

03081

8  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**"FEMINIZACIÓN PARASITARIA: UNA NUEVA  
ESTRATEGIA DE MANIPULACION DE LA  
RESPUESTA INMUNE UTILIZADA POR EL  
CISTICERCO DE LA *Taenia crassiceps*"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
D O C T O R E N  
INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A  
BIOL. JORGE MORALES MONTOR

**ASESOR: DR. CARLOS LARRALDE**

**AGOSTO**

**1987**

**TESIS CON  
FALLA DE**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**PAGINACION VARIA**

**COMPLETA LA INFORMACION**

*"No existe nada más satisfactorio que hacer algo que los demás consideran imposible"*

**William Burroughs**

*"Ser audaz es hacer las cosas, no buscar razones para demostrar que no se pueden hacer"*

**Antónimo**

## DEDICATORIAS

• A mi padre Jorge Morales Losada, por enseñarme que a pesar de todas las adversidades uno puede conseguir las metas trazadas, por no escatimar esfuerzos para darnos todo y ser un ejemplo de capacidad, tenacidad, paciencia y ser mi mejor amigo. Sin tu apoyo no hubiera sido posible este logro.

• A mi madre, M<sup>a</sup>. de Lourdes Montor Andrade, por su amor y comprensión, por estar conmigo en todo momento, compartiendo logros y apoyándome en los malos ratos. Por querernos y aceptarnos tal como somos.

••• A la QFB Claudia Hallal Calleros, por haber aparecido en mi vida en el mejor momento, por todo tu amor y comprensión, pero sobre todo, por tu paciencia, y ser el mejor motivo para superarme. Por que tu apoyo y aliento fueron fundamentales para alcanzar esta meta que es de los dos.

•• A mis hermanos: Mori, Tavo, Santa Oscar, y Glúicho, por su cariño incondicional, por que siempre me han respaldado y aceptado como soy, y por que gracias a esos inolvidables ratos compartidos todo ha sido más sencillo. Por ser siempre una familia unida.

✧ A Chantal Deyanira,  
Pamela y Gustavo, por que con  
su llegada la vida adquirió otro  
sentido, y nuestra familia se  
llenó de alegría. Por que sus  
ganas de vivir nos contagian.

✧ A mi tía Luz,  
por ser como mi  
segunda madre.

† A mi tío Jorge Herrera, por  
que donde quiera que esté,  
esta disfrutando este logro  
tanto como nosotros.

♥♥ A mi abuela Graciela  
Andrade, por su cariño  
incondicional a pesar de la  
distancia.

✧ A Don Marcos, Doña Ana Ma.  
Anita, Vinny y Paty, por recibirme  
en su familia con los brazos abiertos.

† A mi abuela Elisa Losada, por  
el amor que nos prodigó. Esta  
meta es un tributo a su  
memoria.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me dio la oportunidad de desarrollarme como profesionista e individuo.

A todos y cada uno de los profesores que intervinieron en mi formación. Gracias a sus enseñanzas, puedo cristalizar esta meta.

A la Dra. Marta Romano Pardo, por su valiosa colaboración en el desarrollo de mi proyecto, tanto intelectual como material, por creer siempre en mí y por sus valiosos consejos, preocupándose por mi vida personal. Gracias por todo.

Al Dr. Carlos Larraide, por aceptarme en su laboratorio y ser mi tutor desde la Maestría, por apoyarme incondicionalmente en todo, por sus valiosos consejos y por sus invaliables opiniones y comentarios durante el desarrollo de la tesis. Gracias por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Marco A. Carbón, por aceptar ser mi co-tutor, darme todas las facilidades para trabajar en su laboratorio y cooperar desinteresadamente en el desarrollo de mi proyecto. También por enseñarme el verdadero espíritu de un científico y por su gran calidad humana. Gracias por su amistad.

A la M. en C. Marcela Arteaga, por su invaluable colaboración y desinteresada amistad.

A mis primos Pascual, Dante, Alfredo, Jaime, Beto y Papé, por todos los coloridos vividos. Así la vida es más placentera.

