



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA  
DEL RECEPTOR A ESTRÓGENOS EN EL CISTICERCO  
DE *Taenia crassiceps***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ELIZABETH GUADALUPE IBARRA CORONADO**

**ASESOR: DR. JORGE MORALES MONTOR**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

EL N. A. M.  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE

EXÁMENES PROFESIONALES  
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Determinación de la presencia del receptor a estrógenos en el  
cisticero de Taenia crassiceps

que presenta la pasante: Elizabeth Guadalupe Ibarra Coronado  
con número de cuenta: 09915881-9 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Marzo de 2009.

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Pablo Martínez Labat</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Jorge Morales Montor</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Raquel Ma. del Refugio Tapia Romero</u>	

# DEDICATORIAS

A mi pequeño Max, por ser la razón de mi vida,  
Y por darme los momentos más felices y hermosos de mi vida.

A mis padres, por todo el tiempo dedicado,  
por su gran paciencia y por mostrarme el camino; por estar siempre a mi lado en los  
peores y mejores momentos de mi vida.  
Por el apoyo, el amor y la confianza que siempre me han brindado.

A mis hermanos Joanna y Hugo, por estar siempre disponibles para mi,  
por el cariño y amor, y por el apoyo que me han brindado  
Y por llenar de contrastes mi vida.

A mis abuelos Ime y Pancho, por ser unas personas hermosas.  
Por enseñarme diferentes aspectos de la vida,  
por apoyarme y sobre todo por el gran amor que me han dado.

A mi abuelita soledad, que aunque no esté para ver este gran logro,  
sé que se hubiera sentido feliz al verme realizada es esta etapa de mi vida.



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional autónoma de México por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente, pero aún más por hacerme crecer como una persona íntegra, de criterio y de grandes oportunidades.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan por haberme acogido y por brindarme los conocimientos y herramientas necesarias para enfrentarme a un mundo diferente y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por haberme abierto sus puertas, el lugar en donde descubrí que la pasión de mi vida es la ciencia.

Al Dr. Jorge Morales por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por hacerme una mujer capaz de buscar soluciones y por seguir apoyándome, mil gracias.

A mí Max, lo más importante de mi vida y ser la razón de todo; a mis padres Víctor y Lupita por apoyarme ante todo, por confiar en mí y brindarme lo mejor de su vida y seguir respaldándome, infinitas gracias por su paciencia; a mis hermanos Joanna y Hugo por ser parte esencial de mi vida por cuidarme y alentarme; a mis abuelos por su cariño y por estar a mi lado siempre.

A Luciano, por enseñarme a ser analítica y crítica, por compartirme un poco de sus conocimientos y por mostrarme el mejor aspecto de los fracasos y por compartir la alegría de un buen resultado.

A Ramses por toda su ayuda, por sus consejos y regalarme un poco de su experiencia y conocimiento y sobre todo por el afecto que me ha brindado, y por extenderme su mano cuando todo parece que va mal.

A Rocio, técnico de la Dra, Guadalupe Ortega, gracias por tu ayuda y por compartir tu experiencia.

A todos los chicos de laboratorio, a Galo por esforzarse en tener paciencia conmigo, por enseñarme a ser tolerante y por tu amistad, a Toño, a Marco, a Marce, a Caro y a Romel por compartir sus experiencias y lo que saben, por ayudarme en la realización de esta tesis y por compartir un poco de sus vidas conmigo.

A Lorena por hacer práctico lo que en realidad es fácil, pero sobre todo por brindarme su amistad y acompañarme en las alegrías y por reconfortarme en los momentos difíciles, y por todos tus consejos.

A mi querido Angel, por haber llegado en el momento preciso a mi vida, gracias por haberme dado el último empujón que necesitaba para concluir esta tesis y sobre todo por ser parte de mi vida, por apoyarme y confiar en mí, este logro es el principio de una vida que seguramente compartiremos.

A mis queridos amigos, a Melissa por seguir estando al pie del cañón desde hace mucho tiempo, por ser mi mejor amiga y por los grandes momentos que hemos compartido; a Memo por enseñarme perspectivas diferentes de la vida, por compartir sus experiencias y enseñarme a conocer el mundo, a Omar que siempre me apoyó y me enseñó el orgullo del amor y la amistad incondicional.

A los cuates de la universidad, los chicos del mirabut al Roño, a Moño, a Andrés, a Rubén, al Logan, a Ismael, a todos ellos por hacerme feliz durante nuestro paso por la FES, por enseñarme a ver el aspecto divertido y aplicable a la ciencia; a Richard, por entenderme, darme su cariño y enseñarme a ser condescendiente.

A todos un millón de gracias.

*Divaguemos y pensemos sin importar lo que tenemos,  
las ideas hechas con locura dan sentido a la creación,  
y sin ello no habría motivos para estar aquí,  
pues la heterogeneidad más radical es necesaria para mí.*



## ÍNDICE

Índice de abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	6
1.0 Antecedentes.....	8
1.1 Interacciones inmunoendocrinas: La infección parasitaria y su interacción con hormonas esteroideas.....	8
1.2 Estrógenos.....	11
1.2.1 Síntesis y acciones fisiológicas de los estrógenos.....	11
1.2.2 El receptor a estrógenos.....	13
1.2.3 Efectos moleculares del receptor a estrógenos.....	15
1.2.4 Efectos sobre la inmunidad.....	20
1.3 Efecto de los estrógenos en la infección causada por <i>Taenia crassiceps</i> .....	21
2.0 Justificación.....	26
3.0 Hipótesis.....	27
4.0 Objetivos.....	28
4.1 Objetivo General.....	28
4.2 Objetivos particulares.....	28
5.0 Materiales y Métodos.....	29
5.1 Obtención de cisticercos.....	29
5.2 Cultivo de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> .....	29
5.3 Tratamiento de los cisticercos con estradiol.....	30
5.4 Tratamiento de los cisticercos con el inhibidor competitivo tamoxifen.....	30
5.5 Extracción de RNA.....	30
5.6 Identificación del receptor a estrógenos por RT-PCR.....	31
5.7 Extracción de proteínas totales.....	32
5.8 Identificación del receptor a estrógenos por Western Blot.....	33
5.9 Identificación del receptor a estrógenos por citometría de flujo.....	34
5.10 Identificación del receptor a estrógenos por microscopía confocal.....	36
6.0 Resultados.....	38



6.1 Identificación del receptor a estrógenos por PCR.....	38
6.2 Identificación del receptor a estrógenos por Western Blot.....	42
6.3 Identificación del receptor a estrógenos por citometría de flujo (FACS).....	47
6.4 Identificación del receptor a estrógenos por microscopia de fluorescencia.....	55
7.0 Discusión.....	57
8.0 Conclusiones.....	61
9.0 Perspectivas.....	62
10.0 Referencias Bibliográficas.....	63



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- E<sub>2</sub>: estradiol  
T<sub>4</sub>: testosterona  
P<sub>4</sub>: progesterona  
DHT: dehidrotestosterona  
ER $\alpha$ : receptos a estrógenos  $\alpha$   
ER $\beta$ : receptos a estrógenos  $\beta$   
CAMPc: adenilatomonofosfato cíclico.  
LH: hormona luteinizante  
FSH: hormona foliculoestimulante  
ACTH: hormona corticotrofina  
RIP's: proteínas de interacción con receptores  
ERK: señalización extracelular dependientes de cinasas  
MAPK: cinasas activadas por mitogeno  
NO: oxido nítrico  
NOs: oxido nítrico sintasa  
DNA: ácido desoxinucleico  
cDNA: ácido desoxinucleico complementario  
RNA: ácido desoxiribonucleico  
GTP: guanosín trifosfato  
DAG. Diacilglicerol  
PKC: proteína cinasa  
JNK: cinasa jun  
C: control  
CEtOH: control de vehículo etanol  
Tmx: tamoxifen



## RESUMEN

La relación que hay entre un parásito con su hospedero es extremadamente compleja, e implica la interacción de diversos sistemas bioquímicos de ambos organismos para mantener la misma por largos períodos. El buen parásito no mata a su hospedero, y de esta forma asegura la transmisión de su descendencia a través del tiempo. El papel que juega el dimorfismo sexual en hospederos mamíferos durante una variedad de infecciones parasitarias entre las cuales se incluyen la cisticercosis humana y murina ha sido materia de debate en cuanto a sus causas, mecanismos y consecuencias.

Estudios recientes sobre la infección tanto de *Taenia solium* como de *Taenia crassiceps*, han aportado evidencia de que estos parásitos no sólo evaden activamente la respuesta inmune, sino que aprovechan el microambiente hormonal en su favor, para asegurar su establecimiento, crecimiento y reproducción. En este aspecto es de especial interés la habilidad que tienen las hormonas para ejercer su acción sobre la respuesta inmunológica directa contra agentes patógenos y sus efectos directos sobre el parásito. Esta relación se ha observado en algunas otras infecciones parasitarias como la malaria, la toxoplasmosis, la esquistosomiosis, la tripanosomiosis y la leishmaniosis. En dichas infecciones, se ha sugerido que los parásitos aprovechan el microambiente hormonal, posiblemente porque han desarrollado estructuras similares a receptores a esteroides, o receptores para hormona proteicas similares a los expresados en vertebrados superiores. Por otro lado, en modelos de cisticercosis causada por *Taenia crassiceps*, se ha observado que los ratones hembras presentan una carga parasitaria mayor a la de los machos, además de que éstos últimos, cuando están crónicamente infectados, presentan niveles séricos de estradiol ( $E_2$ ) iguales a los de una hembra en estro, mientras que los de testosterona ( $T_4$ ) están disminuidos. Lo anterior tiene un impacto directo sobre la conducta sexual, así como la conducta agresiva, mismas que se ven disminuidas, lo que nos ha llevado a proponer un estado de feminización en el macho. En esta misma línea de investigación se ha reportado que los esteroides pueden actuar directamente sobre la proliferación y viabilidad del cisticerco de la *Taenia crassiceps*, sin la participación del sistema inmune del hospedero. El  $E_2$  y la progesterona ( $P_4$ ), cuándo son adicionadas en dosis fisiológicas en cultivo del parásito, aumentan su reproducción sin afectar su viabilidad, mientras que la  $T_4$  y la dehidrotestosterona (DHT) inhiben significativamente su proliferación.



Para poder conocer el mecanismo por el cual los estrógenos ejercen su efecto sobre el cisticerco de *Taenia crassiceps* se planteó la hipótesis de que el cisticerco utilizara la hormona  $E_2$  por medio de un receptor a estrógenos (ER) de características semejantes al expresado en vertebrados superiores. Por lo anterior, en este trabajo, por medio de diversas técnicas, cómo el uso de antagonistas cómo el tamoxifen, por RT-PCR, western blott, citometría de flujo y microscopía confocal, se demostró la presencia de un RE expresado en el cisticerco de la *Taenia crassiceps*. Para nuestro conocimiento, éste es el primer receptor de este tipo que es caracterizado en cualquier parásito, y, que además es funcional y muy importante en la reproducción del parásito.



## INTRODUCCIÓN

La teniosis y neurocisticercosis en humanos, así como la cisticercosis en cerdos, es causada por el helminto cestodo *Taenia solium*. Estas parasitosis son consideradas un problema de salud pública en la mayoría de los países en vías de desarrollo, en los cuales se ve favorecida por las condiciones sociales, económicas y culturales. (Flisser, 2003). En México, no se tienen datos precisos actualizados de la incidencia de esta infección. Sin embargo, se encontró en aproximadamente el 2 por ciento de las necropsias de adulto, y fue el motivo de 20 al 25 por ciento de las craneotomías en las instituciones especializadas, además de ser la principal causa de consulta neurológica por epilepsia a mitad del siglo pasado. (Zenteno 1965; Del Brutto OH 1988).

En nuestro país, la transmisión es favorecida por costumbres endémicas de comunidades regularmente pobres, tales como la extensión de la porcicultura rústica que caracteriza a casi toda la República, fecalismo al aire libre en medios rural y urbano, hacinamiento en la vivienda, insuficiente inspección sanitaria e insalubridad ambiental y conductual. (Larralde, Padilla et al. 1992; Flisser, Sarti et al. 2003)

De ésta forma, la alta incidencia de esta enfermedad parasitaria es consecuencia de los factores y condiciones antes mencionados aunados al proceso del ciclo biológico de la *T. solium*; la cual se desarrolla en dos tipos diferentes de hospederos. En primera instancia, el hospedero definitivo es el humano, que es infectado cuando ingiere al parásito en su forma oncosferral (huevo), que posteriormente se desarrolla de forma intestinal a la fase adulta. El hospedero intermediario típicamente representado por el cerdo, se convierte en reservorios del cisticerco al ingerir huevos provenientes de la fase adulta de la tenia los cuales son expulsados con las heces del hospedero definitivo al ambiente, contaminando no solo el alimento propio del cerdo, sino además, las hortalizas entre otros. Así, se han visto involucradas la hortaliza nacional y la cocina popular en el contagio de la cisticercosis y de la teniasis. (Larralde, Padilla et al. 1992; Flisser, Sarti et al. 2003)

Por otro lado, se ha reportado que la infección presenta variación en la incidencia, intensidad, y agudeza. Estas variaciones pueden estar relacionadas a diversos factores genéticos, inmunológicos,



ambientales, y sobre todo sexuales. En este marco de investigación, se tienen datos del 2002 que muestran que la infección en cerdos machos se ve favorecida por la castración y en hembras por el estado de gestación. Adicionalmente, existen datos de 1988 los cuales reportan que las mujeres con neurocisticercosis desarrollan mayor inflamación que los hombres, cuando los cisticercos son encontrados en el parénquima cerebral, además de que la cantidad que presentan de células pro-inflamatorias en líquido cerebro espinal es mayor que en los hombres. (Del Brutto OH 1988; Scitutto, Fragoso et al. 1991; Morales, Velasco et al. 2002)

Este mismo comportamiento se ha observado en la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*, la cual es utilizada como una estrategia alternativa para estudiar la relación cisticercos-hospedero, por las semejanzas que presenta con el parásito natural que produce la enfermedad en el hombre y en el cerdo, la *T. solium*. En dicha infección, se ha observado que existen diferencias en la agudeza representadas por la carga parasitaria, además del efecto que produce dicha infección en la variación de los niveles séricos de hormonas esteroides, tanto en hembras como en machos. Lo que supone la existencia de una estrecha relación entre el ambiente hormonal propio de cada género, la infección y la capacidad de establecimiento del parásito (Scitutto, Fragoso et al. 1990; Scitutto, Fragoso et al. 1991; Huerta, Terrazas et al. 1992; Bojalil, Terrazas et al. 1993)

El esclarecer si el cisticerco es afectado directamente por las hormonas esteroides como el E<sub>2</sub> es importante, ya que se puede dar pauta al diseño o uso de análogos hormonales que afecten solo al cisticerco y no al huésped. Conocer los medios por los que el parásito es directamente afectado por los esteroides sexuales, a través de lo que pudieran ser mecanismos clásicos mediados por receptor, o a través de diversas vías de señalización, nos dará la pauta para conocer más a fondo la fisiología del cisticerco y determinar a nivel genético nuevos blancos para atacar y afectar su establecimiento y/o crecimiento, utilizando tecnologías como la terapia anti-sentido y/o la terapia hormonal.



## 1.0 ANTECEDENTES

### 1.1 Interacciones inmunoendocrinas: la infección parasitaria y su interacción con hormonas esteroides.

En adición a los efectos que tienen sobre la diferenciación sexual y la reproducción, las hormonas sexuales parecen tener influencia sobre el sistema inmune, lo que resulta en la existencia de un dimorfismo en dicha respuesta. Las hembras se caracterizan por producir una respuesta celular y humoral más pronunciada, además de presentar resistencia a ciertas infecciones. Así mismo, los niveles de esteroides sexuales en un sexo y otro pueden determinar la diferencia entre la respuesta inmune de ambos al mismo estímulo antigénico, o bien, pueden determinar funciones inmunológicas diferentes entre ambos sexos. (Annechien Bouman 2005)

Con respecto a la existencia del dimorfismo en la respuesta inmune fue en 1979 cuando se encontraron los primeros reportes describiendo la presencia de receptores a esteroides sexuales en el timo, aunque las primeras observaciones que evidenciaron la relación entre el sistema inmune y endocrino fueron aportados por el científico italiano Calzolari en 1898, cuando publicó que el timo de conejos castrados antes de la madurez sexual era más grande que los animales controles. Posteriormente la existencia del dimorfismo inmunológico fue demostrado con la observación de que las hembras de diferentes especies producen niveles más altos de inmunoglobulinas circulantes, y típicamente presentan una respuesta inmune de tipo humoral más pronunciada en contra de la infección, al mismo tiempo que la producción de anticuerpos autorreactivos es más frecuente en hembras. (Annechien Bouman 2005; De Leon-Nava and Morales-Montor 2006)

En este mismo marco de referencia se ha demostrado el papel que juegan los estrógenos en la respuesta inmunológica, ya que se ha demostrado que estos incrementan la respuesta de células B tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que los andrógenos y la progesterona disminuyen la producción de anticuerpos. Entonces, la influencia que tienen las hormonas sexuales sobre gran cantidad de fenómenos implicados en la respuesta inmune no solo incluyen la maduración, selección de timocitos, el tránsito celular, proliferación de linfocitos, expresión de moléculas, y producción de citocinas, si no que,



en este aspecto se ha sugerido que los estrógenos potencian la inmunidad mediada por células B y suprimen algunos aspectos dependientes de células T, mientras que la testosterona parece suprimir la respuesta mediada tanto por células B como células T. (Annechien Bouman 2005; De Leon-Nava and Morales-Montor 2006)

Específicamente, se ha observado que la prevalencia e intensidad en la mayoría de infecciones causadas por protozoarios, nematodos, trematodos, cestodos y artrópodos es mayor en machos que en hembras, aunque en algunas infecciones las hembras son más susceptibles que los machos. Algunos autores relacionan tales diferencias de la respuesta inmune con la cantidad de hormonas circulantes, incluyendo E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T<sub>4</sub>, así como glucocorticoides. Entre las causas que derivan en estas diferencias en la respuesta inmune contra parásitos pueden incluirse interacciones hospedero-patógeno que pueden ser afectadas por el sistema endocrino, las cuales a su vez pueden provocar las diferencias inmunológicas entre cada género. (Klein 2004)

Por otro lado los parásitos han desarrollado diversos mecanismos de sobrevivencia dentro del hospedero a fin de facilitar el establecimiento de la infección. Estos mecanismos pueden ser agrupados en dos tipos: los primeros evaden la respuesta inmune usando estrategias tales como variación antigénica, mimetismo molecular, o bien afectando el procesamiento de antígenos en la presentación. En el segundo mecanismo los parásitos explotan el sistema del hospedero en su beneficio, obteniendo algunas ventajas como su establecimiento, crecimiento y reproducción. (Escobedo, Roberts et al. 2005)

Recientemente, la evidencia experimental ha sugerido que los parásitos no solo evaden la respuesta inmune activamente, si no que explotan el microambiente hormonal del hospedero en su favor. Los parásitos obtienen grandes beneficios por medio de la explotación hormonal, hecho que puede ser debido a que han desarrollado estructuras similares a receptores a hormonas esteroides y proteicas expresadas en vertebrados superiores, de tal manera que pueden ser capaces de unir metabolitos sintetizados por el hospedero. Esta estrategia está mejor ejemplificada por dos parásitos que responden a esteroides adrenales y esteroides sexuales: *Schistosoma mansoni* y *Taenia crassiceps* respectivamente. (Abebe, Birkeland et al. 2003; Escobedo, Larralde et al. 2004)



En base a las evidencias presentadas anteriormente se ha propuesto un sistema de trans-regulación como el mecanismo por el cual los parásitos explotan al hospedero en su favor, en el cual el parásito es beneficiado por medio de factores de crecimiento y hormonas del hospedero. Este mecanismo ha sido descrito en diferentes infecciones parasitarias causadas por protozoarios y metazoarios. (Escobedo, Roberts et al. 2005)

El nombrado sistema de trans-regulación se ha observado en *Plasmodium falciparum*, en donde el tratamiento *in vitro* de merozoitos con cortisol incrementa el número y tamaño de gametocitos; en cambio cuando estos parásitos son tratados con un análogo de dehydroepiandroterona (DHEA), la 16- $\alpha$ -bromoepiandrosterona el crecimiento se ve disminuido hasta en un 25%. Del mismo modo, se ha encontrado que el cortisol estimula la proliferación y síntesis de ADN de *Entamoeba histolytica* dependiendo de la dosis, mientras que el tratamiento de trofozoitos con DHEA inhiben su proliferación, motilidad y adhesión, además de causar lisis con el aumento en la dosis. (Maswoswe, Peters et al. 1985; Lingnau, Margos et al. 1993; Freilich, Ferris et al. 2000; Carrero, Cervantes et al. 2006).

