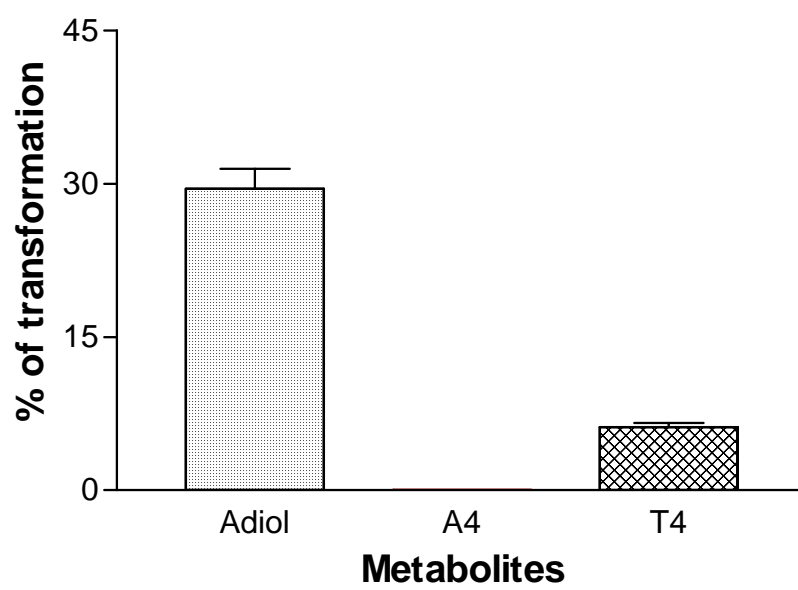


Figure 6

**A**

**B**



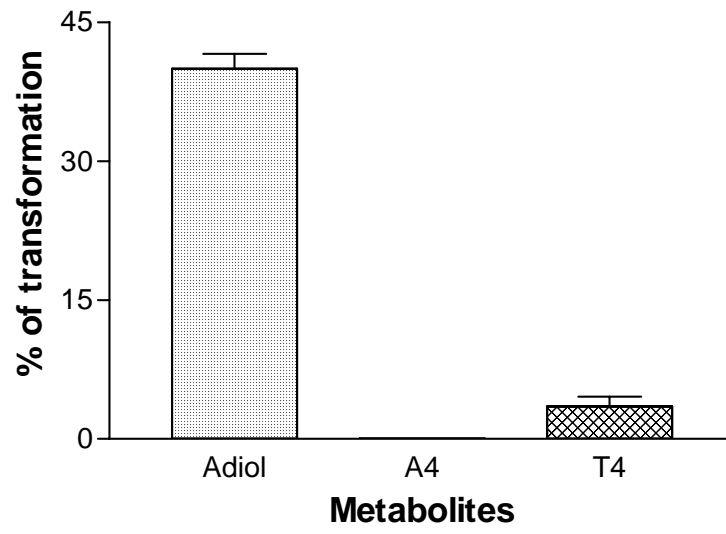
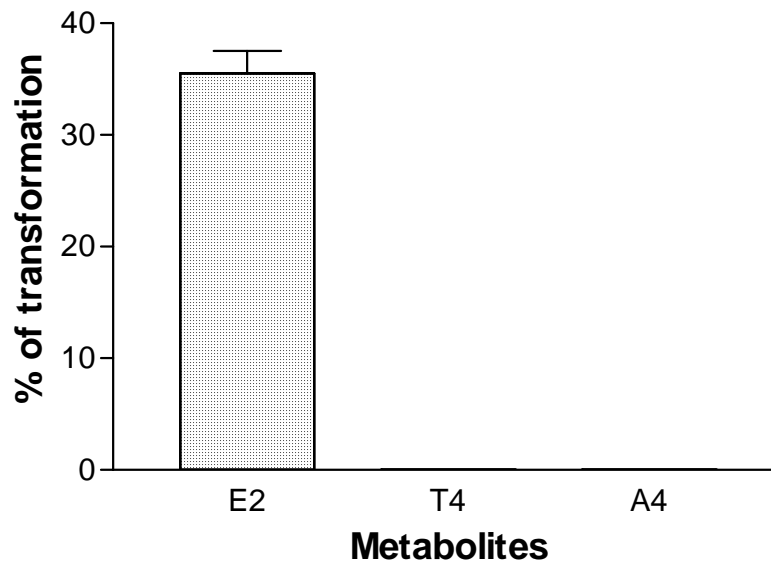


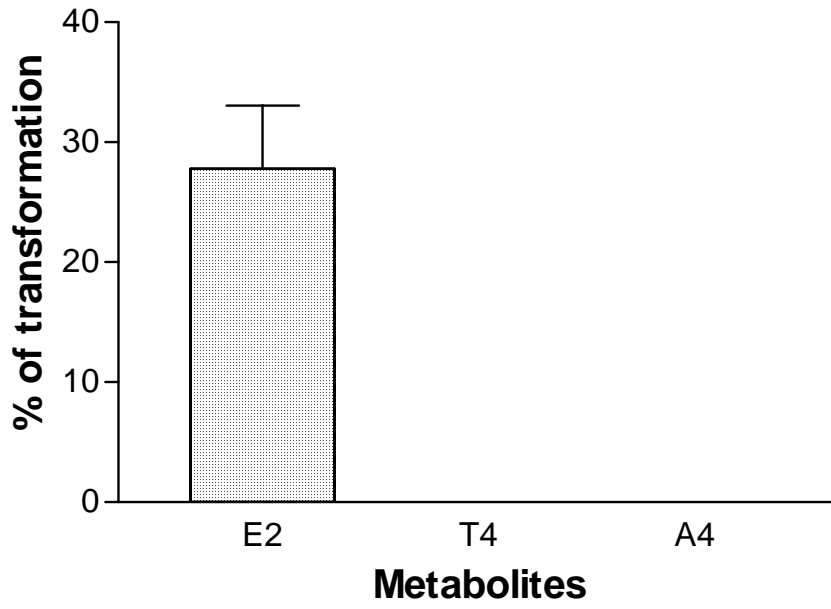
Figure 7

**A**

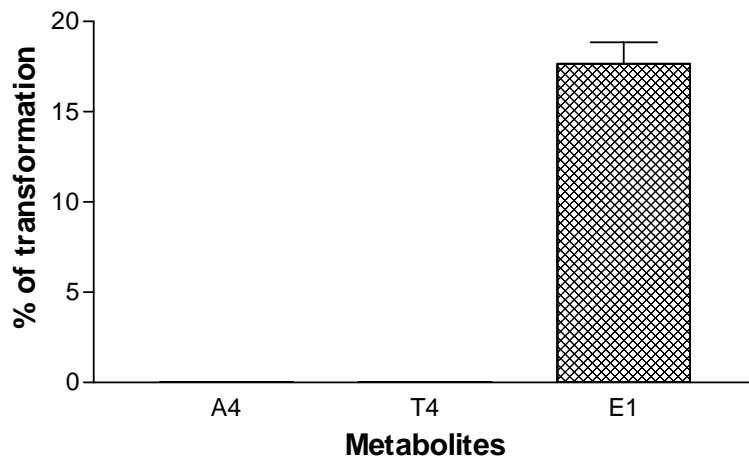


**B**

Figure 8



**A**





**B**