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Carbón: Mauricio, Christian, Julia, Ignacio Camecho, Adriana, Ana, Sara, Andrea,

**Francis, Gaby, Vanessa, Abelardo, Rocio G., y Juanita.** Por que siempre me ayudaron sin interés, por lo divertido que es trabajar con ustedes y por los buenos momentos compartidos.

**A todos mis compañeros del laboratorio del Dr. Larraide: Doña Chuy, Mónica, Erika, Nacho, Tzipe, Vicky, Alejandro, Goar, Leonor, Bernardo y Miguel.** Por todos los buenos ratos vividos durante el tiempo que estuve en el laboratorio.

**A mis amigos del equipo CINVESTAV: Francis, Pollo, Nervios, Bulbo, Ger, Octagón, Garabato, Magos, Cash, y Martín,** por esos cuatro campeonatos consecutivos ganados, por esas chelas semanales y por tantos y tantos buenos ratos vividos. Fue un buen ejemplo de como llegar y mantenerse.

**A Luz Ma. Buendía,** por su valiosa asistencia secretarial e incansable paciencia.

**A Jesús Velázquez y Armando Vargas,** por su apoyo técnico y desinteresada amistad.

**A los miembros del jurado asignado para revisar la tesis: Dra. Patricia Ostrosky, Dra. Irma Villalpando, Dr. Pascal Herion, Dr. Horacio Merchant, Dr. Leopoldo Santos y Dr. Carlos Larraide.** Gracias por su rapidez en la revisión de la tesis y por sus valiosas sugerencias.

**A Don José,** por su gran trabajo de fotografía en las figuras de esta tesis.

**A todos aquellos que de alguna forma contribuyeron a llevar a buen fin este proyecto.**



**El presente proyecto se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la Dirección del Dr. Carlos Larraide.**

**Se recibió apoyo científico y técnico de:**

**Dra. Marta Romano Pardo (Departamento de Fisiología, CINVESTAV, IPN)**

**Dr. M.A. Carbón Cervantes (Laboratorio de Endocrinología Molecular, Facultad de Química, U.N.A.M.)**

**M. en C. Marcela Artesaga (UAM-Iztapalapa)**

**Biol. Mauricio Rodríguez Dorantes (Laboratorio de Endocrinología Molecular, Facultad de Química, U.N.A.M.)**

**M. en ISS Luis Ignacio Terrazas Vázquez (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.)**

**M. en C. Adriana Méndez Rodríguez (Laboratorio de Endocrinología Molecular, Facultad de Química)**

**Ingeniero Químico Tzipa Govezensky Zack (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.)**

**QFB Carlos Castellanos Barba (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.)**

**Dra. Gabriela Morali (Centro Médico Nacional Siglo XXI)**

**Durante el desarrollo de esta tesis el alumno estuvo becado por el CONACyT Reg. 8916 y complemento de beca de la D.G.A.P.A., U.N.A.M.**

<b>I.- RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>II.- SUMMARY</b>	<b>7</b>
<b>III.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>IV.- ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
A) Cisticercosis murina: un modelo experimental	13
B) Respuesta inmune al parásito	15
<b>V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>16</b>
<b>VI.- HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>VII.- OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
A) Objetivo General	20
B) Objetivos específicos	20,21
<b>VIII.- ARTÍCULOS PUBLICADOS Y ACEPTADOS A PUBLICAR</b>	<b>22</b>
1.- "Sex Hormone Changes Induced by the Parasite Lead to Feminization of the Male Host in Murine <i>Taenia crassiceps</i> Cysticercosis". C. Larralde, J. Morales, L.I. Terrazas, T. Govezensky and M.C. Romano. <i>Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology</i> (1996), 52: 675-686.	
2.- "Inhibition of Sexual Behavior in Male Mice Infected with <i>Taenia crassiceps</i> Cysticerci" J. Morales, C. Larralde, M. Arteaga, T. Govezensky, M. Romano and G. Morali. <i>Journal of Parasitology</i> (1996), 82 (5), 689-693.	
3.- "Tissue damage and differential expression of P-450SCC, P-450aromatase and steroid 5 $\alpha$ -reductase II in the reproductive system of the male during chronic experimental murine <i>Taenia crassiceps</i> cysticercosis" J. Morales-Montor, M. Rodríguez-Dorantes, A. Gamboa-Domínguez and M.A. Cerbón. <i>Journal of Parasitology</i> , Mayo 1997.	
<b>IX.- ARTÍCULOS ENVIADOS A PUBLICAR</b>	<b>23</b>
1.- "Differential expression of estrogen-regulated proto-oncogenes <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i> , <i>bcl-2</i> and the tumor supressor <i>p53</i> gene in the male mouse during chronic infection with <i>Taenia</i>	