Las hormonas esteroides adrenales también han sido implicadas como factores importantes del hospedero, ya que controlan el establecimiento y patogénesis para el caso de esquistosomiasis, puesto que se ha mostrado que hay una estrecha relación entre los niveles de DHEA -sulfato (DHEA-S)- en sangre y la intensidad de la infección causada por *Schistosoma mansoni* y la respuesta inmune humoral en humanos. Se ha observado que un incremento en los niveles de DHEA-S en jóvenes de 15 a 19 años conllevan a la disminución progresiva de la intensidad de la infección. Más aún, se ha demostrado que la DHEA tiene un efecto protector en esquistosomiasis murina y que el tratamiento *in vitro* con testosterona inhibe su fecundidad. (A. J. C. Fulford 1998)

Otro ejemplo claro que evidencia la transregulación es el caso de los amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, los cuales al ser tratados *in vitro* con factor de crecimiento epidermal murino (EGF) incrementan considerablemente su síntesis de ADN, crecimiento y actividad metabólica, de forma similar el EGF tiene un efecto estimulante sobre el desarrollo y maduración de microfilarias de *Brugia malai*. (Dissanayake 2000; Ghansah, Ager et al. 2002)



## 1.2 Estrógenos

### 1.2.1 Síntesis y acciones fisiológicas de los estrógenos.

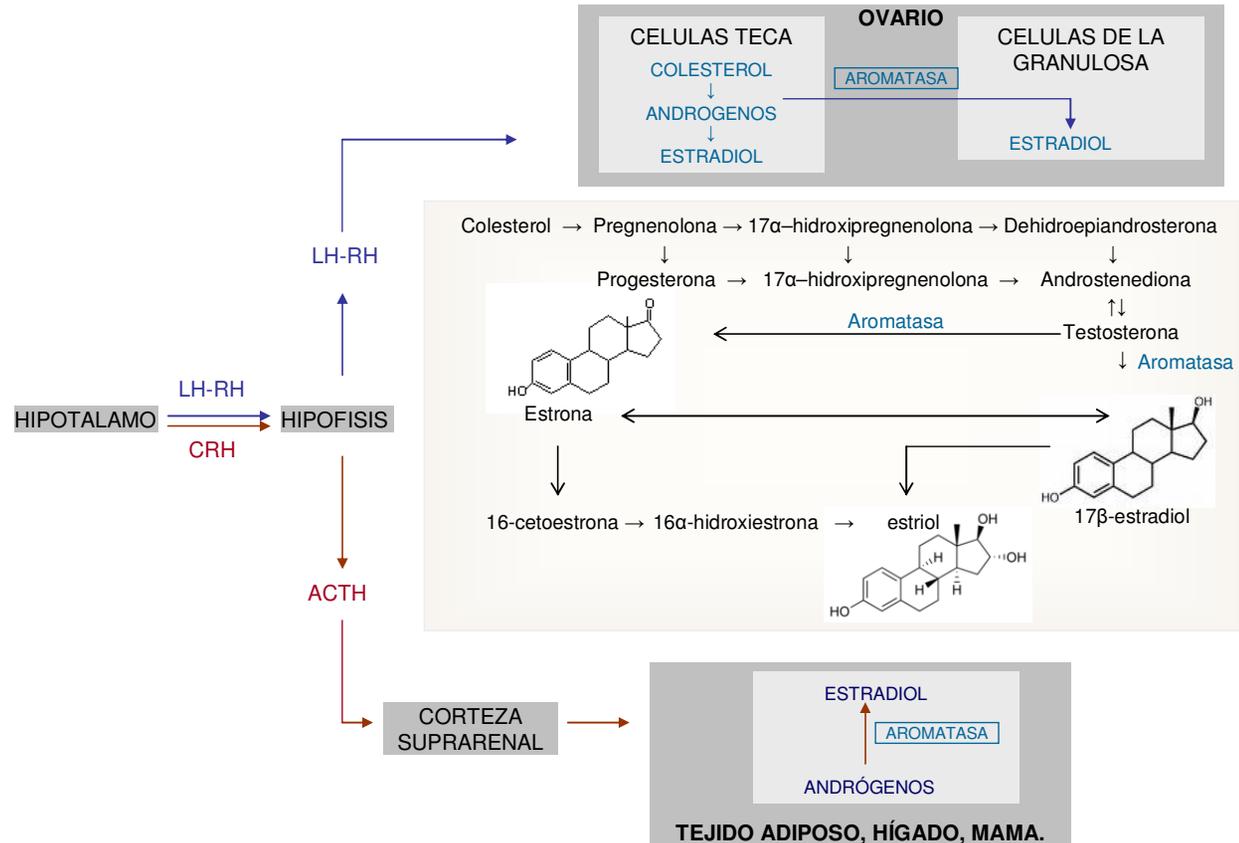
Los estrógenos son hormonas de naturaleza esteroidea que tienen múltiples acciones biológicas. Los estrógenos biológicamente más activos en vertebrados son el 17- $\beta$ -estradiol, la estrona y el estriol. Los estrógenos son producidos principalmente en el ovario, y el 17- $\beta$ -estradiol es la forma circulante más común. Afectan el crecimiento, la diferenciación y la función de los tejidos del sistema reproductivo, que incluyen: glándula mamaria, ovarios, útero y vagina, aunque también tienen funciones reguladoras en otros tejidos del organismo.

Algunas de las funciones en tejido no reproductivo involucran al hueso, en donde suprimen la síntesis de IL-1, IL-6, y el factor de necrosis tumoral. Los estrógenos producen vasodilatación, al incrementar la formación y descarga de óxido nítrico y de prostaciclina, y reducen el tono vascular e inhiben la apoptosis de las células endoteliales. En el hígado, estimulan la producción de proteínas, factores de la coagulación y receptores para lipoproteínas hepáticas. Es probable que en el colon tengan efectos anticancerígenos. En la piel y las mucosas, favorecen su hidratación y cornificación, y por último causan retención hídrica. Además de las acciones antes mencionadas, es posible que en el cerebro tengan un efecto protector al interactuar de forma sinérgica con las neurotrofinas, reducen la generación beta amiloide, activan la glía e inducen sinapsis, y remodelación de las dendritas. (Teppa Garran 2005, Ganong 2001).

Los estrógenos se secretan principalmente por las células de la granulosa de los folículos ováricos, el cuerpo lúteo y la placenta. Su vía biosintética inicia a partir del colesterol, aunque también se producen por aromatización de la androstenediona en la circulación. La aromatasa CYP 19 es la enzima catalizadora de la conversión de la androstenediona en estrona y la conversión de la  $T_4$  en  $E_2$  (Figura 1). Por vía del cAMP, y en respuesta a la hormona luteinizante (LH) las células de la teca incrementan la conversión del colesterol en androstenediona, y de esta última solo una pequeña fracción se convierte en  $E_2$ , la cual ingresa a la circulación. Las mismas células de la teca interna suministran androstenediona a las células de la granulosa, las cuales elaboran el  $E_2$ . Estas células



## Determinación de la presencia del Receptor a Estrógenos en el cisticerco de *Taenia crassiceps*



**Figura 1.** Biosíntesis y Metabolismo de los Estrógenos. (Modificado de Ganong, 2001). La producción ovárica de estrógenos está regulada por las gonadotropinas hipofisarias, dependientes a su vez de los pulsos de LH-RH hipotalámicos. La enzima clave en la producción de estrógenos es la P-450 aromatasa, que convierte andrógenos como testosterona o androstendiona en estradiol y estrona, respectivamente. Una segunda ruta posible de producción de estrógenos ocurre mediante la conversión periférica de los andrógenos suprarrenales. Éstos están bajo control de la ACTH hipofisaria. La aromatasa también se expresa en otros tejidos, como el hígado, el tejido adiposo y la propia mama.



aumentan la actividad de la aromatasas al ser estimuladas por la hormona foliculo estimulante (FSH), facilitando la secreción de  $E_2$ , al mismo tiempo las células maduras de la granulosa adquieren receptores para la LH, la cual también estimula la producción de  $E_2$  (Figura 1)

### 1.2.2 *El receptor a estrógenos*

El Receptor a Estrógenos (ER) es una proteína perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas. Fue identificado hace aproximadamente 40 años, en 1962 por Jensen y colaboradores, quienes describieron la presencia de sitios de unión a estrógenos en diferentes tejidos en ratas (Jensen 1962). Cuatro años más tarde, Toft y Gorski aislaron por primera vez al ER a partir del útero de ratas. En 1996, fue descubierto un nuevo receptor que comparte gran homología con el RE conocido. A la nueva molécula se le denominó entonces receptor a estrógenos  $\beta$  (RE- $\beta$ ), y en consecuencia receptor a estrógenos  $\alpha$  (RE- $\alpha$ ) al primeramente descrito (Toft and Gorski 1966; Kuiper, Enmark et al. 1996)

Los tipos de RE  $\alpha$  y  $\beta$ , presentan en total 45% de homología y contienen la misma regionalización funcional, y presentan 96% de homología en el dominio de unión al DNA, (DBD), y 56% en el dominio de unión a la hormona (HBD). Son codificados por 2 genes distintos, y el gen del RE- $\alpha$  humano se localiza en el cromosoma 6q25.1,20 y el RE- $\beta$  en el cromosoma 14q22-24.16 El primero codifica para una proteína de 65 kDa, formada por 595 aminoácidos (aa), se localiza principalmente en mama, útero, hipotálamo, hipófisis y ovario. El segundo codifica para dos isoformas, una de 55 kDa (485 aa) y otra de 60 kDa (530 aa), las cuales se expresan principalmente en riñón, timo, pulmón, bazo, hipotálamo, hipófisis, próstata, testículo, ovario, sistema digestivo, vejiga y glándula mamaria. Las 2 formas pueden coexistir en el mismo tejido y en las mismas células y se encuentran formando heterodímeros funcionales entre ellos.(Barron-Gonzalez, Arias-Martinez et al. 2001)

El RE- $\alpha$  tiene un tiempo de vida media de cuatro a siete horas y está constituido por 595 aminoácidos. Puede formar dímeros con otros receptores de su misma clase (homodímeros) o con el RE- $\beta$  (heterodímeros), al igual que estos últimos pueden formar homodímeros entre sí o heterodímeros con los receptores  $\alpha$ . Como resultado, se establecen diferentes respuestas de los estrógenos en los



tejidos, según la capacidad de las células para expresar uno o ambos de los receptores. Al igual que el resto de receptores para hormonas esteroideas, el receptor de estrógenos está formado por 6 dominios denominados por las letras “A” a la “F” (Figura 2). La región A/B está localizada en el lado amino terminal de la proteína y es la región menos conservada, este dominio tiene la función de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1), además de tener varios sitios de fosforilación los cuales son importantes en el proceso de activación del receptor de membrana, especialmente en procesos donde el receptor es activado en ausencia de la hormona. Adyacente a éste, se encuentra el dominio “C” el cual es la región de unión al ADN y es la región más conservada entre los receptores a esteroides. La unión a una secuencia específica de ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre dos dedos de Zn<sup>+</sup> los cuales están coordinados en medio de nueve residuos de cisteínas las cuales son invariablemente conservadas entre los receptores esteroideos. Entre la región de unión al DNA y la región E/F se encuentra la región D o región de la bisagra la cual es importante mientras que el receptor se encuentre en un estado inactivo. Finalmente en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región E/F o región de unión al ligando, donde se une la hormona E<sub>2</sub>. Está región a pesar de ser conservada es altamente específica para su hormona. Otras funciones de activación de este dominio son el de la de transcripción o AF-2 (Activation Function 2), dimerización, interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear. (Freedman 1992; Kato, Endoh et al. 1995; McDonnell 2004; Dahlman-Wright, Cavailles et al. 2006)



Figura 2 Estructura y dominios funcionales del ER (Freedman 1992; Kato, Endoh et al. 1995; McDonnell 2004; Dahlman-Wright, Cavailles et al. 2006) . DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando; AF1: dominio de activación 1; AF2: dominio de activación 2.



Los dos dominios del receptor estrogénico  $\alpha$  (AF-1 y AF-2) pueden actuar de manera sinérgica o independiente, lo cual explica la selectividad tisular de muchos ligandos. Para alcanzar la máxima actividad transcripcional del ER es necesario activar ambos dominios. (Dahlman-Wright, Cavailles et al. 2006)

### 1.2.3 Efectos Moleculares del receptor a estrógenos

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor esteroideo se activa al unirse a su ligando, en este caso el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes. Este modo de acción de los esteroides es denominado genómico. (Evans 1988)

Los receptores estrogénicos son fosfoproteínas cuya función puede ser modificada por cambios en su fosforilación en ausencia de unión a un ligando hormonal. Por ejemplo, los activadores de las proteincinasas, como los factores de crecimiento, pueden producir la activación del ER mediante la fosforilación de diferentes zonas de la molécula, independientemente de la acción de los estrógenos. Kato y colaboradores determinaron que los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico que actúan en los receptores tirosina cinasa pueden activar también a los receptores estrogénicos por fosforilación directa de ciertos residuos. (Kato, Endoh et al. 1995)

Además, los receptores de estrógenos pueden aumentar las concentraciones de diferentes moléculas de las vías de mensajeros de los factores de crecimiento insulínico. En consecuencia, los estrógenos pueden activar a los receptores estrogénicos mediante dos vías: 1) la vía clásica de interacción con el receptor estrogénico nuclear y 2) por medio de efectos no genómicos, mediante factores de crecimiento que incrementan la actividad de las proteincinasas (Falkenstein, Tillmann et al. 2000)

Sus acciones nucleares específicas están determinadas por la estructura de la hormona, el tipo de receptor de estrógeno implicado, las características del gen blanco promotor y el equilibrio entre las proteínas coactivadoras y correpresoras que modulan la respuesta transcripcional final del complejo



entre estrógenos y sus receptores (McDonnell 2004). Una vez en el interior de las células, los estrógenos se unen a su receptor y establecen el complejo estrógenos-RE, que requiere la separación de las proteínas de estrés asociadas al RE, las cuales lo estabilizan en su estado inactivo y lo ayudan a plegarse en una configuración apropiada que le otorga protección contra la degradación por parte de las proteasas celulares para resguardar su actividad biológica. Luego, los receptores estrogénicos experimentan un cambio de configuración alostérico de su estructura, lo cual los convierte en una forma activa capaz de interactuar con el sistema de transcripción de los genes. El cambio conformacional le permite la interacción de los sitios específicos de unión al DNA del receptor con secuencias específicas del mismo, conocidas como elementos de respuesta a estrógenos, que se encuentran en las regiones reguladoras de los genes blanco de los estrógenos, entonces el proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que incluye diferentes co-activadores, co-represores y diferentes proteínas reguladoras de la transcripción. Luego, se inicia la transcripción a través de la enzima RNA polimerasa y posteriormente se forma el RNA mensajero (RNAm), que migra al citoplasma, donde se realiza la traducción (síntesis proteínica) en los ribosomas, como se describe en la Figura 3. El proceso de transcripción es regulado dependiendo del tejido donde ocurre, este control sumamente específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción. Un grupo de factores transcripcionales basales interactúa con el complejo hormona-receptor para formar un complejo de preiniciación a la cual se le van a unir una serie de proteínas co-reguladoras llamadas proteínas de interacción con receptores (RIPs por su siglas en inglés). Estos co-reguladores pueden activar (co-activadores) o reprimir (co-represores) la transcripción. En algunas células, la proteína del citosol caveolina-1 estimula el proceso de translocación del complejo estrógenos-ER al núcleo. (Lieberman 1997; Klein 2004; Teppa Garran and Teran Davila 2005)

Para la eficiente activación de los genes, al RE deben acoplarse otros factores de la transcripción para formar complejos multiméricos estables que induzcan a la RNA polimerasa a iniciar la transcripción de los genes. Las proteínas correguladoras están intercaladas entre el RE activado y la “maquinaria” transcripcional, por lo tanto funcionan como intermediarios de las señales entre el receptor y la transcripción general. Éstas modulan la capacidad transcripcional del RE y pueden incrementarla (coactivadores), disminuirla (correpresores) o funcionar como cointegradoras celulares para otras proteínas, que modifican a su vez a la transcripción. En general, las proteínas correpresoras poseen actividad de acetilasa de histonas, que silencia la transcripción al condensar más a la cromatina mientras



las proteínas coactivadoras y cointegradoras poseen actividad metilasa de histonas, que transfieren grupos metilo a las histonas, las cuales pierden su interacción con el DNA, permitiéndoles exponer importantes residuos del mismo a la “maquinaria” transcripcional basal. Después de la formación y del cambio conformacional del complejo estrógenos-RE se produce la presentación de nuevas superficies, exponiendo a otros aminoácidos, con la capacidad de interactuar con diferentes polipéptidos, para poder activar en forma simultánea la transcripción. De esta manera y de acuerdo con el contenido intracelular de las proteínas reguladoras, el tipo y la densidad de los receptores, así como los cambios conformacionales del receptor estrogénico, es que se modulan varias respuestas en muchos tejidos, lo cual explica la inducción de mensajes heterogéneos (Korach 1994; McDonnell 2004)

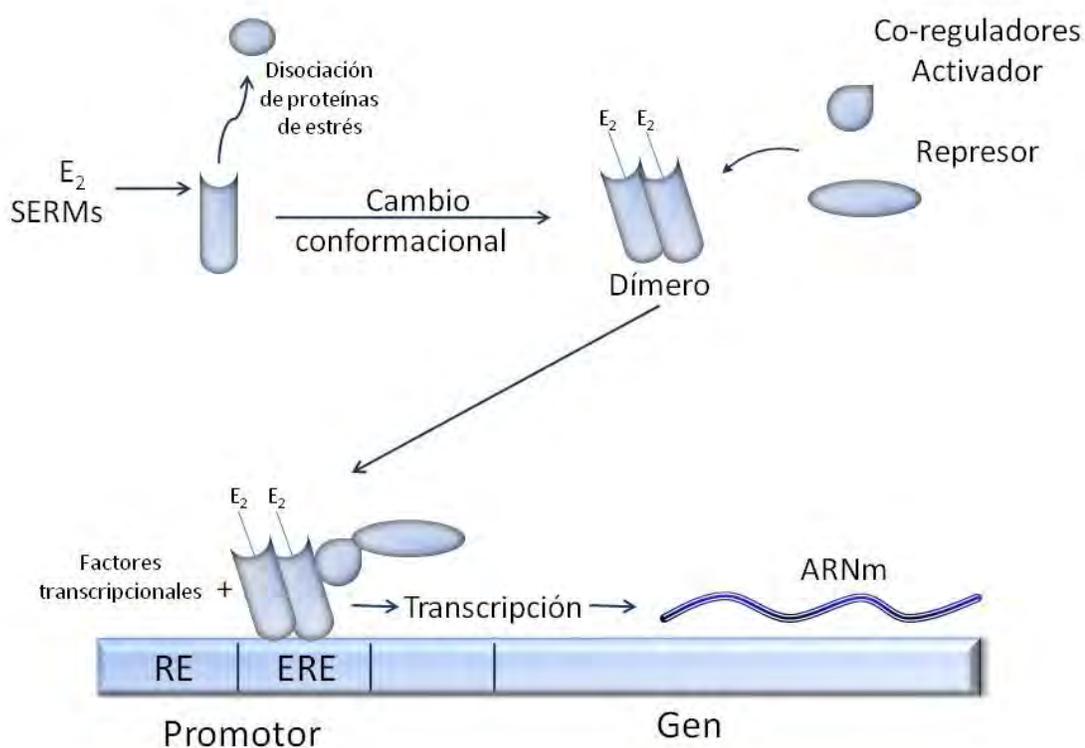


Figura.3 Mecanismo de acción genómico de los estrógenos. (Tomado de Teppa Garran, A. D. and J. Teran Davila, 2005). RE: receptor a estrógenos; ERE: elementos de respuesta a estrógenos; ARNm: Acido ribonucleico mensajero; SERMs moduladores selectivos de los receptores estrogénicos.



El modo de acción no genómico del E<sub>2</sub>, y en general de todas las hormonas esteroideas, es un proceso rápido que ocurre en pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de proteínas para poder producir su efecto primario, por esta razón debe de ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Entre estos efectos rápidos se encuentra el flujo de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas cinasas asociadas a la membrana.(Falkenstein, Tillmann et al. 2000)

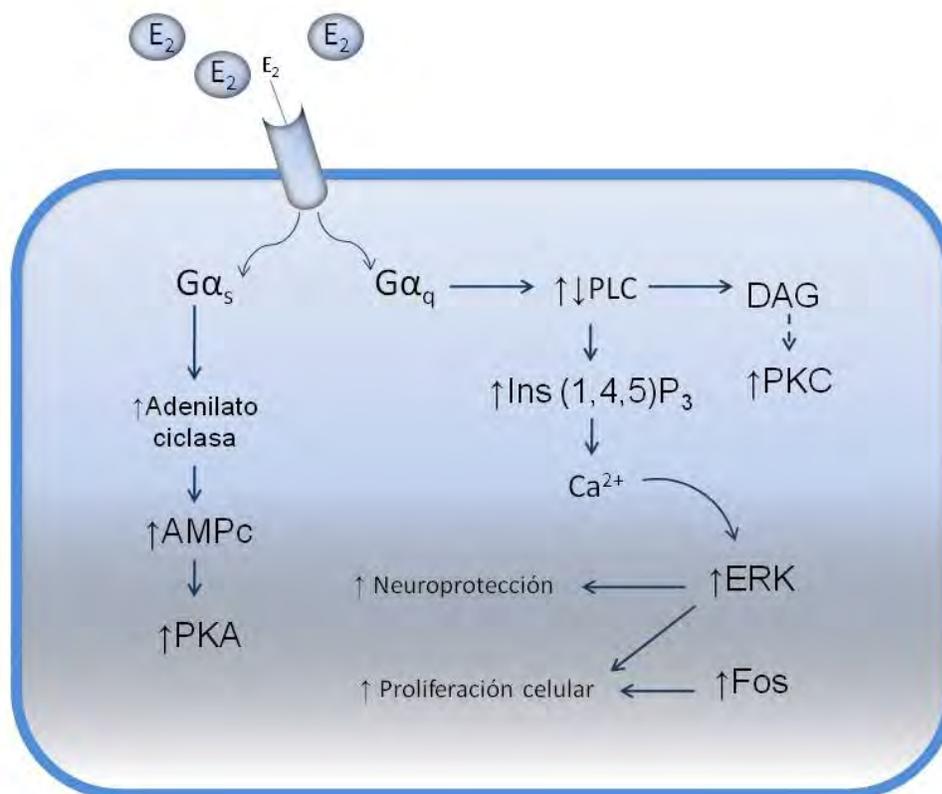


Figura 4. Esquema de las señales de transducción moduladas cuando el ER une a su ligando (Levin 1999). El ER de membrana activa la subunidad  $\alpha$  de varias proteínas unidas a GTP lo que inicia la transducción de señales como se muestra en el esquema. La línea punteada indica que DAG puede inducir indirectamente la activación de PKC. Adicionalmente El ER de membrana puede modular JNK. Ca<sup>2+</sup>: calcio intracelular; DAG: diacilglicerol; E<sub>2</sub>: estradiol; ER: receptor a estrógenos; ERK: señalización extracelular regulada por cinasas; G<sub>s</sub>q G<sub>s</sub>: proteínas G; Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>: inositol(1,4,5) trifosfato; JNK: cinasas Jun; PKA: proteína cinasa A; PKC: proteína cinasa C; PLC: fosfolipasa C.

También es bien sabido que el E<sub>2</sub> puede modular la producción de óxido nítrico (NO) en células endoteliales y de otros tipos. Aunque el E<sub>2</sub> puede alterar los niveles de RNAm que codifica la enzima



NO sintasa (NOs), también tiene acciones que provocan una rápida regulación de la actividad de ésta enzima. Recientemente, se ha encontrado que la activación de la NOs podría ser desencadenada rápidamente a través de un mecanismo relacionado a ERK (señalización extracelular regulada por cinasas) en cultivo de células endoteliales. Esta acción del E<sub>2</sub> es atribuida a la activación del ER de membrana. Además, recientemente, la expresión de genes que codifican para el ER- $\alpha$  y el ER- $\beta$  en células de ovario de hámster chino (los cuales normalmente no expresan ambos genes) han llevado a varias propuestas acerca de la naturaleza y derivación del RE de membrana. Se ha encontrado que la expresión de un solo cDNA codifica tanto para los receptores nucleares como para el receptor de membrana. Sin embargo la afinidad del ER para el E<sub>2</sub> en ambos compartimentos es casi idéntica. (Levin 1999)

Los receptores de membrana pueden señalizar a ERK, pero también pueden activar proteínas G, tanto la proteína G $\alpha_q$  y la G $\alpha_i$ , lo cual es consistente con las evidencias acerca de que el E<sub>2</sub> causa activación de PCL, modifica el flujo de Ca<sup>2+</sup>, y promueve la generación de AMPc. Además de que el ER de membrana puede modular la activación de jun MAPK, misma que contribuye potencialmente a varios aspectos como proliferación celular, diferenciación y funciones metabólicas (Levin 1999). Las acciones del ER de membrana se describen en la figura 4.

### **Antiestrógenos:** *moduladores selectivos del RE*

Estos compuestos son de naturaleza no-esteroidea, el 4-hidroxi-tamoxifén es el antiestrógeno más potente. Presentan propiedades agonistas y antagonistas y se denominan moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (MSRE), debido a que pueden actuar de manera diferente dependiendo del órgano blanco. Todos estos fármacos comparten un mecanismo de acción común a través del RE. Su acción se inicia con la unión de estos compuestos al RE, lo cual permite la dimerización del receptor, así como la unión del complejo hormona- receptor al ERE presente en algunos genes. El efecto antiestrogénico se lleva a cabo a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción TAF-2, pero no del TAF-1, el cual se mantiene activo. Este mecanismo es, en principio, la razón de su actividad como agonista/antagonista; sin embargo, recientemente se describió un tercer sitio de activación llamado AF2a, el cual puede funcionar cuando AF1 y AF2 están inactivos. Además de esto, y para hacer más complejo este mecanismo, hay evidencias que sugieren que los antiestrógenos se unen de



manera diferente a los TAF, dependiendo de la concentración del fármaco, siendo TAF-2 el de mayor afinidad. Un ejemplo de ello es el efecto antiestrogénico parcial del Tamoxifén, cuya acción a bajas concentraciones se lleva a cabo a través del bloqueo de TAF-2, en tanto que a concentraciones altas inhibe totalmente la acción del RE, bloqueando tanto TAF-1 como TAF-2.(Barron-Gonzalez, Arias-Martinez et al. 2001)

#### *1.2.4 Efectos de los estrógenos en la Inmunidad.*

Dentro de las acciones que ejercen los estrógenos, una que podría ser importante es la modulación de la inmunidad y autoinmunidad; uno de los mecanismos por los cuales podrían tener acción es por medio de la regulación de la secreción de citocinas. Varios estudios con respecto a esta línea de investigación han mostrado que el estradiol promueve la estimulación de la respuesta tipo Th1 mediada por la cantidad de células productoras de IFN- $\gamma$ . En estudios que implican procesos inflamatorios dependientes de células T, se ha observado que los estrógenos regulan y no solo reducen el número de células en el sitio de inflamación, sino que también disminuyen la expresión de marcadores de activación como CD40, CD44, CD69 y del receptor de IL-2. Además de que la expresión de IL-2 y de IFN- $\gamma$  se notan disminuidas, los de IL-4 e IL-10 fueron aumentados. En otros trabajos se ha reportado que los estrógenos inducen un incremento en la producción de citocinas tipo Th2 como IL-5 y la disminución de citocinas tipo Th1 tales como la IL-2. A nivel molecular se ha descrito que la región promotora del gen IFN- $\gamma$  tiene un elemento de respuesta a estrógenos y se ha encontrado un incremento de los transcritos de este gen en linfocitos estimulados con estrógenos. De manera más general, los estrógenos al parecer tienen una acción dual sobre la polaridad de la respuesta inmune que depende de la concentración del esteroide. Algunos estudios sugieren que el estradiol podría potencializar tanto la producción de citocinas tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) como de tipo Th2 (IL-10), ya que se ha observado que su acción dual depende de la concentración de estrógenos, en donde a bajas concentraciones se estimula la secreción de IFN- $\gamma$  y a altas concentraciones ( $> 5,000 \text{ pg ml}^{-1}$ ) estimulan la secreción de IL-10 por parte de clones de células T, y que del mismo modo tiene un efecto similar en la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF) potenciando su producción a bajas concentraciones y



disminuyéndola a altas dosis. Los efectos de esta hormona pueden ser pro o antiinflamatorios si la concentración es alta o baja respectivamente. (De Leon-Nava and Morales-Montor 2006).

### **1.3 Efecto de los estrógenos en la infección causada por *Taenia crassiceps***

*Taenia crassiceps* es un cestodo helminto del orden de los ciclofilideos (Chandler, 1955). Como la mayoría de los cestodos, exhibe un ciclo vital complejo, con la participación de un hospedero intermediario y uno definitivo. El hospedero intermediario está representado por diversas especies de roedores (*Mus musculus*, *Microtus arvalis*, *Peromyscus vulgaris*, entre otros) en los cuales se desarrolla la forma larvaria del parásito, conocido como cisticerco, que presenta cierta afinidad para alojarse a nivel del músculo esquelético. El hospedero definitivo se desarrolla en el intestino de cánidos, de forma más común en los zorros (*Canis lupus*, *Canis familiaris*), los cuales se infectan al depredar al hospedero intermediario. Una vez establecido, este gusano hermafrodita puede autofecundarse y producir diariamente miles de huevos los cuales una vez liberados al ambiente con las heces serán ingeridos por el hospedero intermediario, donde se desarrollará el cisticerco, cerrando así el ciclo de vida de éste, tal como se describe en la Figura 5 (Freeman 1962)

La cisticercosis experimental murina inducida por inoculación intraperitoneal del cisticerco de la *Taenia crassiceps*, constituye una excelente estrategia experimental para el estudio de diferentes aspectos de la relación hospedero-parasito, debido a que causa en los ratones una infección de naturaleza crónica, durante la cual el parásito se multiplica constantemente sin afectar aparentemente la sobrevivencia del hospedero, hecho similar al que sucede durante la cisticercosis porcina (Huerta, Terrazas et al. 1992; Terrazas, Bojalil et al. 1994)

Durante la cisticercosis experimental con *Taenia crassiceps*, se ha descrito una marcada susceptibilidad asociada al sexo de los ratones, en donde las hembras de varias cepas son más susceptibles que los machos durante la infección aguda, sin embargo, durante la infección crónica (después de 4 semanas) las cargas parasitarias se incrementan masivamente en ambos sexos hasta alcanzar hasta miles de metacestodos por hospedero, este cambio en la susceptibilidad de los machos



se ha asociado con un proceso de feminización que involucra un aumento en los niveles de estradiol en suero de hasta 200 veces el fisiológico y con la reducción de hasta el 90% de los niveles de testosterona en comparación con los valores control. Debido a que las gónadas son necesarias para que haya el aumento de E<sub>2</sub>, se han hecho estudios con ratones hembras gonadectomizadas y parasitadas, los cuales no mostraron cambios detectables en los niveles de estas hormonas. (Sciutto E., 1990; Huerta L., 1992)

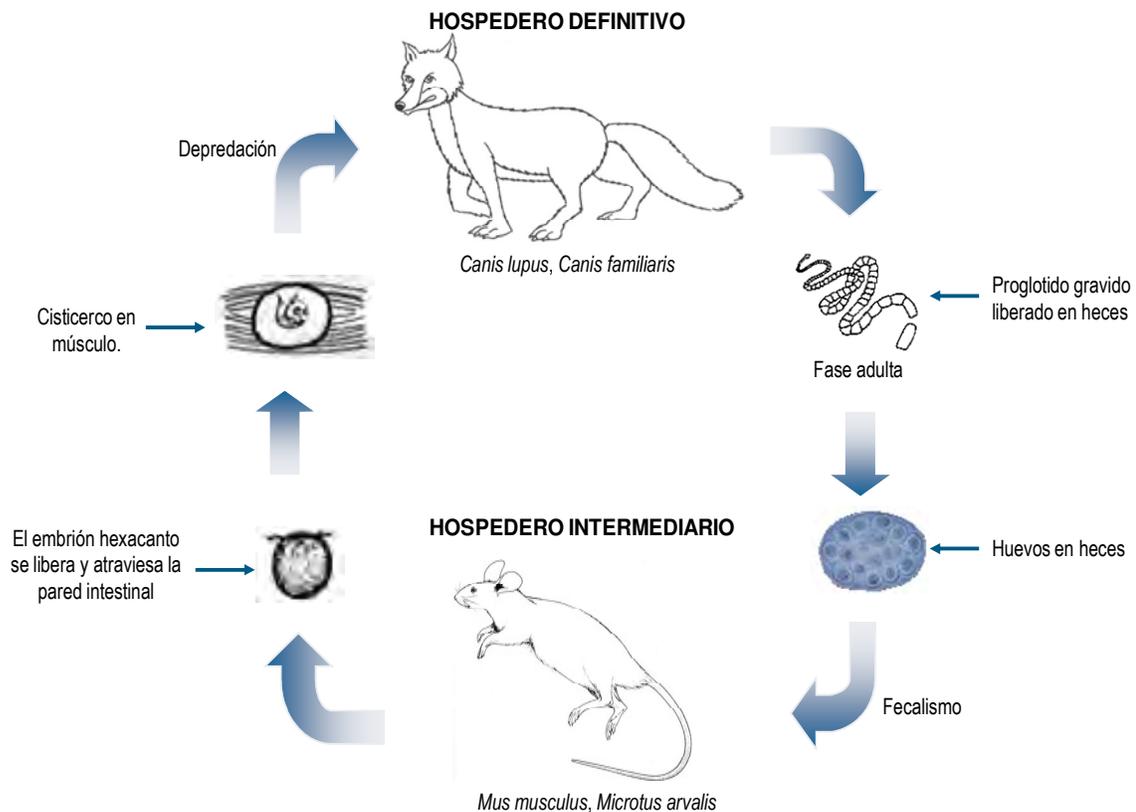


Figura 5. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. (Freeman 1962). El ciclo de vida en su forma silvestre involucra dos hospederos, el hospedero definitivo está representado por especies de *Canis lupus*, o bien *Canis familiaris*, los cuales desarrollan la fase adulta de forma intestinal, misma que libera al ambiente millones de huevos microscópicos provenientes de los proglótidos grávidos. El hospedero intermedio, representado por diversas especies de roedores se infecta al consumir alimento contaminado con huevos (fecalismo), el embrión hexacanto se libera y atraviesa la pared intestinal y desarrolla la fase larvaria o cisticerco el cual presenta afinidad por el músculo. El hospedero definitivo desarrolla la fase adulta al depredar a roedores infectados con cisticercos cerrando así el ciclo de vida de la *Taenia*



Durante la infección crónica en el macho se observa un decremento progresivo en la conducta sexual, que comienza con la pérdida de la respuesta de eyaculación seguida de la pérdida de la respuesta de intromisión y culminando con la pérdida total de la conducta de monta a las 16 semanas de infección. Tales disturbios en la conducta sexual han sido relacionados con altos niveles de estradiol y b niveles de testosterona en lo animales parasitados, ya que la conducta sexual es completamente reestablecida después de la reconstitución con testosterona y dihidrotestosterona. (Larralde, Morales et al. 1995)

Además las observaciones histológicas revelan la completa atrofia del aparato reproductor en ratones infectados, caracterizada por infiltración proinflamatoria, dilatación y fibrosis peripeneal de los testículos, vesículas seminales, epidídimos, y próstata. (Morales-Montor, Gamboa-Dominguez et al. 1999)

Los mecanismos moleculares y fisiológicos precisos por los cuales los niveles de esteroides cambian en ratones infectados crónicamente aun no han sido dilucidados, sin embargo puede haber alguna relación de los cambios de expresión de algunas enzimas en las vías enzimáticas de la ruta esteroidogénica. Así mismo se sabe que el E<sub>2</sub> aumentado en ratones crónicamente infectados incrementa los niveles de RNAm de *c-fos* y *c-jun*, dichas proteínas están involucradas en la regulación transcripcional de enzimas de vías esteroidogénicas tales como la enzima P450<sub>scc</sub> (cholesterol side chain cleavage enzyme), la 5 $\alpha$ -reductasa y la P450 aromatasa.(Morales-Montor, Rodriguez-Dorantes et al. 1999)