*crassiceps cysticerci*" J. Morales, C. A. Méndez, M. Rodríguez and M.A. Carbón. *Parasitology Research*, Agosto de 1997.

2.- "Role of P-450 aromatase during the feminization process produced in the male host chronically infected with *Taenia crassiceps cysticerci*" J. Morales, C.Larrañaga M.A. Carbón and M.C. Romano. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Septiembre, 1997.

<b>X- RESULTADOS ADICIONALES</b>	<b>24</b>
<b>XI- PERSPECTIVAS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>XII- CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>XIII- APÉNDICES</b>	<b>34</b>
1.- REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS GONADAL POR CITOCINAS Jorge Morales y L.I. Terrazas. <i>Boletín de Educación Bioquímica</i> , 1994, Vol 13 # 2	
2.- ESTRATEGIAS PARASITARIAS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Jorge Morales Montor. <i>Boletín de Educación Bioquímica</i> , 1996, Vol	
3.- INTERACCIONES NEURONMONOENDÓCRINAS	35
<b>XIV- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>

## 1.- FUNDAMENTO

Durante la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*, existe un fenómeno de susceptibilidad asociada al sexo, siendo los machos más resistentes que las hembras a la infección aguda, aunque durante la infección crónica, esta resistencia desaparece. El objetivo de esta tesis, fué determinar los mecanismos tanto fisiológicos como moleculares que determinan que la resistencia del macho desaparece. Nuestra hipótesis, supone que el parásito logra igualar el microambiente en el que se encuentra en los machos con el de las hembras, y, de esta forma, se establece en un huésped inmunocompetente e inicialmente resistente a la infección.

Nuestros resultados demuestran que durante la infección crónica, los niveles de estradiol se incrementan 200 veces su valor normal, mientras que los de testosterona disminuyen 90%, así como el peso de vesículas seminales y testículos. Estos cambios endocrinos, coinciden con un importante aumento en la carga parasitaria conforme avanza el período de infección. Este efecto es mediado por los testículos, ya que al gonadectomizar y posteriormente parasitar ratones macho, no se detectan los niveles de estradiol previamente reportados, y si los animales son tratados con testosterona o dihidrotestosterona, las cargas parasitarias disminuyen en un 50%.

Una estrategia simple del parásito para producir este efecto, es activar a la enzima P-450 aromatasas, encargada de metabolizar testosterona a estradiol. De forma tal, que se hicieron experimentos *in vivo*, administrando a los ratones parasitados un inhibidor de la aromatasas. El uso del inhibidor abate el fenómeno de feminización. Al mismo tiempo, la expresión de esta enzima se incrementa en el testículo de los ratones machos crónicamente parasitados, y existe una disminución de la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa de esteroides tipo II.

Para determinar que el cambio en los esteroides sexuales era fisiológicamente trascendente para el huésped, se hicieron experimentos de conducta sexual en los mismos. Conforme avanza el período de infección, los machos parasitados pierden la respuesta eyaculatoria, luego la conducta de intromisión, y, finalmente, la conducta de monta. Esta conducta sexual queda totalmente restaurada al inyectar testosterona o dihidrotestosterona. El

análisis histológico demuestra que el tracto reproductivo de los ratones crónicamente parasitados está completamente atrofiado por que existe una fuerte respuesta inflamatoria.

Dado que existe gran cantidad de células del sistema inmunitario infiltradas en la gónada, y que se conoce que moléculas del sistema inmune, como la interleucina-6 (IL-6) activan en varios sistemas biológicos a la aromatasa, se midieron los niveles séricos de IL-6, así como su producción *in vitro* por los linfocitos de bazo en los animales parasitados. Existe un importante incremento en los niveles de IL-6, tanto en suero, como en su producción por los linfocitos de los machos parasitados.