Estas evidencias sugieren un cambio en la producción de esteroides sexuales, que en las hembras infectadas puede ser producido por el aumento de la expresión de la enzima aromatasa del citocromo P450 y la disminución de la expresión del gen para la isoenzima tipo II 5 $\alpha$ -reductasa, lo cual induce un metabolismo preferencial de la testosterona al estradiol, de tal modo que la modulación del metabolismo de esteroides sexuales puede ser una simple estrategia del cisticerco, involucrando la estimulación de la aromatasa, una enzima clave en la conversión de testosterona a estradiol, basado en que se han reportado evidencias de la participación de la aromatasa en el proceso de feminización, fundadas en que se ha hallado la presencia de altos niveles de expresión de esta en los testículos de ratones parasitados, mientras que se ha observado la disminución de la expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa



esteroidea como una consecuencia de los bajos niveles de testosterona, ya que la enzima está sujeta a la regulación dependiente del sustrato. (Morales-Montor, Rodríguez-Dorantes et al. 1999)

Un importante mediador endocrinológico-inmunológico en el proceso de feminización es la IL-6, esta citocina con funciones múltiples está involucrada en varias vías endocrinas, además del rol inmunológico que tiene durante la infección parasitaria. La IL-6 es producida en muchas células endocrinas y tejidos, y se han demostrado que la IL-6 estimula directamente la actividad de la aromatasa en células cancerígenas. Se ha reportado además el aumento de los niveles de IL-6 en ratones machos durante la infección parasitaria con *Taenia crassiceps*. En adición, se ha observado que los esplenocitos *in vitro* provenientes de ratones machos infectados, producen niveles de IL-6 mayores que los esplenocitos provenientes de ratones normales. (Morales-Montor, Baig et al. 2001)

La feminización de hospedero en infecciones parasitarias demuestra la plasticidad del fenotipo sexual como respuesta a la infección. Este puede ser un mecanismo normal de evasión de la respuesta inmune normal por parte de los parásitos, manipulando de un ambiente hormonal restrictivo a uno más permisivo

Se han reportado efectos del E<sub>2</sub> sobre el cisticerco de *T. crassiceps in vitro*. En dichos experimentos el 17β-estradiol y la progesterona estimulan la reproducción y proliferación. Se demostró que el E<sub>2</sub> y la progesterona promueven su crecimiento sin afectar su viabilidad, el cual está representado en la figura 6 por el número de yemas y la proliferación por la cuantificación de DNA total en cada ensayo. Así mismo se reportó que estos efectos que son dependientes de la concentración y el tiempo de exposición a la hormona. Los efectos comienzan a observarse a las 24 horas de cultivo y presentan sus máximos efectos a los 5 días. Por otra parte se observó que el E<sub>2</sub> tiene mayores efectos estimulatorios que la progesterona y afectan al cisticerco sin la participación del hospedero. También se midió la expresión de genes del complejo AP-1 (*c-fos* y *c-jun*) obteniendo resultados que concuerdan con los datos de proliferación y viabilidad, ya que el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> estimulan la expresión de *c-fos* y *c-jun* los cuales están involucrados en el control de la diferenciación celular, reproducción y apoptosis. (Escobedo, Larralde et al. 2004)



Dichos hallazgos sugieren que no solo las interacciones inmunoendocrinas que ocurren en el hospedero favorecen el establecimiento y reproducción de parásito, sino que además este es capaz de aprovechar las hormonas antes para su reproducción o conservación.

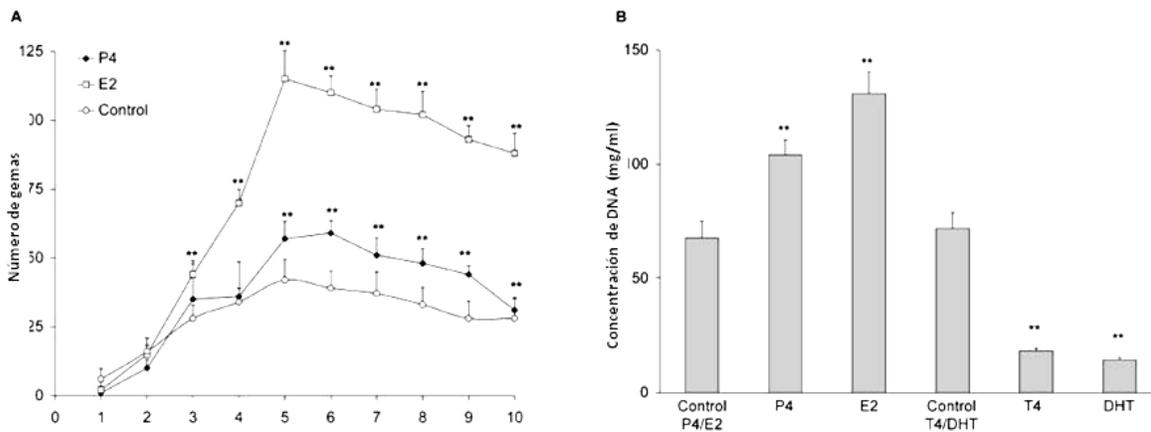


Figura 6 Curvas de reproducción y proliferación de *T. crassiceps* en cultivo tratados con E<sub>2</sub> y progesterona. (Escobedo, Larralde et al. 2004) . **A** En el eje de las “Y” cada punto representa la media del número de gemas de 5 ensayos de cultivos diferentes. La concentración utilizada para E<sub>2</sub> fue de 40 ug/ml y de 20 ug/ml para progesterona. **B** Cuantificación de DNA total. Cada barra representa la media de 3 determinaciones diferentes. Las concentraciones utilizadas fueron las mismas para E<sub>2</sub> y progesterona siendo de 40 ug/ml y de 20 ug/ml respectivamente y para Testosterona (T4) de 4 ug/ml y de dehidrotestosterona (DHT) 6 ug/ml, cada control con la misma concentración de vehículo.



## **2.0 JUSTIFICACIÓN**

Los antecedentes presentados anteriormente, aportan evidencia de la influencia que ejercen las hormonas esteroides, particularmente los estrógenos, sobre la infección parasitaria causada por *Taenia crassiceps*. De tal manera que es claro que los estrógenos juegan un papel importante en la infección, no solo por la manipulación que ejercen sobre la respuesta inmune del hospedero, si no por el efecto directo sobre el parásito. Los efectos que pueden tener los estrógenos sobre el cisticerco, tanto en su diferenciación, crecimiento, establecimiento y reproducción, de forma directa, sin la participación del hospedero no se han explorado, pudiendo ser a través de mecanismos mediados por un receptor clásico.

El demostrar que el parásito es directamente afectado por los esteroides sexuales, específicamente por el E<sub>2</sub>, a través de mecanismos mediados por receptor sobre el genoma, nos dará la pauta para conocer más a fondo la fisiología del cisticerco, y determinar a nivel genético nuevos blancos para atacar y afectar su establecimiento y/o crecimiento, utilizando tecnologías como la terapia antisentido y/o la terapia hormonal.



### **3.0 HIPÓTESIS**

Debido a las evidencias que se han encontrado acerca del efecto que tiene el estradiol sobre el cisticerco de *Taenia crassiceps* se supone la presencia de moléculas similares al receptor a E<sub>2</sub> en el cisticerco.

El tratamiento *in vitro* con dicha hormona y su correspondiente anti-hormona estimularan o inhibirán la expresión de la molécula, la cual será evidenciada por diferentes métodos de identificación, pudiendo aclarar el mecanismo por el cual los estrógenos ejercen su acción sobre el cisticerco.



## **4.0 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de un receptor a estrógenos en el cisticerco de *Taenia crassiceps*, para poder sugerir el mecanismo por el cual el estradiol produce sus efectos directos sobre el cisticerco.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Identificar la presencia del mensajero del Receptor a Estrógenos en el cisticerco de *Taenia crassiceps* haciendo uso de la retrotranscripción y amplificación por la DNA polimerasa (RT-PCR).
- 2.- Determinar la traducción del mensaje del receptor a estrógenos en el cisticerco de *Taenia crassiceps* haciendo por inmunoprecipitación y Western Blot.
- 3.- Corroborar que la presencia del Receptor a Estrógenos no es contaminación del hospedero con la determinación del receptor utilizando Citometría de Flujo
- 4.- Estudiar la localización del receptor a estrógenos en la ultraestructura del cisticerco por medio de microscopia de fluorescencia.



## 5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención de cisticercos.

Los cisticercos de la *Taenia crassiceps* (cepa ORF-WFV) fueron obtenidos a partir de ratones hembras (*Mus musculus*) de la cepa BALB/CA<sub>n</sub>N con 16 semanas de infección. Los cisticercos se obtuvieron de la cavidad peritoneal por medio de una incisión abdominal, se recolectaron en PBS 1x estéril suplementado con 100 U/mL de antibióticos y 100 U/mL de antimicóticos (Gibco, Grand Island) (Esch and Smith, 1976) . A continuación los cisticercos mantenidos en PBS 1X estéril fueron colocados en tubos Falcon de 50 mL y centrifugados por 10 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante fue descartado y este proceso se repitió cinco veces.

### 5.2 Cultivo de cisticercos de *T. crassiceps*.

Utilizando placas de cultivo de 24 pozos (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey), fueron colocados 10 cisticercos por pozo, con 1 mL de medio Advanced D-MEM 1x Gibco 12491-015 (+D-Glucosa, + aa no esenciales, +110 mg de piruvato de sodio, - l-glutamina) suplementado al 5% con HEPES buffer, 2% de L-glutamina y 5% de penicilina-estreptomicina, e incubados a 37°C bajo una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 días. Los tratamientos para el cultivo de los cisticercos se distribuyeron como se describe en la siguiente tabla

Tabla 1. Características de cada Tratamiento para el cultivo de *T. crassiceps*.

Tratamientos	Pozos	individuos/pozo	total de individuos
E <sub>2</sub>	12	10	120
Tmx	18	10	180
Tmx+E <sub>2</sub>	18	10	180
C	12	10	120
C <sub>EtOH</sub>	12	10	120



### 5.3 Tratamiento de los cisticercos con Estradiol.

Las hormona esteroide  $17\beta$ -estradiol [(8R,9S,13S,14S,17S)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta [a]phenanthrene-3,17-diol] grado de cultivo, fueron obtenidas de Sigma-Aldrich. Para los ensayos *in vitro* el  $E_2$  hidrosoluble fue disuelta en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sin suplementar, y posteriormente filtrada, obteniendo una solución de concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{ul}$

### 5.4 Tratamiento de los cisticercos con inhibidor competitivo (Tamoxifen)

Con la finalidad de dilucidar el posible mecanismo a través del cual las hormonas esteroides llevan a cabo sus efectos sobre el parásito, se diseñaron cultivos *in vitro* utilizando el inhibidor tamoxifen, capaz de modular selectivamente el receptor de estrógenos bloqueando su actividad transcripcional ya que esta antihormona que se une específicamente a los receptores nucleares de estrógenos, fue obtenida de Sigma-Aldrich, fue disuelta en etanol absoluto para obtener una concentración de de 10  $\mu\text{g}/\text{ul}$

### 5.5 Extracción de RNA

El RNA total de los cisticercos de la *Taenia crassiceps* en cultivo y tratados con  $E_2$ , Tamoxifen, Control de vehiculo para  $E_2$  (medio sin suplementar), Control de vehiculo para Tamoxifen (Etanol absoluto), fue obtenido mediante el método simple de extracción con Isotiocinato de Guanidina/Fenol/Cloroformo usando Trizol (Trizol Reagent-Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los cisticercos fueron homogeneizados en reactivo de trizol (1mL trizol/100mg tejido) y por cada mililitro de homogeneizado se adicionó 0.2mL de cloroformo (Sigma). Después de homogenizar y 15 centrifugar por 15 minutos a 13,000rpm la fase acuosa fue recuperada. El RNA fue precipitado con Isopropanol (Sigma) y lavado con etanol al 75, 85 y 100%. Finalmente la pastilla de RNA fue resuspendida en H<sub>2</sub>O-DEPC libre de RNAsas (Sigma). La concentración total de RNA fue determinada por absorbancia a 260 nm.



## 5.6 Identificación del Receptor a Estrógenos por RT-PCR

### *Amplificación de genes por RT-PCR*

El RNA total, obtenido a partir de cisticercos de la *Taenia crassiceps* tratados fue retrotranscrito utilizando 5 ug de RNA obtenido en adición al siguiente MIXRT.

Tabla 2 Descripción de la mezcla MIX-RT para un reacción.

	1 rxn
Buffer 5x	5 ul
DTT	1 ul
Datp	1 ul
Dctp	1 ul
dGTP	1 ul
Dttp	1 ul
oligo dT	0.2
enzima RT	1 ul
c.b.p	20 ul

El producto del RT fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos específicos con base en las secuencias más conservadas de genes previamente reportados para humano, rata y ratón en el Gene Data Bank.

Se utilizó 18s como gen constitutivo (control positivo de amplificación). Las secuencias de oligonucleótidos empleadas en los experimentos de PCR se encuentran descritas en la siguiente tabla:

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados.

Gen	Sentido	Anti-sentido
ER $\alpha$ (239pb)	5'-AGACTGTCCAGCAGTAACGAG	5'-TCGTAACACTTGCAGCCG
18s (238pb)	5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG	5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG



El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2 % TBE al 1x. Las secuencias fueron analizadas usando el DNASIS Software (Hitachi Software Engineering, Tokyo, Japan). La densitometías se hicieron con el programa Scion Image.

### **5.7 Extracción de proteínas totales.**

La proteína total de los cisticercos de la *Taenia crassiceps* cultivados fue obtenida por el método convencional de Tris-HCl. Los cisticercos tratados y controles sin tratamiento hormonal fueron recolectados en en una solución Tris-HCl 100mM (1mL/0.1g de tejido), proteinasa K (100U/mL) y cocktail inhibidor de proteínas.

Tabla 4 Descripción del Buffer de Lisis utilizado para la extracción de proteínas.

Reactivo	Concentración del stock	Peso Molecular	Solvente	Concentración final
DTT	100 mM	154.3	Agua destilada	1 mM
Tris HCl	100 mM	157.6	Agua destilada	10mM
Glicerol			Agua destilada	30 %
EDTA	100 mM	372.2	Agua destilada	1 mM
Triton			Agua destilada	1 %
Leupeptina	4 mg/ml		Agua destilada	5 ug/ml
Aprotinina	1.6 mg/ml		Agua destilada	5 ug/ml
Pepstatina	1 mg/ml		Etanol	2 ug/ml
PMSF	100 mM	174.2	Isopropanol	1 mM
Ortovanadato	100 mM	183.9	Agua destilada	1 mM
Azida de Sodio	1.5 M	6.01	Agua destilada	15 mM

Los cistis fueron sonicados por 3 ciclos de 45 segundos a 30 decibeles. Posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante fue recuperado y la pastilla desechada. La proteína obtenida fue cuantificada por espectrofotometria a una longitud de onda de 595nm, usando el método de Bradford-Lowry.



## 5.9 Identificación del Receptor a estrógenos por Western Blot

### *Electroforesis*

Posteriormente se realizó la separación de proteínas por SDS-PAGE, cargando 30ug de proteína de cada tratamiento en un gel de acrilamida al 10 %.

Tabla 5 Concentraciones y composición de geles de acrilamida.

	Gel separador (al 10 %)	Gel concentrador (4%)
	10 ml	5 ml
Agua	4.0 ml	3 ml
Sol. Tris pH 8.8	2.5 ml	---
Sol. Tris pH 6.8	---	1.25 ml
Archilamida	3.3 ml	660 ul
SDS 10%	100 ul	50 ul
Persulfato de Amonio (0.1gr/ml)	50 ul	25 ul
Temed	5 ul	2.5 ul

Los geles fueron montados en vidrios de BIORAD de 1.5 mm. Las muestras se corrieron a la par de un Marcador de Peso caleidoscopico de BIORAD cat a 80 volts en el gel concentrador y a 100 volts en el gel separador en una cámara para electroforesis BIORAD hasta que la muestra saliera de los vidrios.

### *Electrotransferencia.*

Las proteínas separadas en el gel de archilamida fueron transferidas a un membrana de PVDF en una cámara semihúmeda BIORAD con buffer de transferencia 1x por 90 minutos a 0.3 amperes.



### *Incubación de anticuerpo anti-ER $\alpha$*

Posterior a la transferencia la membrana fue bloqueada con una solución de albúmina al 10% en PBS-tween al 0.1% por 10 minutos en agitación. Para eliminar el exceso de la solución de bloqueo, esta fue lavada de forma breve dos veces para después incubarla por una hora con la solución de anticuerpo primario anti-ER la cual estaba en una solución 1:200 diluida en PBS-tween al 0.1%.

## **5.9 Identificación del Receptor a estrógenos por Citometría de Flujo.**

Para corroborar la expresión de ER $\alpha$  en cisticerco y que la señal no es debida a la contaminación por células del hospedero se incluyeron marcadores que reconocieran células de ratón. Para este fin las células provenientes de cisticerco se tiñeron con  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -MHCII ambos acoplados a biotina y fueron revelados con Streptavidina Cy5. Se utilizó el mismo anticuerpo  $\alpha$ -ER $\alpha$  IgG policlonal montado en conejo que se usó en el western blot y microscopía el cual fue revelado con  $\alpha$ -conejo acoplado a PE.

### *Obtención de células de cisticercos de *T. crassiceps* y de bazo de ratón.*

Las células de los cisticercos obtenidos del cultivo se colectaron en PBS 1X pH=7.3 para disgregarlos haciéndolos pasar 10 veces por agujas de diferentes calibres, comenzando por el mayor con una medida de 21G x 32mm para posteriormente pasarlos por la aguja de menor calibre con un medida de 27G x 13mm. El tegumento fue sedimentado y el sobrenadante fue recuperado en tubo eppendorf de 1.5 ml.

Las células de bazo se obtuvieron disgregándolo haciéndolo pasar por una malla y recuperándolas en la misma solución. Las células en suspensión fueron centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos, posteriormente se les adicionó 500  $\mu$ l de buffer de lisis de eritrocitos (ACT) reposándolos 15 min a temperatura ambiente, al terminar se les adicionó 1 ml de PBS 1X y se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS 1X para volver a



centrifugar a las mismas condiciones y resuspender en 200ul de Buffer de FACS (PBS 1X pH=7.3 + Suero fetal bovino 2% + azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) 0.02%).

La relación de las tinciones superficiales e intracelular fueron realizadas fue como se describe a continuación en la Tabla 5.

*Tinción de superficie*

A todas las células con excepción de las muestras sin teñir se le hizo la tinción de superficie con  $\alpha$ - CD<sub>3</sub> ratón biotina +  $\alpha$ - MHCII ratón biotina, en una dilución de 1/200 y 1/400 respectivamente en Buffer de FACs y adicionando 30 ul a cada muestra, ambos se incubaron 10 minutos a 4°C.

Al término se lavaron con 1 ml de Buffer de FACs y se centrifugaron 3 minutos a 2000 rpm, para posteriormente incubar el anticuerpo secundario estreptavidina Cy5 en una dilución 1/300 el cual se incubo 15 minutos a 4°C.

Tabla 6 Relación de las muestras teñidas para la detección de ER $\alpha$  en células de cisticerco de *T. crassiceps* por Citometría de Flujo.