*In vivo*, al deprimir el sistema inmune (por irradiación o timectomía), y después parasitando a los ratones macho, no se produce la feminización, lo que establece al sistema inmune, y en particular el timo, como claves para producir este fenómeno. Además, estos resultados sugieren que el cicloarco no es capaz de estrogenizar por sí mismo al huésped sin la presencia del sistema inmune y la gónada.

Dado que el timo es clave en este fenómeno, se estudió la participación de genes importantes en la regulación de su función, como son los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *bcl-2* y el gen supresor de tumores *p-53*, que intervienen en el nivel de producción y maduración de las células tímicas. La expresión de *c-fos* está aumentada en los ratones parasitados, mientras que la de *c-jun* lo está sólo en el timo. La expresión de *p-53* está totalmente abolida en todos los tejidos de los ratones parasitados, mientras que la expresión de *bcl-2* se abate sólo en el timo de los ratones parasitados, junto con el nivel de células CD3+, CD4+ y CD8+.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que la feminización parasitaria es un novedoso mecanismo utilizado por el cicloarco de la *Taenia crassiceps* para evadir a la respuesta inmune encargada de su eliminación para establecerse en un huésped inmunocompetente y que inicialmente era resistente a la infección.

## **II- SUMMARY**

During experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* cysticercoid, exists a sex-associated susceptibility, being male mice more resistant to acute infection than female mice. However, during chronic infection, this resistance disappears, and the male mice presents similar number of parasites as the female mice. The aim of this thesis, was to establish the physiological and molecular mechanisms that determine that the initial resistance of the male mice disappears during chronic infection. The hypothesis, suppose that parasite was able to equalize the internal microenvironments between male and female mice, and from this manner, *Taenia crassiceps* cysticercoid was able to establish in an immunocompetent host. Our results show that during chronic infection, there is an increase in serum estradiol levels of 200 folds their normal values, whilst those of testosterone are 90% decreased together with the seminal vesicles and testes weight.

All these endocrine changes, coincide with an important increase in parasite loads as infection progress. This effect is mediated by the testes, since when male mice are gonadectomized and parasitized, there are not estradiol levels detected, and if gonadectomized mice are treated with testosterone or dihydrotestosterone, parasite loads are decreased in 50%.

One simple strategy of the parasite to produce this effect, is to activate the P-450 aromatase, wich is the key enzyme in the bioconversion from testosterone to estradiol. The experiments in wich an aromatase inhibitor was used *in vivo* in parasitized male mice, show that the feminization process is dejected. At the same time, an increase in aromatase expression was detected in the testes of the parasitized mice, whilst the expression of the steroid 5 $\alpha$ -reductase type II (that metabolize testosterone to dihydrotestosterone) was diminished in the reproductive tract of the parasitized male mice, whilst there was no changes in the mRNA content for the side cholesterol cleavage enzyme (P450SCC), wich is the initial step on the steroidogenic pathway.

The impact of these endocrine changes upon sexual behavior was explored in a group of infected BALB/c male mice. Mounting, intromission, and ejaculation responses markedly declined as infection progressed and testosterone declined, however, total restoration of the sexual behavior was observed after testosterone or dihydrotestosterone treatment. Histological

analysis, reveals that the reproductive system of the chronically parasitized male mice, is atrophied because there is a high inflammatory response.

Since a high content of immune cells is found in the reproductive tract of the chronically parasitized male mice, and due that it is well known that molecules of the immune system as IL-6 activates the aromatase enzyme, we decide to measure in the chronically parasitized male mice the production of IL-6 in serum and by spleen cells *in vitro*. Our results shows that exists an important increase in serum IL-6 levels in the parasitized male, as well as in the production of the same by splenocytes *in vitro*.

*In vivo*, when immune system is depressed (by total body irradiation or thymectomy), and after male mice were parasitized, the feminization process is not presented. This results suggest that the immune system is a key factor to produce this phenomenon, and, particularly, the thymus.

Since thymus is a key factor in this feminization phenomena, we decided to study the role of important genes involved in the regulation of thymic function, as are the proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *bcl-2* and the tumor suppressor *p53* gene, that are mainly involved in the production and maturation of thymic cells. The *c-fos* expression is markedly increased in all infected animals compared with control mice, however *c-jun* expression was overexpressed only in the thymus. *p53* expression was markedly reduced in the analyzed tissue of the parasitized male host, and *bcl-2* mRNA content was abolished only in the thymus. At the same time CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell numbers are markedly declined.

The overall results, suggests that the feminization process is a novel mechanism utilized by *Taenia crassiceps* cysticerci to grow better in an initially resistant immunocompetent host.

## **II- INTRODUCCIÓN**

### **Relaciones hormonales huésped-parásito**

Las hormonas esteroides y proteicas son los reguladores primarios del desarrollo sexual, crecimiento, metabolismo, diferenciación celular, reproducción y comportamiento en los animales. Estos mensajeros químicos pueden ser producidos en sitios distantes en glándulas endócrinas o en células adyacentes a través de efectos parácrinos y autócrinos. Muchos de estos procesos son afectados por la presencia de parásitos, tanto en huéspedes vertebrados (principalmente mamíferos) como en algunos invertebrados (principalmente insectos), sugiriendo la posibilidad de modificaciones endócrinas masivas (Beckage, 1985 y 1990; Lawrence, 1988; Thompson, 1993 y Hurd, 1990).

Un parásito exitoso debe de adaptarse bien al medio fisiológico de su huésped, completar su ciclo de vida sin causar la muerte prematura del huésped, y, simultáneamente, completar su desarrollo. Finamente reguladas, las interacciones hormonales forman una red dinámica de comunicación que sirve de unión entre ambos organismos (huésped-parásito) y sincronizan su desarrollo (Dawkins, 1982). Muchos parásitos responden a señales hormonales del huésped, o bien alteran significativamente la fisiología del mismo, modificando los niveles de la biosíntesis de hormonas endógenas (como gonadotropinas y esteroides sexuales), la degradación de las mismas hormonas, o su unión a los receptores blanco específicos (Thompson, 1990). Tales cambios pueden ser mediados por factores asociados con, o producidos por parásitos internos. El estrés nutricional y la disminución parcial o total de los precursores requeridos para las vías biosintéticas o degradativas normales pueden también provocar cambios en la fisiología hormonal normal del huésped parasitado. El éxito en el establecimiento y reproducción de un parásito, frecuentemente aumenta por cambios en el ambiente hormonal del huésped, lo que nos habla de la intrincada relación que guarda el parásito con el medio hormonal que lo rodea. (Beckage, 1991).

Un ejemplo de como las hormonas pueden afectar directa o indirectamente el crecimiento parasitario, lo tenemos en la susceptibilidad a ciertas infecciones asociadas al sexo. Las hembras sufren generalmente con mayor frecuencia de cierto tipo de infecciones y enfermedades autoinmunes que los machos. A este hecho contribuyen múltiples diferencias relacionadas con el sexo, a través de hormonas esteroides sexuales que tienen influencia



sobre el sistema inmune y que influyen sobre la mayor resistencia de los machos a ciertas infecciones (Alexander y Stimson, 1988). Por otra parte, las hormonas del huésped, tanto esteroides como proteicas, pueden también ejercer una influencia directa sobre el proceso de diferenciación del parásito, que desarrolla una respuesta de comportamiento condicionada a los estímulos hormonales del huésped.

Se sabe que la mayoría de endoparásitos secretan moléculas que son hormonalmente activas y se unen a receptores específicos sobre las células del huésped. Este tipo de mimetismo molecular se demuestra, por ejemplo, por el hecho de que, *Schistosoma mansoni* es capaz de sintetizar un péptido análogo a la hormona de crecimiento de mamíferos (GH). Esta molécula secretada por el parásito interactúa con los receptores para GH de mamíferos (hamster y ratones) y provocan efectos tanto sobre el crecimiento, como sobre el sistema inmunitario del huésped, tal y como si fueran una hormona endógenamente producida por el huésped (Beckage, 1991).