	Células de Bazo	Células de Cisticerco Control	Células de Cisticerco Cultivadas con E <sub>2</sub>
Blanco	Sin teñir	Sin teñir	Sin teñir
Control de anticuerpo 2rio	estreptavidina Cy5	estreptavidina Cy5	estreptavidina Cy5
Tinción completa	$\alpha$ - CD <sub>3</sub> ratón biotina + $\alpha$ - MHCII ratón biotina + estreptavidina Cy5	$\alpha$ - CD <sub>3</sub> ratón biotina + $\alpha$ - MHCII ratón biotina + estreptavidina Cy5	$\alpha$ - CD <sub>3</sub> ratón biotina + $\alpha$ - MHCII ratón biotina + estreptavidina Cy5
Control de anticuerpo 2rio	$\alpha$ - conejo IgG-PE	$\alpha$ - conejo IgG-PE	$\alpha$ - conejo IgG-PE
Tinción completa	$\alpha$ - conejo IgG-PE + conejo IgG $\alpha$ -ER $\alpha$	conejo IgG $\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ - conejo IgG-PE	conejo IgG $\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ - conejo IgG-PE



### *Tinción intracelular*

Para realizar la tinción intracelular del ER $\alpha$  se fijaron las células con 300  $\mu$ l de Lise/Fix incubándose a 37°C por 10 min, después se lavaron como se menciona anteriormente. Para favorecer la tinción intracelular, las células se permeabilizaron con 200  $\mu$ l de permbuffer por 20 minutos a 4°C. Se volvieron a lavar y se realizó el bloqueo de Fc con 30  $\mu$ l de Fcblock ( $\alpha$ -CD16/CD32) a una dilución 1/100 durante 25 minutos a 4°C, al finalizar las células se lavaron y se incubó el anticuerpo primario  $\alpha$ - ER $\alpha$  IgG montado en conejo adicionando 1  $\mu$ g del mismo (5  $\mu$ l directos del vial) a cada muestra, el cual se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, al término se lavaron y se incubó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de conejo acoplado a PE adicionando 30  $\mu$ l de una dilución 1/200 incubándose por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se resuspendieron en 250 ml de Buffer de FACs para su posterior lectura.

El citómetro se compenso haciendo pasar células de bazo de ratón positivas para CD3 y MHCII, tomado en cuenta el tamaño y la granularidad característica de dicha población.

## **5.10 Identificación del Receptor a Estrógenos por Microscopia Confocal.**

Luego de que los parásitos se recuperaron de los cultivos, se colocaron en cápsulas been (tamaño "00", EMS), se embebieron en una solución de inclusión comercial "TissueTek" (O.C.T. Compound, Sakura) e inmediatamente se sumergieron Nitrógeno líquido. Una vez congelados los parásitos, se cortaron en congelación mediante un criostato (LEICA), a 10 micras de grosor, y se recuperaron sobre portaobjetos previamente tratados con poliLlisina al 10% p/v (Sigma).

Posteriormente, los criocortes se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso.

Previo al tratamiento de los criocortes, éstos se fijaron con paraformaldehído al 5% en PBS 1x durante 30 min, con la finalidad de preservar las estructuras celulares y posteriormente se procesaron para ensayos de histoquímica.



Los criocortes se trataron con SDS al 1% en PBS 1x por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS 1x, posteriormente se bloquearon con una solución de bloqueo, la cual contenía BSA al 0.5% diluido en medio RPMI suplementado con SFB al 5% en condiciones de incubación definidas a 30 minutos, 37°C, cámara húmeda y protegidos de la luz).

Posterior al bloqueo, los cortes se lavaron con PBs 1x para posteriormente incubar los cortes con el anticuerpo  $\alpha$ -ER $\alpha$  rabbit policlonal, el cual se diluyo en RPMI con SFB al 10% a una concentración de 0.002 ug/ul. Los cortes se incubaron 1 hora en cámara húmeda y posteriormente se lavaron con PBS 1x

Después de lavarse se incubo el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG conejo conjugado a FITC (dilución 1:200; Zymed); diluido en RPMI con SFB al 10% en cámara húmeda durante 45 min a 37°C bajo protección de la luz. Finalmente, para contrastar el fondo los cortes se incubaron con una solución de azul de Evans al 0.025% en PBS 1x durante 10 min. Al finalizar se lavaron con PBS 1x dos veces y se retiro el exceso de PBS.

Los cortes fueron montados con el reactivo de vecto-shield y se sellaron con barniz. Se mantuvieron y bajo protección de la luz y las laminillas se guardaron a 4°C hasta las observaciones microscópicas.



## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 Identificación del receptor de Estrógenos por RT-PCR

Se extrajo RNA de tres cultivos diferentes. La cuantificación del mismo se hizo por método espectrofotométrico, leyendo las muestras a 260 nm en un espectro GeneQuant Pro obteniéndose los siguientes datos:

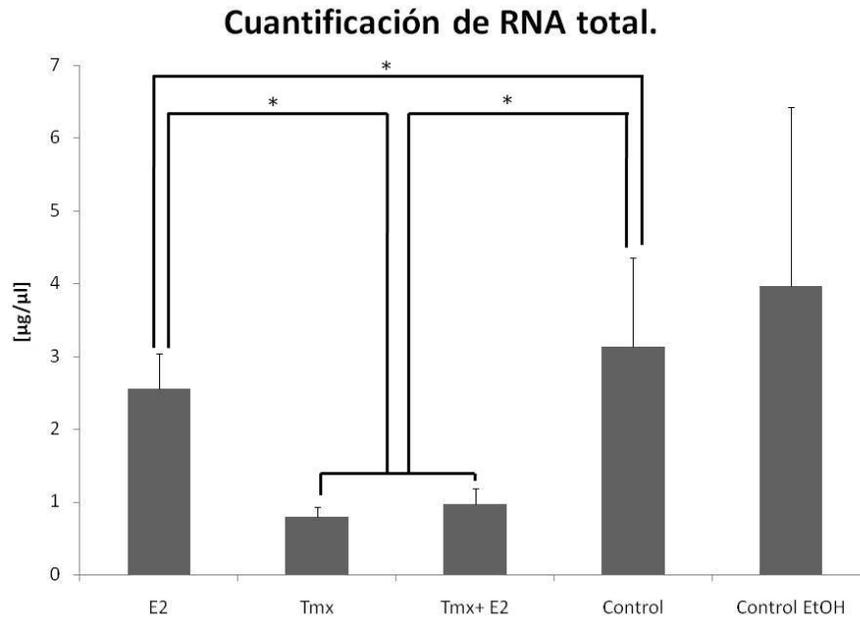
Tabla 7 Cuantificación de RNA total de 3 cultivos diferentes.

	Cultivo 1		Cultivo 2		Cultivo 3		Promedio [ug/ul]
	[ug/ul]	260/280	[ug/ul]	260/280	[ug/ul]	260/280	
Estradiol	2.213	1.88	2.35	1.47	3.11	1.51	2.558
Tamoxifen	0.91	1.36	0.82	1.58	0.64	1.41	0.790
Tmx+ E <sub>2</sub>	1.13	1.38	0.72	1.56	1.05	1.45	0.967
Control	2.57	1.43	2.29	1.50	4.54	1.47	3.133
Control <sub>EtOH</sub>	1.78	1.48	3.46	1.49	6.64	1.60	3.960

En los 3 casos, la cuantificación se hizo por triplicado, se muestra solo el promedio de cada cuantificación, y el promedio de los 3 ensayos a su vez.

En la grafica 1 se observa que los tratamientos alteran la cantidad de RNA que puede ser extraído de los cisticercos, mostrando que el tratamiento con tamoxifen y el de tamoxifen+E<sub>2</sub> disminuye la cantidad del RNA en el cisticerco, esto puede ser un indicador de que dichos tratamientos inhiben la proliferación o bien la viabilidad del cisticerco.

Posterior a la extracción se realizo el RT (retrotranscrito) tomando el volumen equivalente a 10 ug de RNA de cada muestra, de este mismo RT se tomaron 5 ug para amplificar la secuencia del ER $\alpha$ . Se probaron diversas condiciones para la amplificación de la secuencia correspondiente al gen de ER $\alpha$ , obteniendo las condiciones optimas en el temociclador (GeneAmp PCR System 2700) mostradas en la fig. 7



Grafica 1 Cuantificación de RNA total extraído de los cisticercos en cultivo. Cada barra representa la media de 3 ensayos continuos. E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EtOH</sub>: control con vehículo etanol.

Fig. 7 Curvas de ciclos para la amplificación de la secuencia de ER $\alpha$



Se corrieron las muestras con el programa obtenido anteriormente, cada gel se capturo. La fig. 8 es una imagen representativa del gel de agarosa.

En la imagen del RT-PCR (fig. 8) se muestran las bandas correspondientes a la secuencia de ER $\alpha$  amplificada, la cual tiene un tamaño de 250pb, para verificar la identidad del gen se amplifico a la par de las muestras un control positivo de dicha secuencia, el cual consistió en el RT obtenido de RNA de útero de ratón. Se observa que apartir del RNA extraido de los cisticercos se logro la amplificación de una banda de peso similar a la secuencia que amplifican los primers utilizados, los cuales a su vez



se diseñaron para amplificar una secuencia conservada del gen, por lo que el producto puede tener homología al gen de ER $\alpha$  de vertebrados. Así mismo también puede notarse que los tratamientos alteran expresión de la secuencia, específicamente los cisticercos tratados solo con Tmx y a los que se les adiciono E<sub>2</sub> 3 horas después, no expresan la secuencia, mientras que los controles y los estimulados con E<sub>2</sub> muestran una banda de aproximadamente la misma intensidad y que coincide con el tamaño del control positivo.

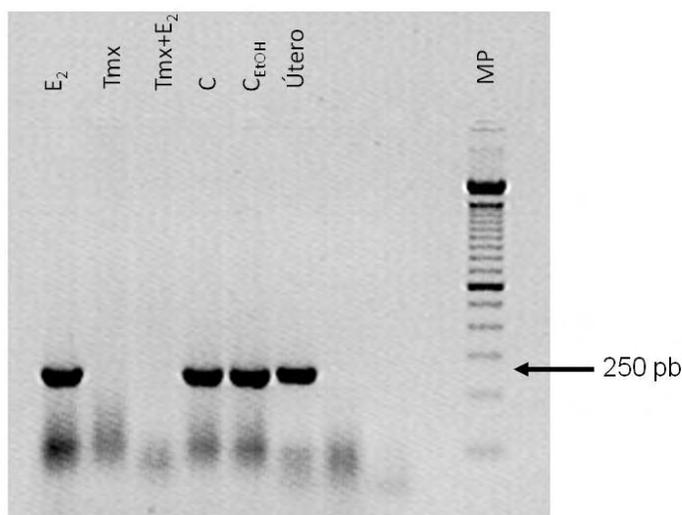


Fig. 8 RT-PCR del gen de ER $\alpha$ . El producto de PCR se corrió en gel de agarosa al 1.2%, mismo el cual se fotografió en un transluminador de luz UV. E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EtOH</sub>: control con vehículo etanol.

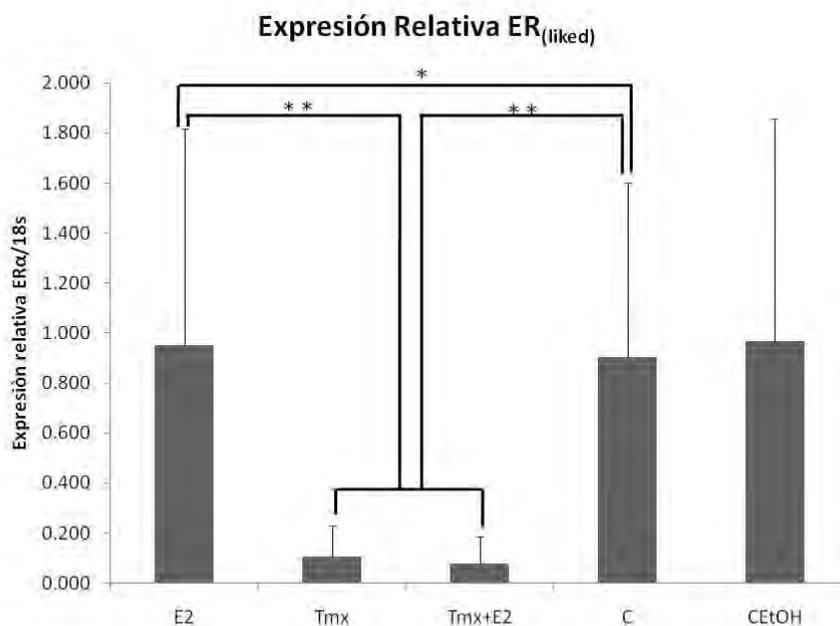
Se realizaron 2 ensayos de diferentes cultivos para el RT-PCR. A cada gel se le realizo densitometría con la finalidad de evidenciar diferencias en la expresión de la secuencias entre los tratamientos, obteniéndose los resultados de la tabla 8, posteriormente se le realizo un análisis estadístico y se graficaron.

A partir de los datos mostrados en la tabla 8 se obtuvo la expresión relativa haciendo la relación de la expresión de la secuencia de ER $\alpha$  con respecto al gen constitutivo 18s. Se obtuvo su Desviación Estándar y se graficaron.



Tabla 8 Densidad óptica de los geles correspondientes a ER $\alpha$  de 2 ensayos distintos. Se incluye el gen 18s el cual se utilizó como control de expresión.

Tratamientos	ER $\alpha$			18s		
	Densidad Óptica			Densidad Óptica		
Ensayo	1	2	Promedio	1	2	Promedio
E2	6626	5541	6083.5	6957	6398	6677.5
Tmx	658	727	692.5	6221	5815	6018
Tmx+E2	479	800	639.5	6004	7440	6722
C	6339	5275	5807	7007	7560	7283.5
CEtOH	6813	5741	6277	7024	6469	6746.5
Utero	5800	4781	5290.5	6699	6345	6522



Grafica 2. Expresión relativa de la secuencia del ER $\alpha$  amplificada con respecto a la expresión del gen constitutivo 18s. E2: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E2: tamoxifen+E2 (3 horas después); C: control; CEtOH: control con vehículo etanol.

En la grafica 2 correspondiente a la expresión relativa se observa que las densidades ópticas obtenidas reflejan el mismo comportamiento de la fig 8. La ausencia de bandas o bien la baja densidad óptica de los tratamientos con Tmx y de Tmx+E2 sugiere que dichos tratamientos inhiben la



transcripción del gen, lo que resulta en la baja cantidad de RNAm que puede ser retrotranscrito y amplificado con los primers diseñados para el mismo, lo que implica que al ser el Tmx un inhibidor competitivo del receptor, el mecanismo por el que el cisticerco aprovecha al E<sub>2</sub> puede ser mediado por un receptor de comportamiento similar al de los vertebrados. Por otro lado también se observa que los cisticercos estimulados con E<sub>2</sub> tienen una expresión más o menos similar a los controles de los vehículos por lo que se puede suponer que el E<sub>2</sub> no inhibe ni promueve la expresión del gen.

## 6.2 Identificación del receptor de Estrógenos por Western Blot

Se realizaron 2 cultivos diferentes para la obtención de proteínas. Posterior al cultivo se realizó la extracción y la cuantificación de proteínas totales, las curvas estándar obtuvieron una r=0.99 y de 0.89 con los datos de la tabla 9.

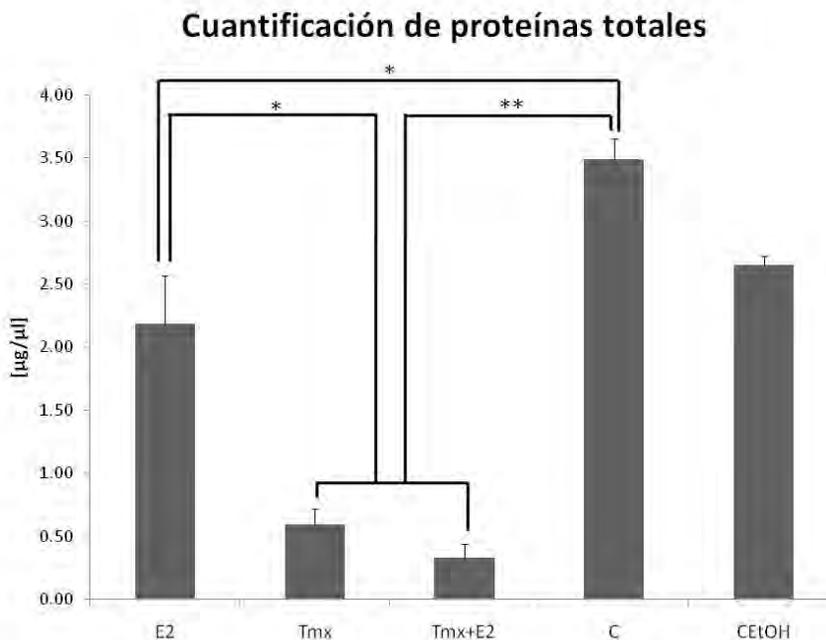
Tabla 9 Cuantificación de proteínas totales de dos cultivos diferentes.

Ensayos	1	2	Promedio
Concentración	[ug/ul]	[ug/ul]	
E <sub>2</sub>	2.45	1.9	2.18
Tmx	0.68	0.5	0.59
Tmx+E <sub>2</sub>	0.25	0.4	0.33
C	3.37	3.6	3.49
C <sub>EtOH</sub>	2.6	2.7	2.65

La grafica 3 correspondiente a la cuantificación de proteínas totales muestra la cantidad de proteína que se extrajo a partir de los cisticercos tratados en los 2 cultivos diferentes. Se observa que los tratamientos afectan la cantidad de proteína que puede extraerse de los cisticercos, en donde los 2 tratamientos con tamoxifen disminuyen la cantidad de proteína, mientras que de los cisticercos estimulados con E<sub>2</sub> y de los controles se puede extraer mayor cantidad, mostrando un comportamiento similar al de la extracción de RNA total. Tal evidencia sugiere que el tratamiento con Tamoxifen inhibe la síntesis de proteínas pudiendo suponer que este tiene un efecto tóxico para el cisticerco.



Los extractos totales de proteínas obtenidos a partir de los cisticercos de cada tratamiento se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en una cámara semihúmeda BIORAD con buffer de transferencia 1x por 90 minutos a 0.3 amperes.



Grafica 3 Cuantificación de proteínas totales extraídas a partir de los cisticercos en cultivo. Cada barra representa la media de 2 ensayos continuos. E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EIOH</sub>: control con vehículo etanol.

Se probaron diferentes tiempos de bloqueo e incubación de los anticuerpos, así como diferentes tiempos de exposición en el revelado, siendo los más adecuados 15 min de bloqueo con solución de PBS-Tween 0.1% y albumina al 5%, 1 hora de incubación con el anticuerpo primario y 15 min con el anticuerpo secundario, haciendo 4 lavados de 15 min con PBS-Tween al 0.1% entre cada incubación y 3 lavados al final.

Cada membrana fue revelada con un kit SCL de Kodak, obteniéndose diferentes placas correspondientes a diferentes tiempos de exposición. La figura 9 muestra una imagen representativa de las 2 membranas reveladas.