Este tipo de interacciones hormonales huésped-parásito están mejor documentadas en insectos e invertebrados, pero se han comenzado a encontrar interacciones similares en mamíferos, que apuntan hacia una regulación de la respuesta inmune por el parásito que modifica el ambiente endócrino (Lin et al., 1992; Carvalho, et al., 1994; Ieroff et al., 1995; Larralde et al., 1995).

En insectos, una hormona esteroide que tiene analogía con las de los mamíferos, es la hormona juvenil (JH). Esta hormona tiene 3 isoformas que son producidas diferencialmente durante los diversos estadios del desarrollo de los insectos. Su función principal es la de encargarse del crecimiento y diferenciación sexual, y algunas veces es responsable de la metamorfosis. El aumento en los niveles de JH ocurre principalmente durante el parasitismo de los huevos de los insectos y sus larvas cuando son invadidos por *Cotesia*, un protozoo que inhibe la metamorfosis (Hegazi et al., 1986).

Los mecanismos de "castración parasitaria" son algunos de los ejemplos que más han llamado la atención. En insectos parasitados por *Ascogaster cuerdidentata* se ha observado que los niveles de JH en la hemolinfa de las hembras están suprimidos, lo cual quiere decir que el *corpore allata* no los produce durante la infección. Como consecuencia, los insectos no producen ovocitos, además de que las células foliculares se atrofan (Hurd, 1990). Se sabe,

que las hembras son el mejor vector para que cumpla su ciclo de vida este parásito, y que cuando *Ascogaster cuadridentata* parasita machos, les provoca una atrofia testicular que conduce a una feminización de los mismos (Reed-Larsen and Brown, 1990). De la misma forma, en la especie de cangrejo comercial *Portunus pelagicus* se ha reportado que la infección por el gusano rizocéfalo *Sacculina granifera* produce una total feminización del macho, ya que al examinar a los machos parasitados se encontró: 1) Un cambio de color en el caparazón, del azul característico del macho a un color café de las hembras 2) El tamaño de la quela abdominal reducido, que iguala en tamaño al de las hembras 3) El abdomen y esternón reducidos, como ocurre en las hembras 4) Normalmente el abdomen presenta sus segmentos fusionados, pero en los machos parasitados están separados como en las hembras 5) Comportamiento de limpieza igual al de las hembras. Además, los machos parasitados presentaron atrofia gonadal, aunado a un comportamiento ecológico similar al de las hembras (Phillips y Cannon, 1978). Este no es un caso aislado en invertebrados, ya que este fenómeno se presenta muy a menudo en este tipo de organismos. En el caracol terrestre, la infección por el esquistosoma *Trichobilharzia ocellata* induce a su huésped molusco intermedio a sintetizar esquistosomina, la cual es un antagonista de la calixina que se une a receptores para hormonas gonadales en el gasterópodo: esto induce una dramática caída en la producción de huevos (De Jong-Brink et al., 1988). Se sabe, por otra parte que los cestodos, tremátodos y nemátodos producen eodisteroides, y estos son detectados en el fluido corporal de los huéspedes vertebrados. También los helmintos producen hormona juvenil, que le ayuda a regular su crecimiento.

En mamíferos, un ejemplo de capacidad de regulación hormonal sexual por el parásito se observó en ratas infectadas con *Taenia taeniformis*. En esta infección experimental, se encontró que las hembras parasitadas tienen el ciclo estral alterado, y que el éxito en desarrollar embriones viables está disminuido. En los machos, hay una caída de los niveles séricos de testosterona, lo que se relaciona con una baja del peso testicular (Lin et al., 1990). En observaciones recientes, se encontró que en ratas chagásicas crónicamente infectadas por el protozoario *Trypanosoma cruzi* los niveles de testosterona se reducen importantemente, y existe una atrofia de las vesículas seminales y testículos de la rata parasitada. Así mismo, se detectaron parásitos en el fluido seminal del macho (Carrara et al, 1994; Carvalho et al, 1994).