La figura 9 evidencia la presencia de bandas de peso similar a la banda que se presenta en el carril del control positivo correspondiente al ER $\alpha$ , en todos los carriles se muestran dichas bandas con diferente intensidad. Así mismo se observan gran variedad de bandas, las cuales son debidas a la inespecificidad del anticuerpos por lo que realizo la inmunoprecipitación para obtener bandas más específicas que evidenciaran de la presencia de dicho receptor.

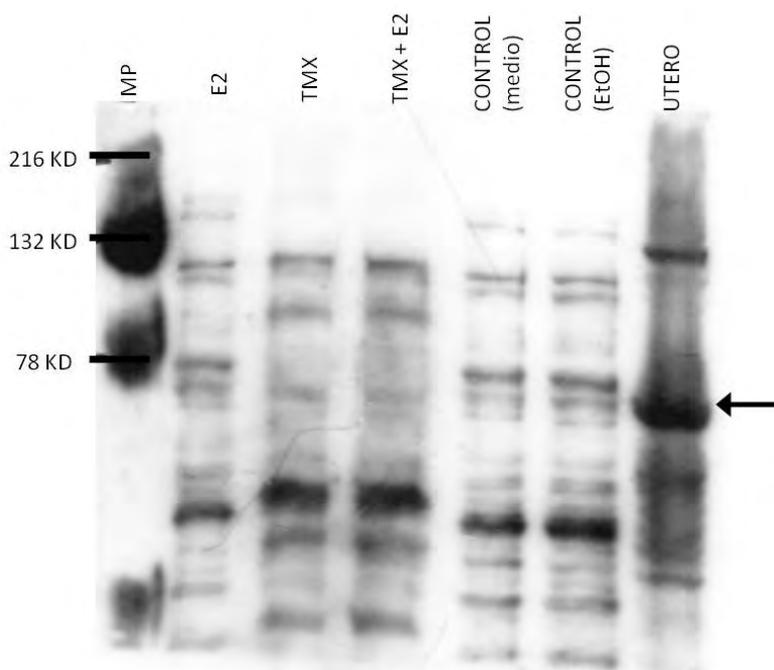


Fig. 9 Western Blot del ER $\alpha$ . Se muestra una placa revelada a partir de una de las membranas en donde se realizo en inmunoensayo. E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EtOH</sub>: control con vehículo etanol.

### 8.2.2 Inmunoprecipitación.

El lisado del segundo ensayo se inmunoprecipitó con el  $\alpha$ -ER $\alpha$ , posteriormente se corrió en un gel SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF. El revelado se hizo a las mismas condiciones que el Western Blot. La IP se reveló a diferentes tiempos de exposición siendo el más adecuado a 20 segundos, placa correspondiente se escaneo obteniéndose la siguiente imagen.

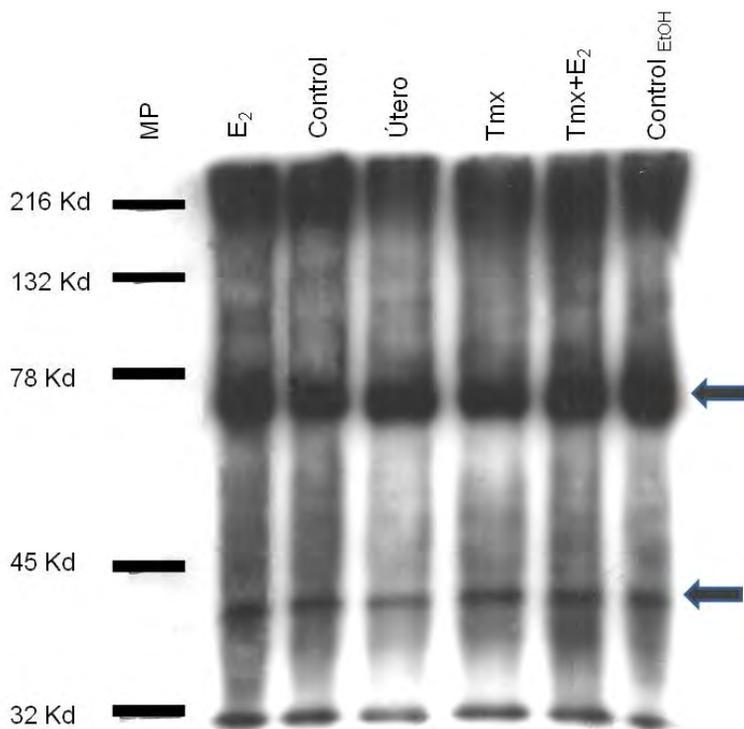


Fig. 10 Imagen de la Inmunoprecipitación del lisado total con el anticuerpo  $\alpha$ -ER $\alpha$ . La placa revelada a partir de la inmunoprecipitación del lisado total de proteínas con el anticuerpo  $\alpha$ -ER $\alpha$ . E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EtOH</sub>: control con vehículo etanol.

La placa de la fig.10 correspondiente a la inmunoprecipitación muestra que esta técnica fue más específica al identificar el receptor ya que se pueden distinguir solo dos bandas, una de un peso menor a 45 Kd correspondiente al anticuerpo  $\alpha$ -ER $\alpha$  y la más gruesa, la cual tiene el mismo peso que la banda correspondiente al control positivo, por lo que se puede deducir que los cisticercos expresan una proteína, misma que posee la secuencia para la cual está dirigido el anticuerpo y que corresponde a la molécula proteica expresada en vertebrados mamíferos.

La placa revelada no mostró diferencias en la intensidad de las bandas de los diferentes tratamientos, por lo que fue sometida a un análisis de densitometría, a fin de que se pudieran captar diferencias en la intensidad de las bandas, la expresión de la proteína se relaciono con la expresión de tubulinas las cuales son sintetizadas de forma constitutiva. A fin de poder comparar la



immunoprecipitación y el WB de tubulinas, este último se realizó con el mismo lisado total, cuantificación y condiciones.

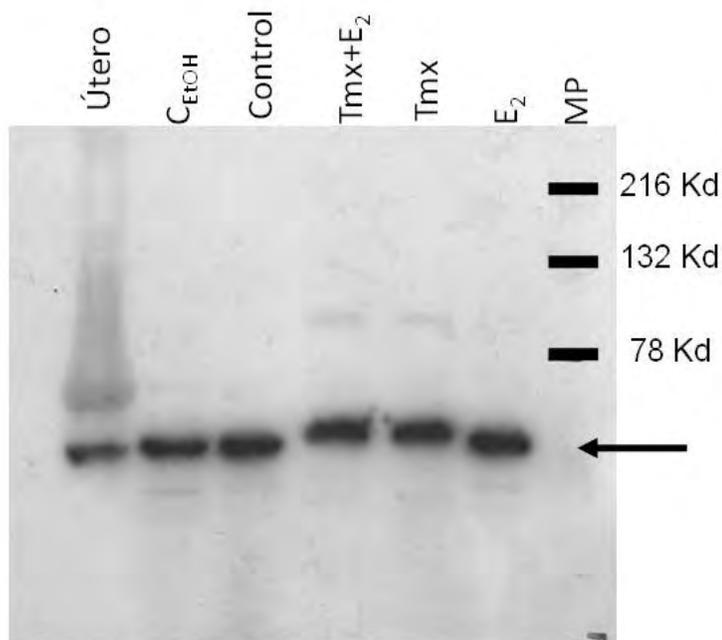
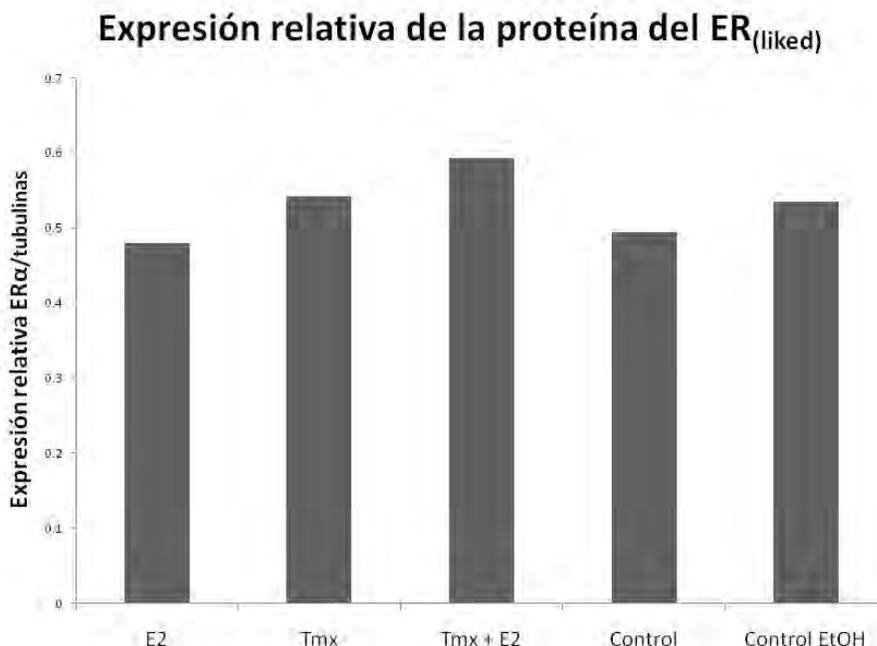


Fig.11 Imagen del western blot de tubulinas. E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EtOH</sub>: control con vehículo etanol.

Tabla 10 Densidades ópticas de la placa de la inmunoprecipitación del ER $\alpha$  y del WB de tubulinas.

	ER $\alpha$	Tubulinas
Tratamientos	Densidad Óptica	Densidad Óptica
Ensayo	1	1
E2	7180	15005
Tmx	7208	14603
Tmx+E2	7683	14348
C	8043	14834
CEtOH	8141	13724

De los datos anteriores se obtuvo la relación tubulinas/ER $\alpha$  y posteriormente se graficaron.



Grafica 4. Expresión relativa de la proteína ER con respecto a la expresión de tubulinas. E<sub>2</sub>: estradiol; Tmx: tamoxifen; Tmx+E<sub>2</sub>: tamoxifen+E<sub>2</sub> (3 horas después); C: control; C<sub>EtOH</sub>: control con vehículo etanol.

La grafica 4 muestra que la expresión de la proteína tiene un comportamiento homogéneo en todos los tratamientos, por lo que se puede sugerir que a diferencia del comportamiento de la expresión del gen, la síntesis de la proteína no se ve afectada por el tratamiento con la antihormona.

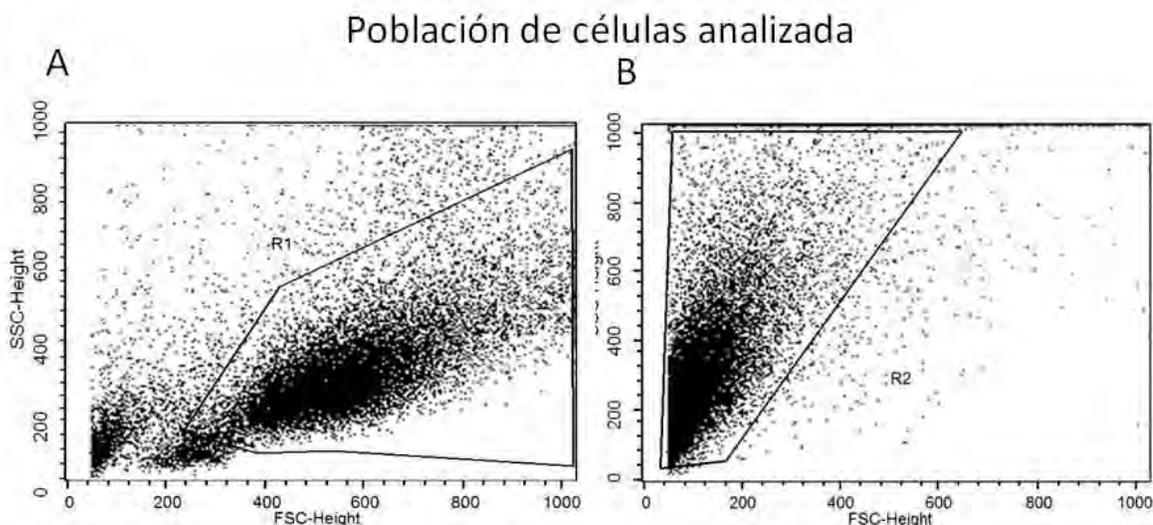
### 6.3 Identificación del receptor de Estrógenos por Citometría de Flujo (FACS)

Posterior a la tinción, las muestras se hicieron pasar por el citometro CALIBUR. Dicho citometro se compenso con antelación utilizando células de bazo de ratón teñidas con  $\alpha$ -CD3/MHCII así como con  $\alpha$ -ER $\alpha$ , mismas que se utilizaron como control positivo, a fin de compararlas con las células de cisticerco a las cuales se les realizo la misma tinción.

La grafica 5 muestra la población de bazo sobre la cual se realizo la compensación y la población de células de cisticerco analizada. La población seleccionada en A presenta el tamaño y granularidad características de los linfocitos totales de bazo, a partir de esta región se capturaron los



eventos para el análisis de las células teñidas con MHC-II para identificar linfocitos B y con CD3 para linfocitos T. Así mismo el análisis en células de cisticerco se hizo en el área seleccionada en B, ya que las células dentro de esta región presentan un menor tamaño que cualquier célula proveniente del hospedero aunado a que son de menor granularidad, lo cual es un indicador de que son menos complejas que las células seleccionadas en A.



Grafica 5. Poblaciones celulares analizadas **A**. Muestra la población total de células de bazo. El área seleccionada corresponde a la población de linfocitos totales sobre los cuales se realizó la compensación y el análisis para células positivas a MHC-II y CD3. **B** Corresponde a la población de células de cisticerco sobre la cual se analizó la expresión de los marcadores de superficie y del ER $\alpha$ .

Los datos de la adquisición de las lecturas en los canales correspondientes a Strep-Cy5 y PE se muestran en la tabla 11, también se incluyen datos estadísticos.

Debido a que la compensación se realizó sobre la población correspondiente a linfocitos totales de bazo, y que estas células fueron usadas como control positivo tanto para los receptores de superficie MHC-II y CD3 como para el ER $\alpha$  se muestran inicialmente los resultados obtenidos a partir de los datos de adquisición para estas células. La grafica 6 muestra la intensidad media de fluorescencia de linfocitos totales positivos para los receptores de superficie MHC-II y CD3, mientras que la grafica 7 muestra la fluorescencia debida a la tinción para ER $\alpha$  en la misma población.



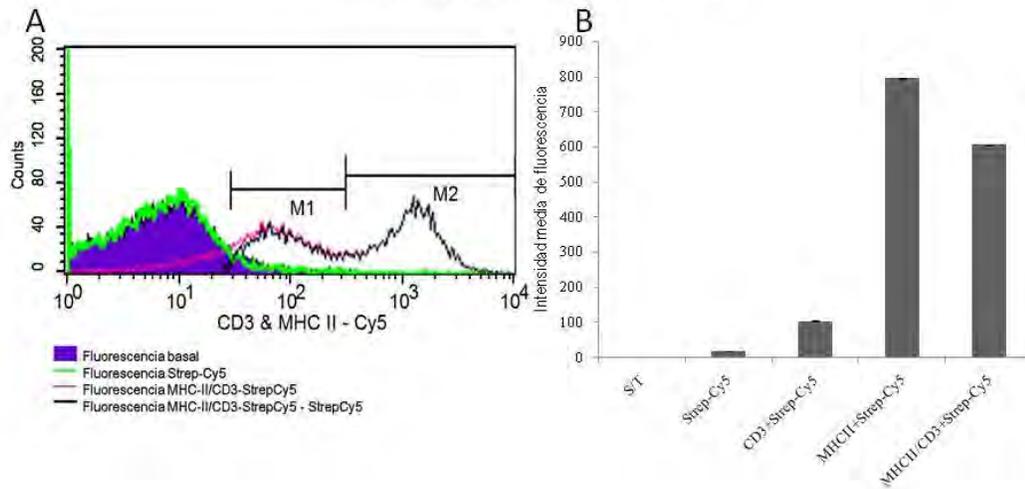
1

Tabla 11. Datos de adquisición de la citometría de flujo para MHC-II/CD3 y ER $\alpha$ .

	TOTAL EVENTS	GATED EVENTS	% GATED	MEAN	MEAN Strep-Cy5	CV	DS	MEAN PE	CV	DS
<b>CELULAS DE BAZO</b>										
sin teñir	20,000	15,332	76.66	12.60	11.1	175	12.1	11.9	102	19.5
Strep-Cy5	20,000	15,966	79.83	14.45	18.1	771	11.6			
$\alpha$ -mouse PE	20,000	16,631	83.16	15.03				14.4	83.8	20.4
MHC-II/CD3 + StrepCy5	20,000	14,940	74.70	626.00	606	120	12.4			
(MHC-II/CD3 + StrepCy5) - (StrepCy5)	20,000	12,029	75.34	761.19						
$\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ -mouse PE	20,000	17,223	86.11	113.51				112	65	29
( $\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ -mouse PE)-( $\alpha$ -mouse PE)	16,040									
<b>CELULAS DE CISTICERCO</b>										
<i>CONTROLES</i>										
sin teñir	20,000	18,920	94.60	14.10	7.75	178	13.8	13.2	115	15
Strep-Cy5	20,000	17,688	88.44	10.28	9.7	131	12.7		126	26
$\alpha$ -mouse PE	20,000	17,484	87.42	22.71				20.5		
MHC-II/CD3 + StrepCy5	20,000	19,216	96.08	11.90	85.4	523	447			
$\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ -mouse PE	20,000	18,760	93.80	178.88				169	115	15
( $\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ -mouse PE)-( $\alpha$ -mouse PE)	20,000	11,643	62.06	264.71						
<i>EXTIMULADAS E<sub>2</sub></i>										
sin teñir	20,000	18,901	94.50	13.75	6.2	176	10.9	12.7	131	0.8
Strep-Cy5	20,000	16,751	83.75	12.95	12.3	186	22.8			
$\alpha$ -mouse PE	16,800	14,256	84.86	23.47				21.2	427	1.7
MHC-II/CD3 + StrepCy5	20,000	17,981	89.91	12.29	8.46	1498	127			
$\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ -mouse PE	10,965	8,658	78.96	600.92				579	290	1
( $\alpha$ -ER $\alpha$ + $\alpha$ -mouse PE)-( $\alpha$ -mouse PE)	14,256	5,256	36.87	958.72						

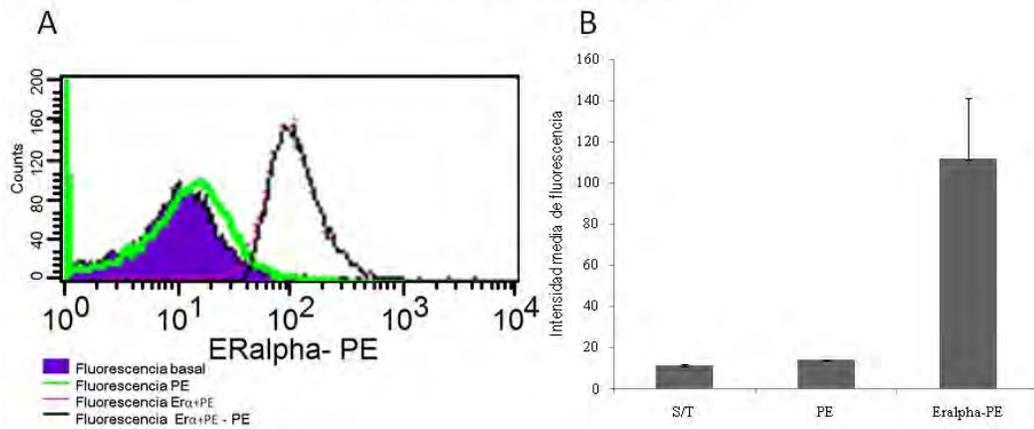


### Intensidad media de fluorescencia para MHC-II/CD3 en linfocitos totales de bazo



Grafica 6 Se muestra la expresión de la molécula MHC-II y CD3 en linfocitos totales de bazo. **A.** El área azul corresponde a la fluorescencia basal de las células sin teñir, la línea verde a la fluorescencia debida a la unión de las células a Strep-Cy5, la línea rosa muestra la fluorescencia de las células teñidas con  $\alpha$ -MHC-II/CD3 mas strep-Cy5, y la línea negra corresponde a la diferencia de la señal de las células con doble tinción menos la de Strep-Cy5 solo. **B.** Intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo por separado.

### Intensidad media de fluorescencia para ER $\alpha$ en linfocitos totales de bazo



Grafica 7 Intensidad media de fluorescencia obtenida a partir de la lectura en el canal para PE correspondiente a linfocitos totales extraídos de bazo. **A.** El área azul corresponde a la fluorescencia basal de las células sin teñir, la línea verde a la fluorescencia debida a la unión de las células al a PE, la línea rosa muestra la fluorescencia de las células teñidas con ER $\alpha$  mas PE, y la línea negra corresponde a la diferencia de las células con doble tinción l menos la señal de PE. **B.** Intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo por separado.

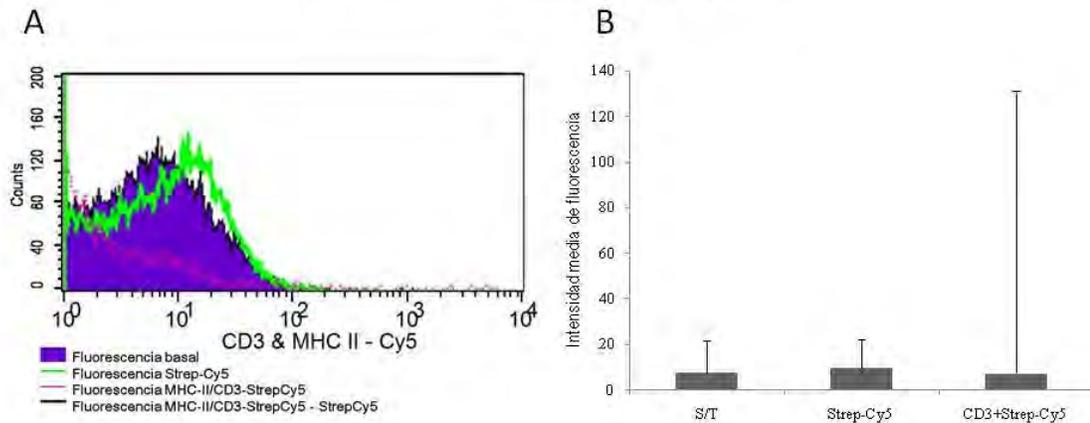


Como se observa en la grafica 6 la fluorescencia debida a la inespecificidad del anticuerpo secundario Strep-Cy5 utilizado en la tinción para MHC-II/CD3 en comparable con el basal y es mínimo, mientras se nota un aumento significativo en la señal de las células en las cuales se realizo la tinción completa, por lo que estas muestras fueron apropiadas para obtener el control positivo para MHC-II/CD3.

En la misma población se analizo la expresión de ER $\alpha$ , la fluorescencia debida a la correspondiente tinción se muestra en la grafica 7 en la cual se puede notar que la señal debida a la inespecificidad de PE es comparable a la fluorescencia basal y la que corresponde a la tinción completa se encuentra aumentada significativamente, por lo que se puede confirmar la expresión del ER en linfocitos totales de bazo como se ha reportado en otros trabajos pudiendo tomar estas muestras como un control positivo para ER $\alpha$ .

La misma tinción realizada en linfocitos totales de bazo se le hizo a las células obtenidas de cisticerco. La expresión de MHC-II y CD3 en células de cisticerco controles y estimuladas con E<sub>2</sub> se observa en la grafica 8 y 9 respectivamente.

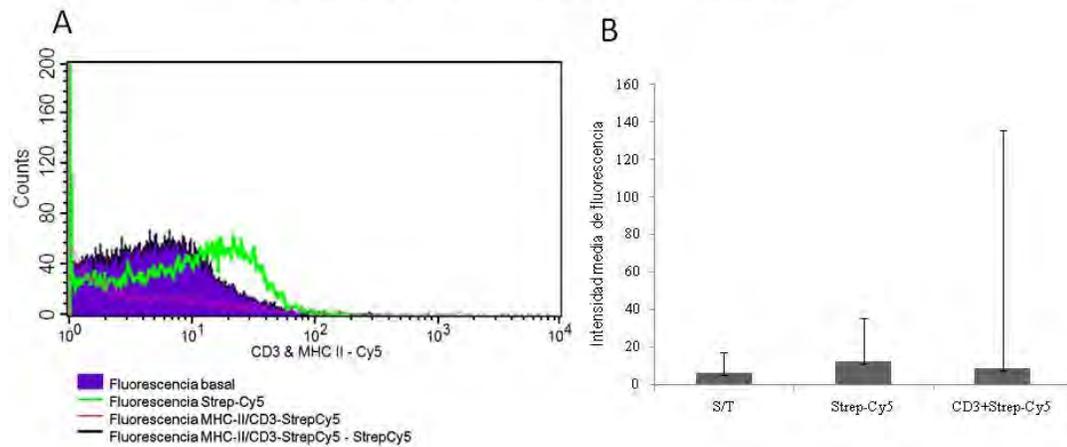
### Intensidad media de fluorescencia para MHC-II/CD3 en células controles de cisticerco



Grafica 8 Se muestra la expresión de los marcadores de superficie MHC-II y CD3 en células de cisticerco control. A. El área azul corresponde a la fluorescencia basal de las células sin teñir, la línea verde a la fluorescencia debida a la unión de las células al a Strp-Cy5, la línea rosa muestra la fluorescencia de las células teñidas con MHC-II y CD3 mas Strep-Cy5, y la línea negra corresponde a la diferencia de las células con doble tinción I menos la señal de Strep-Cy5. B. Intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo por separado.



### Intensidad media de fluorescencia para MHC-II/CD3 en células de cisticerco estimuladas con E<sub>2</sub>



Grafica 9 Se muestra la expresión de los marcadores de superficie MHC-II y CD3 en células de cisticerco control. A. En "x" se mide la intensidad media de fluorescencia de los receptores y en "y" la cuenta de células positivas para los mismos receptores, el área azul corresponde a la fluorescencia basal de las células sin teñir, la línea verde a la fluorescencia debida a la unión de las células al a Strep-Cy5, la línea rosa muestra la fluorescencia de las células teñidas con MHC-II y CD3 mas Strep-Cy5, y la línea negra corresponde a la diferencia de las células con doble tinción I menos la señal de Strep-Cy5. B. Intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo por separado en células positivas para ambos marcadores.

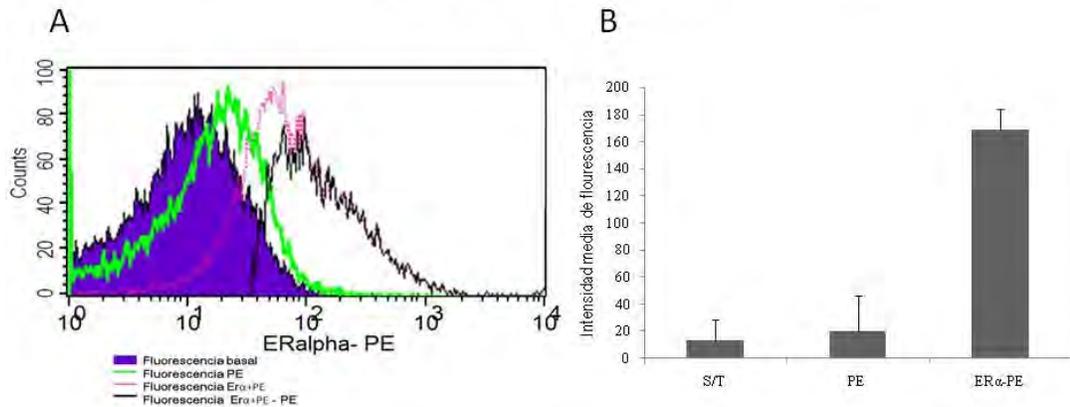
En las graficas 8 y 9 se observa que la expresión de los receptores de superficie tienen la misma intensidad media de fluorescencia que la basal, por lo que se deduce que la expresión de los marcadores de superficie son ausentes en las células de cisticerco a las cuales solo les fue adicionado como tratamiento el vehículo (medio sin suplementar) para el caso de la grafica 8. y E<sub>2</sub> en las analizadas en la grafica 9

La ausencia de la expresión de los receptores de superficie MHC-II y CD3 en las células extraídas de cisticerco descartan la posibilidad de contaminación por parte de células inmunitarias del hospedero, por lo que se puede asegurar que en la determinación de ER $\alpha$  la expresión es debida a las células de cisticerco.

La expresión del ER $\alpha$  de células de cisticercos cultivadas se muestran a en las graficas 10 para las células controles y en la 11 para las estimuladas con E<sub>2</sub>.

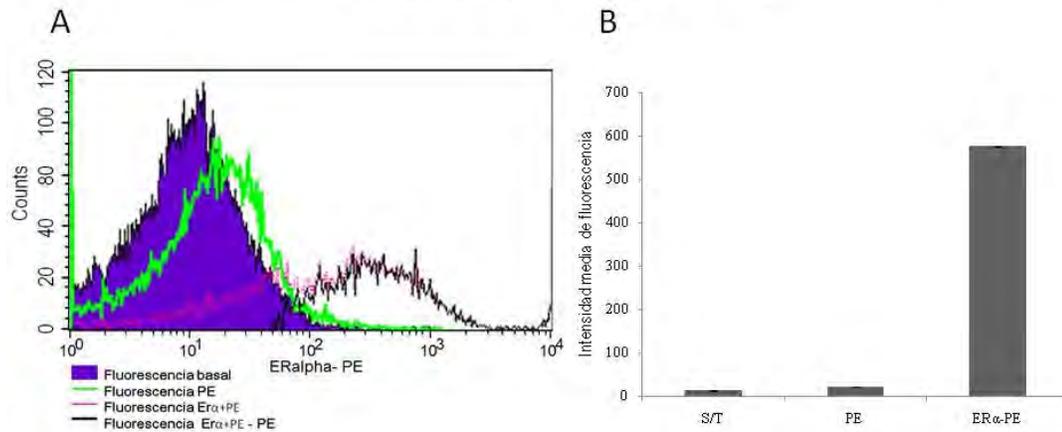


### Intensidad media de fluorescencia para ER $\alpha$ en células controles de cisticerco



Grafica 10 Se muestra la expresión de ER $\alpha$  en células de cisticerco control. **A.** En "x" se mide la intensidad media de fluorescencia de los receptores y en "y" la cuenta de células positivas para los mismos receptores, el área azul corresponde a la fluorescencia basal de las células sin teñir, la línea verde a la fluorescencia debida a la unión de las células al a Strp-Cy5, la línea rosa muestra la fluorescencia de las células teñidas con MHC-II y CD3 mas Strep-Cy5, y la línea negra corresponde a la diferencia de las células con doble tinción | menos la señal de Strp-Cy5. **B.** Intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo por separado en células positivas para ambos marcadores.

### Intensidad media de fluorescencia para ER $\alpha$ en células de cisticerco estimuladas con E<sub>2</sub>

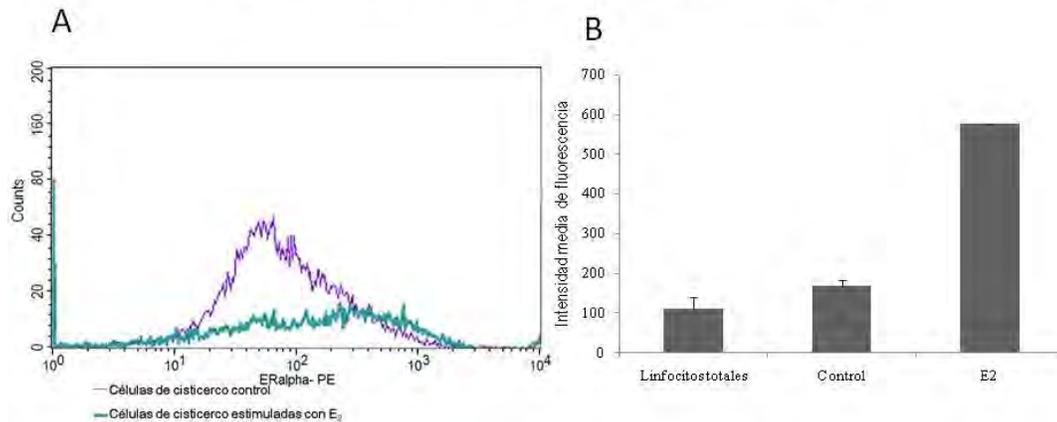


Grafica 11 Se muestra la expresión de ER $\alpha$  en células de cisticerco estimulas con E<sub>2</sub>. **A.** En "x" se mide la intensidad media de fluorescencia de los receptores y en "y" la cuenta de células positivas para los mismos receptores, el área azul corresponde a la fluorescencia basal de las células sin teñir, la línea verde a la fluorescencia debida a la unión de las células al a Strp-Cy5, la línea rosa muestra la fluorescencia de las células teñidas con MHC-II y CD3 mas Strep-Cy5, y la línea negra corresponde a la diferencia de las células con doble tinción | menos la señal de Strp-Cy5. **B.** Intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo por separado en células positivas para ambos marcadores.



Descartada la contaminación, se observa que la intensidad media de fluorescencia demuestra que las células de cisticerco expresan el ER. Así mismo se presenta un diferencia en la expresión entre las células control y las estimuladas con E<sub>2</sub> en las cuales la expresión se ve aumentada en aproximadamente 3 veces la expresión del control como se demuestra en la grafica 8.3.8.

### Expresión de ER $\alpha$ en células de cisticerco



Grafica 12 Se muestra la expresión de ER $\alpha$  en células de cisticerco. **A.** En "x" se mide la intensidad media de fluorescencia debida a la expresión del ER $\alpha$  y en "y" la cuenta de células positivas para el mismo receptor, la línea morada corresponde a la fluorescencia de las células control, la línea azul a la fluorescencia de las células estimuladas con E<sub>2</sub>, obsérvese el desplazamiento a la derecha de la línea azul que indica un aumento en la expresión de dicho receptor, **B.** Intensidad media de fluorescencia debida a la expresión del ER $\alpha$  en linfocitos totales de bazo usados como control positivo, en células de cisticerco controles y en las estimuladas con E<sub>2</sub>.

En B se muestra que mientras que la señal de las células de cisticerco controles tiene un valor alrededor de 200, la fluorescencia que presentan las células de cisticercos estimulados con E<sub>2</sub> tiene valores alrededor de 600, así mismo en A se observa que en los cisticercos estimulados con E<sub>2</sub> disminuyen las células que expresan el receptor, de tales observaciones se deduce que al tratar a los cisticercos con E<sub>2</sub> in vitro estos disminuyen la cantidad de células que expresan el receptor en tanto que la expresión en dichas células aumenta.



#### 6.4 Identificación del receptor a Estrógenos por Microscopia de fluorescencia.

Posterior a la inmunohistoquímica los cortes se observaron en un microscopio de epifluorescencia utilizando los objetivos de 10x y 40x obteniéndose las siguientes imágenes.

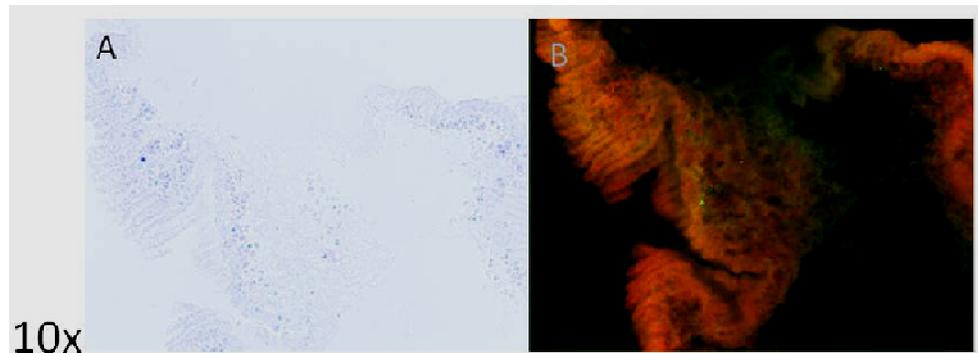


Figura 12 Imagen parcial de un cisticerco vista a 10x. A Imagen en campo claro, se pueden observar las fibras del tegumento y células subtegumentarias. B Imagen obtenida con epifluorescencia la señal en verde corresponde a la expresión de ER, otras estructuras se observan en color rojo debido al contraste con azul de Evans.

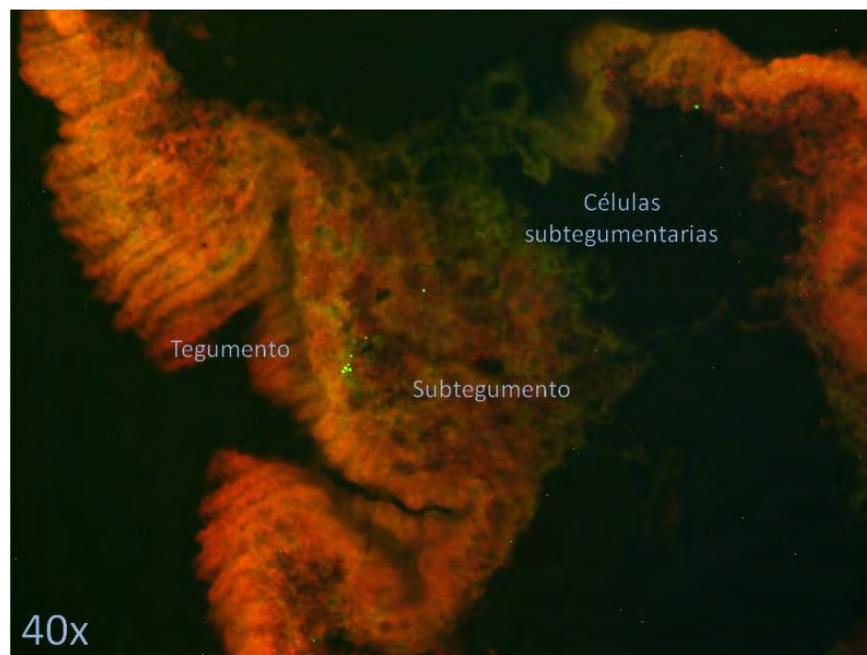


Figura 13 Imagen parcial de cisticerco obtenida con epifluorescencia a 40x. La señal en verde corresponde a la expresión de ER, otras estructuras se especifican en la imagen de color rojo debido al contraste con azul de Evans.