Otro caso similar, se presenta en el hamster dorado infectado crónicamente con la larva de *Schistosoma mansoni*, en donde se demostró que existe una pérdida de la conducta sexual, suñado a una baja importante en los niveles de testosterona (Isaroff et al., 1988). Sin embargo, en ninguno de estos reportes se estudió a fondo que era lo que fisiológicamente sucedía en el huésped ni la relevancia que tenían estos cambios endócrinos en relación a la respuesta inmune del huésped, lo cual pudiera determinar el establecimiento exitoso del parásito. En está tesis, se presenta el primer reporte en mamíferos en el cual la infección por un parásito produce la feminización del huésped macho, y este fenómeno se relaciona con el éxito en el establecimiento del parásito en un huésped inmunocompetente, además de determinar los mecanismos fisiológico y moleculares que producen este efecto.

Algunos helmintos tales como *Trichinella ocellata*, *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* tienen sistemas nerviosos y reproductivos bien desarrollados capaces de responder a estímulos hormonales provenientes del huésped, y regular así su alimentación y reproducción con un bajo costo metabólico. Se sabe, que estos parásitos son capaces de regular su alimentación utilizando a la colecistocinina (CCK) liberada al tracto digestivo del huésped (Sulhedo et al., 1988). Además, los efectos diferenciales del sexo del huésped sobre el éxito del parásito pueden de alguna manera reflejar la acción directa de los esteroides sexuales del huésped sobre el parásito (Beckage, 1991).

Se sabe que existen formas de comunicación comunes entre diversos *Phyla* del reino animal, y la falta de comunicación endócrina entre parásitos y huéspedes es excepcional, lo que nos habla de una conservación de mecanismos de comunicación química durante la evolución de diversos grupos de organismos. Los huéspedes producen hormonas que influyen el desarrollo de parásitos específicos, y a su vez los parásitos tienen influencia directa sobre el sistema neuroendócrino del huésped. Se necesita investigar los mecanismos de señalización hormonal en vertebrados e invertebrados, para tratar de entender las sofisticadas estrategias seguidas por los parásitos para establecerse y reproducirse en el ambiente hormonal propio de un huésped metazoario.

#### **IV.- ANTECEDENTES**

##### **A.- *Cisticercosis murina: un modelo experimental***

La cisticercosis experimental murina inducida por inoculación intraperitoneal de los metacóstedos (cisticercos) de la *Taenia crassiceps*, constituye un excelente modelo para el estudio de diferentes aspectos de la relación huésped-parásito y para fines inmunodiagnósticos (Larraide et al, 1980; Sciutto et al, 1981; Huerta et al, 1982; Sojlii et al, 1983; Terrazas et al, 1984). Esta parasitosis es semejante en muchos aspectos a la cisticercosis causada por los metacóstedos de *Taenia solium*, el cisticercos que invade al hombre y al cerdo, y representa un severo problema económico y de salud pública en países subdesarrollados de Asia, África y América Latina (Flieser y Larraide, 1988). Como en otras parasitosis, el cisticercos de *T. crassiceps* causa una infección de naturaleza crónica, durante la cual el parásito se multiplica constantemente sin afectar la sobrevivencia del huésped. Por lo tanto, la relación del parásito con el huésped debe implicar interacción con diversos sistemas orgánicos que dé como resultado una relación equilibrada entre ambos organismos.

Las semejanzas entre *T. crassiceps* y *T. solium* que nos hicieron emplearlo como modelo son: a) tienen un ciclo biológico semejante (de manera natural el ratón contrae la enfermedad al ingerir los huevecillos presentes en el medio ambiente contaminado por heces de carnívoros pequeños (cánidos y felidos) que alojan al parásito adulto en el intestino, y el ciclo se completa cuando estos ratones son devorados por los carnívoros b) las manifestaciones patológicas también son similares, debido a que el cisticercos de *Taenia crassiceps* puede alojarse crónicamente en los ratones sin causar daños importantes a las estructuras vecinas en donde está alojado, aunque, en los últimos estadios hay una ligera inflamación de la serosa intestinal, que es semejante a aquella causada por el cisticercos de la *Taenia solium* en las meninges basales en el hombre c) la similitud estructural, tanto durante el estado de metacóstedo, como el del adulto d) su parecido morfológico (prácticamente son iguales) y d) la similitud antigénica que existe entre *T. solium* y *T. crassiceps*, ya que antígenos de la *Taenia crassiceps* pueden servir como una fuente importante de antígenos útiles para el inmunodiagnóstico en neuro cisticercosis humana (Larraide y cols., 1980) e incluso para vacunación, debido a que en el modelo experimental se ha encontrado inmunoprotección cruzada entre *T. crassiceps* y *T. solium* (Sciutto y cols., 1990).