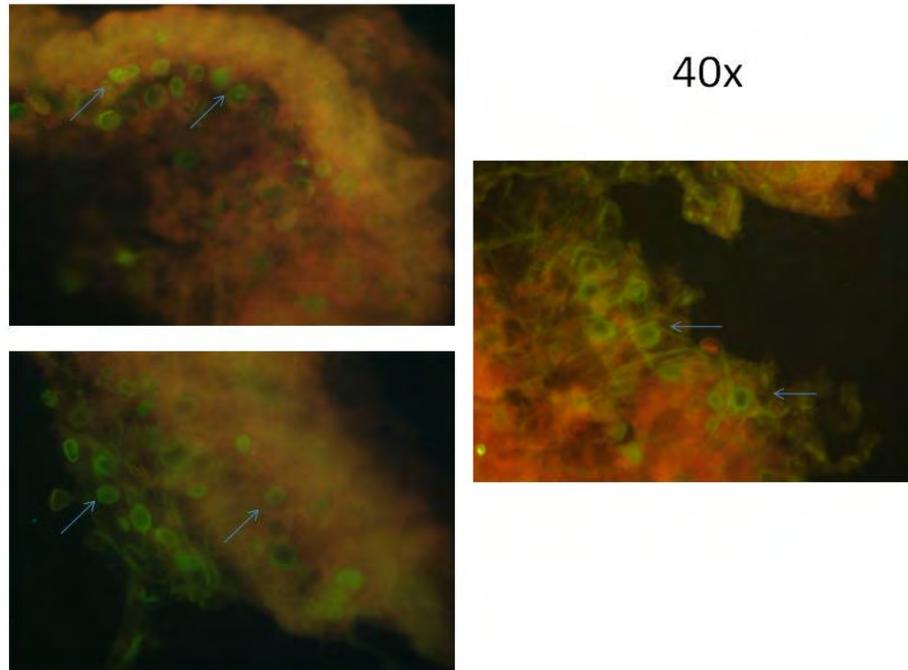


Figura 13 Imágenes de cisticerco obtenidas con microscopio de epifluorescencia a un aumento de 40x. La señal en verde corresponde a la expresión de ER en células y algunas fibras, otras estructuras se observan en color rojo debido al contraste con azul de Evans.

Las figuras 12, 13 y 14 muestran imágenes tomadas de diferentes zonas a lo largo del corte del cisticerco; se muestra la expresión del ER y su localización. La señal en verde es debida a la expresión del receptor, la cual se observa en la periferia y citoplasma de las células localizadas en el subtegumento, así como en algunas fibras del mismo.



## 7.0 DISCUSIÓN

La hipótesis de este trabajo plantea la posibilidad de que el cisticerco de *T. crassiceps* posee una estructura similar al RE por medio del cual puede utilizar al E<sub>2</sub> producido por el huésped. Los datos obtenidos evidencian la presencia de una molécula de gran similitud con el RE expresado en mamíferos, dicha molécula fue identificada por técnicas que evidenciaron una secuencia ya sea del gen del RE y la proteína.

Los resultados obtenidos a partir del RT-PCR demuestran que el cisticerco posee una secuencia que transcribe para un segmento de 239pb del ER $\alpha$  y que la expresión del mismo puede ser regulado por su antihormona, como se demostró al incluir en los experimentos a un lote de cisticercos tratados con Tamoxifen, el cual es agonista para el estradiol y que se ha reportado que tiene efectos tóxicos sobre el parásito. La grafica 2 muestra que los cisticercos tratados con Tamoxifen tiene una expresión de la secuencia disminuida hasta en 9 veces con respecto al control, mientras que la expresión de los cisticercos controles y los estimulados con E<sub>2</sub> es homogénea. Debido al mecanismo de acción del Tamoxifen se puede deducir que el receptor auto-regula su expresión, ya que al ser la anti-hormona un inhibidor competitivo puede bloquear la actividad transcripcional de sus genes blancos así como del mismo gen que lo codifica.

Así mismo el Western Blot para ER $\alpha$  mostro la presencia de bandas de peso similar a la banda correspondiente al control positivo, para el cual se uso proteína total de útero de ratón; dichas bandas presentaron diferencias en la intensidad ya que se observo una disminución en los carriles correspondientes a la proteína total extraída de cisticercos tratados con Tamoxifen, mientras que las bandas de los controles y estimulados con E<sub>2</sub> tienen un comportamiento homogéneo, suponiendo el mismo comportamiento que presento el RT-PCR, sin embargo debido a la presencia de un exceso de bandas de diferentes pesos se realizo posteriormente la inmunoprecipitación de la proteína con el  $\alpha$ -ER $\alpha$ , la inmunoprecipitación se corrió en un gel SDS-PAGE, se transfirió y la placa se reveló a las mismas condiciones que el WB. La imagen obtenida no mostros diferencias aparentes por lo que fue sometida a un análisis de densitometria, los resultados arrojados a partir de este análisis no muestran diferencias en la expresión del receptor con los diferentes tratamientos en comparación con los resultados obtenidos del RT-PCR, lo cual establece cierta confusión en cuanto a la regulación de la expresión del gen y posteriormente de la proteína, lo que da cabida para suponer



que las técnicas no fueron tan precisas al tratar de encontrar evidencias que pudieran sugerir la regulación de la expresión del receptor.

Adicionalmente se obtuvieron los datos de cuantificación de RNA y proteínas totales de todos los tratamientos. Al incorporar en el cultivo cisticercos tratados con tamoxifen se intento dilucidar un posible mecanismo por medio del cual el parasito aprovecha el E<sub>2</sub> del huésped, sin embargo y de acuerdo con lo reportado en trabajos previos se observo que la antihormona tiene un efecto tóxico en los cisticercos cultivados con la misma.

El RNA y de proteínas totales extraídas partir de los cisticercos en cultivo presentan diferencias en la cuantificación. Dicha cuantificación mostró que partir de los cisticercos tratados con tamoxifen se puede extraer una cantidad considerablemente menor de RNA y proteínas que en los controles, la cantidad de RNA total extraído puede ser un indicativo de proliferación y al extraer menor cantidad de RNA se puede suponer que la síntesis de proteínas esta disminuida, dato que es comparable con comportamiento de la cuantificación de proteínas totales ya que la cantidad de proteínas extraída a partir de los cisticercos tratados con la misma anti-hormona es aproximadamente 6 veces menor a la control, hecho similar al que presenta la cuantificación de RNA en donde se presentan datos de entre 3 y 4 veces menores a los controles. Tales observaciones pueden sugerir que el tamoxifen tiene un efecto tóxico sobre los cisticercos cultivados, que puede estar inhibiendo la síntesis de proteínas por medio del ER ya sea por mecanismos genómicos o por medio de las acciones no genómica que este receptor puede tener en cascadas de señalización tales como ERK.

En los trabajos reportados por Escobedo en el 2004 se observo un aumento en la gemación y en la cantidad del DNA total extraída a partir de los parásitos tratados con E<sub>2</sub> a la misma concentración, en comparación con los presentados en este trabajo en los cuales la cantidad de RNA y de proteínas totales extraídas a partir de los cisticercos cultivados con E<sub>2</sub> no son mayores, si no que por el contrario son menores a las cantidades extraídas a partir de los cisticercos control. Esto puede indicar que la cantidad de proteínas sintetizada cuando los cisticercos son estimulados con E<sub>2</sub> es diferente a los controles, y que no necesariamente hay una disminución en su proliferación. Por otro lado y dado los efectos que tiene el tamoxifen y que este actúa por medio de un receptor se puede suponer que en parásito posee una estructura similar al ER la cual puede unir al tamoxifen y por lo tanto a su ligando el E<sub>2</sub>.



Sin embargo se han planteado hipótesis que sugieren que el receptor puede provenir de células del hospedero, mismas que son captadas a partir del peritoneo y que suelen ser células de tipo inmunitario, por ello, a fin de descartar la contaminación de células del hospedero se planteó el protocolo de identificación del receptor por citometría de flujo, en el cual se realizó una tinción dirigida a células de tipo inmune positivas para marcadores como MHC-II y CD3, tinción que es positiva para linfocitos totales de bazo, pero negativa para las células de cisticerco. Así y con los linfocitos totales obtenidos de bazo, los cuales además son positivos para marcadores intracelulares como ER se realizó inicialmente la compensación. Los resultados arrojados a partir de esta determinación muestran que en todos los casos las células obtenidas de cisticerco son negativas para los marcadores de superficie MHC-II y CD3 en la población seleccionada para el análisis de esta población.

La población de células extraídas a partir de los cisticercos cultivados sobre la que se realizó el análisis de expresión de marcadores superficiales como MHC-II y CD3 además del ER fue seleccionada de acuerdo con sus características de tamaño y granularidad. La ubicación de la población en la gráfica muestra que estas son muy pequeñas, además de que también presentan escasa granularidad, característica que es indicativa de su grado de complejidad por lo que se deduce que no son complejas, entonces al ser muy pequeñas y poco complejas y dado que ninguna población celular del hospedero comparte estas características, la población seleccionada se tomó como población perteneciente a células de cisticerco.

Dadas las consideraciones anteriores, la determinación por citometría de flujo reveló que la expresión del ER no es debida a la posible contaminación por células del hospedero, dado que la expresión en células de cisticerco fue negativa para los marcadores de linfocitos totales de bazo, además de que la contaminación por células del hospedero puede descartarse debido a que dichas células no pueden sobrevivir a las condiciones en las que se cultivaron los cisticercos. Una vez descartando la contaminación los resultados obtenidos confirman la expresión del ER en células de cisticerco, y además se observó que su expresión varía de los controles a los parásitos estimulados con E<sub>2</sub> ya en este último lote se observó una expresión de hasta tres veces los valores que presentan las células obtenidas de cisticerco control, los datos obtenidos a partir de esta técnica sugieren que la inmunoprecipitación puede estar arrojando resultados ficticios, ya que al realizar la precipitación con un anticuerpo policlonal, la técnica *per sé* se vuelve inespecífica ya que el complejo formado por



la proteína, el anticuerpo y la proteína G pueden precipitar otro tipo de proteínas además del receptor.

Los resultados anteriores afirman la expresión de un estructura similar al ER capaz de unir a su ligando, pero no aportar evidencia sólida que dilucide el mecanismo por el cual el parásito aprovecha la hormona proveniente el hospedero, por esta razón se realizó la localización del receptor en la estructura del cisticerco. Las imágenes obtenidas muestran su presencia en células subtegumentarias tanto en la periferia como en el citoplasma además de su expresión en fibras del subtegumento, este hecho puede sugerir que al estar presente el receptor en células que pueden ser de tipo muscular o bien protonofroidiales, el receptor puede estar involucrado en procesos como la obtención de nutrientes, factores de crecimiento o bien hormonas del hospedero, además de que al estar expresado en zonas citoplasmica y en membrana este receptor puede estar jugando un papel importante en la proliferación y viabilidad del parásito por medio de la activación de diversas vías de señalización que pueden ser estimuladas por esteroides sexuales, como es el caso de la vía mediada por los segundos mensajeros ERK.

Estos hallazgos sugieren que el parásito ha desarrollado estructuras semejantes a los receptores de hormonas esteroides y que además por el efecto que produce el E<sub>2</sub> y su antihormona, así como su localización se puede sugerir que el receptor puede estar involucrado en mecanismo de proliferación por medio de su efecto genómico o bien por medio de vías de señalización mediadas por cascadas de segundos mensajeros que aseguran todavía más su reproducción y establecimiento en un ambiente hostil.



## 8.0 CONCLUSIONES

1. El cisticerco de *T. crassiceps* expresa una secuencia de mRNA que transcribe un fragmento conservado del receptor a Estrógenos.
2. El Western Blot evidencio en el cisticerco de *T. crassiceps* una proteína similar en peso molecular al receptor a Estrógenos.
3. Por citometría de flujo se descartó que la expresión de moléculas proteicas similares al receptor a estrógenos se debieran a la presencia de células de tipo inmune provenientes del huésped.
4. Se localizo el ER en la zona subtegumentaria de la ultraestructura del cisticerco.
5. La anti-hormona tamoxifen produce efectos tóxicos "in vitro" sobre el cisticerco de *T. crassiceps*.



## 9.0 PERSPECTIVAS

Los resultados mostrados demuestran que el cisticerco expresa una secuencia de mRNA que transcribe para un fragmento del ER, y de igual manera se identificó una proteína que comparte una secuencia conservada (amino-terminal) del receptor, dichos hallazgos confirman que el parásito posee una proteína capaz de unir al ligando el E<sub>2</sub>, sin embargo no se sabe si dicha proteína corresponde a un receptor específico o un receptor que puede unir cualquier molécula de origen esteroidea.

Para la caracterización de la proteína es necesaria la identificación de la misma por medio de un WB que localice con mayor especificidad dicho receptor. El WB que se mostro en este trabajo presentaba al menos 3 bandas que coinciden en peso con el receptor expresado en mamíferos, pero para la identificación más precisa se puede usar una técnica de mayor especificidad para lo cual se propone realizar el WB en doble dimensión, ya que la proteína no solo se identificaría en función de su peso, sino también por su punto isoeléctrico, obteniendo resultados más exactos, adicionalmente y posterior al WB se puede realizar la secuenciación de la molécula identificada para posteriormente realizar un modelaje de la estructura, a la par también se puede realizar la secuenciación de la banda obtenida a partir del RT-PCR para verificar la homología de la secuencia aminoacídica y genómica, esto nos dará pauta para realizar posteriormente ensayos funcionales del receptor que podrán aportar evidencias del mecanismo por el cual es parásito aprovecha el E<sub>2</sub> en su favor.



## 10.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A. J. C. Fulford, M. W., J. H. Ouma, G. Kimani and D. W. Dunne (1998). "Puberty and Age-related Changes in Susceptibility to Schistosome Infection." Parasitology Today **14**(1): 23-26.
- Abebe, F., K. I. Birkeland, et al. (2003). "The relationships between dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), the intensity of *Schistosoma mansoni* infection and parasite-specific antibody responses. A cross-sectional study in residents of endemic communities in north-east Ethiopia." APMIS **111**(2): 319-28.
- Annechien Bouman, M. J. H. a. M. M. F. (2005). "Sex hormones and yhe immune response in humans." Human Reproduction Update **11**(4): 411-423.
- Barron-Gonzalez, A., J. Arias-Martinez, et al. (2001). "[Antiestrogens: mechanism of action and clinical applications]." Salud Publica Mex **43**(6): 577-84.
- Bojalil, R., L. I. Terrazas, et al. (1993). "Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)." J Parasitol **79**(3): 384-9.
- Carrero, J. C., C. Cervantes, et al. (2006). "Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*." Microbes Infect **8**(2): 323-31.
- Dahlman-Wright, K., V. Cavailles, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 773-81.
- De Leon-Nava, M. A. and J. Morales-Montor (2006). "[Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile?]." Rev Invest Clin **58**(2): 161-9.
- Del Brutto OH, S. J. (1988). "Neurocysticercosis: an update." Reviews of infectious disease **10**(6): 1075-1087.
- Dissanayake, S. (2000). "Upregulation of a raf kinase and a DP-1 family transcription factor in epidermal growth factor (EGF) stimulated filarial parasites." Int J Parasitol **30**(10): 1089-97.
- Escobedo, G., C. Larralde, et al. (2004). "Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*." J Parasitol **90**(6): 1235-44.
- Escobedo, G., C. W. Roberts, et al. (2005). "Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?" Trends Parasitol **21**(12): 588-93.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science **240**(4854): 889-95.
- Falkenstein, E., H. C. Tillmann, et al. (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-56.
- Flisser, A., E. Sarti, et al. (2003). "Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas." Acta Trop **87**(1): 43-51.
- Freedman, L. P. (1992). "Anatomy of the steroid receptor zinc finger region." Endocr Rev **13**(2): 129-45.
- Freeman, R. S. (1962). "Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder1800), Rudolphi, 1810 (Cestoda)." Canadian Journal of Zoology **40**(6): 969-990.
- Freilich, D., S. Ferris, et al. (2000). "16alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth." Am J Trop Med Hyg **63**(5-6): 280-3.
- Ghansah, T. J., E. C. Ager, et al. (2002). "Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation." J Eukaryot Microbiol **49**(5): 383-90.



- Huerta, L., L. I. Terrazas, et al. (1992). "Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes." J Parasitol **78**(3): 471-6.
- Jensen, E. V. (1962). "On the mechanism of estrogen action." Perspect Biol Med **6**: 47-59.
- Kato, S., H. Endoh, et al. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science **270**(5241): 1491-4.
- Klein, S. L. (2004). "Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection." Parasite Immunol **26**(6-7): 247-64.
- Korach, K. S. (1994). "Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor." Science **266**(5190): 1524-7.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.
- Larralde, C., J. Morales, et al. (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**(6): 575-80.
- Larralde, C., A. Padilla, et al. (1992). "[Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico]." Salud Publica Mex **34**(2): 197-210.
- Levin, E. R. (1999). "Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor." Trends Endocrinol Metab **10**(9): 374-377.
- Lieberman, B. A. (1997). "The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **7**(1-2): 43-59.
- Lingnau, A., G. Margos, et al. (1993). "The effects of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro." Appl Parasitol **34**(3): 153-60.
- Maswoswe, S. M., W. Peters, et al. (1985). "Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro." Ann Trop Med Parasitol **79**(6): 607-16.
- McDonnell, D. P. (2004). "The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology." Maturitas **48 Suppl 1**: S7-12.
- Morales-Montor, J., S. Baig, et al. (2001). "Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6." J Immunol **167**(8): 4527-33.
- Morales-Montor, J., A. Gamboa-Dominguez, et al. (1999). "Tissue damage in the male murine reproductive system during experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis." J Parasitol **85**(5): 887-90.
- Morales-Montor, J., M. Rodriguez-Dorantes, et al. (1999). "Modified expression of steroid 5 alpha-reductase as well as aromatase, but not cholesterol side-chain cleavage enzyme, in the reproductive system of male mice during (*Taenia crassiceps*) cysticercosis." Parasitol Res **85**(5): 393-8.
- Morales, J., T. Velasco, et al. (2002). "Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis." Vet Parasitol **108**(1): 41-8.
- Sciutto, E., G. Fragoso, et al. (1991). "Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility." Parasitol Res **77**(3): 243-6.
- Sciutto, E., G. Fragoso, et al. (1990). "Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis." Parasite Immunol **12**(6): 687-96.
- Teppa Garran, A. D. and J. Teran Davila (2005). "[New biochemical and molecular aspects of estrogen's action]." Ginecol Obstet Mex **73**(8): 436-42.
- Terrazas, L. I., R. Bojalil, et al. (1994). "A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)." J Parasitol **80**(4): 563-8.
- Toft, D. and J. Gorski (1966). "A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization." Proc Natl Acad Sci U S A **55**(6): 1574-81.



Zenteno (1965). "Aspectos quirúrgicos de 2000 personas internadas en la Unidad de Neurología y Neurocirugía, Hospital General de México, SSA, 1959-1963." Rev Med Hosp Gral. Mex **28**: 515-521.