Se conoce que la infección esta asociada a 2 tipos de factores biológicos del huésped (ratón): genéticos y gonadales (Sciutto et al. 1980).

Dentro de los factores genéticos, se ha demostrado que la susceptibilidad está asociada a la cepa del ratón parasitada. De manera que, existen diferencias a la infección en diferentes cepas de ratón, siendo la más susceptible la BALB/c. Así mismo, la susceptibilidad está asociada al locus del complejo mayor de histocompatibilidad (H-2), ya que cepas con el mismo fondo genético (BALB), pero con diferencias en el locus H-2, presentan diferentes susceptibilidades, siendo la cepa más susceptible la BALB/c AnN (H-2d). Sin embargo, sin importar la cepa de ratón utilizada, ni el locus del H-2 presente, todas las hembras siempre son más susceptibles que los machos a la infección aguda (Sciutto et al. 1980;).

Otro importante factor asociado al modelo, es la cepa de cisticerco utilizada, ya que la cepa IG es de reproducción más lenta que la cepa ORF, que se reproduce mucho más rápido. Sin embargo, aún con la cepa IG, se siguen observando los mismos fenómenos que con la cepa ORF en el ratón, lo que nos sugiere que son factores del propio huésped los que determinan el establecimiento de la infección.

De manera que, con estos antecedentes, decidimos utilizar a la cepa ORF para todos los experimentos, así como a la cepa de ratón BALB/c AnN, que es la más susceptible y en la que más rápidamente se observa el fenómeno de susceptibilidad asociada al sexo.

Interesantemente, en todos los casos, sin importar la cepa de ratón, de H-2 y cepa de cisticerco utilizada, durante la infección crónica, la susceptibilidad asociada al sexo desaparece, y los machos llegan a parasitarse en forma masiva como las hembras.

#### **B.- Respuesta inmune al parásito**

Los primeros en demostrar que el huésped es capaz de montar una respuesta inmune humoral específica en contra de los antígenos del cisticerco de la *Taenia crassiceps* fueron Freeman en 1964 y Chernin en 1977. Poco después, Good y Miller en 1978 observaron *in vitro* el efecto dañino del complemento sobre el tegumento del parásito sin afectar la viabilidad del mismo. Sciutto y cols. (1980) demostraron que la respuesta de tipo humoral es insuficiente para la inmunoprotección en esta parasitosis, y por el contrario, la transferencia pasiva de anticuerpos anti-cisticerco puede incluso facilitar el crecimiento del parásito en el animal receptor. Se conoce que a las 4 semanas de infección, existe un aumento en la

hipersensibilidad de tipo retardada (en inglés, Delayed Type Hipersensivity, DTH), correlacionada con una disminución de la carga parasitaria en ambos sexos (Bojalil y cols., 1993). Al timectomizar animales neonatalmente, se observa que la respuesta DTH disminuye significativamente, mientras que la susceptibilidad al parásito se incrementó en ambos sexos, pero de manera mucho más notable en los machos. Al realizar transferencia pasiva de células esplénicas inmunes enriquecidas en linfocitos T a animales timectomizados, se observó una caída en el número de parásitos con respecto a los que no recibieron células (Bojalil y cols., 1993).

En experimentos hechos recientemente en nuestro laboratorio, se ha encontrado que conforme avanza la parasitosis los títulos de anticuerpos también se elevan, mientras que la inmunidad de tipo celular disminuye, sin llegar a recuperarse. Estos datos en conjunto, nos sugieren que la inmunidad mediada por células (Th<sub>1</sub>) es la principal encargada de la protección contra el cisticerco. De cualquier forma, los mecanismos efectoros precisos de la inmunidad protectora a *Taenia crassiceps* no han sido aclarados del todo, si bien se ha mencionado la participación de eventos de inmunidad tanto celular como humoral.

## V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Previos estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, demuestran que los ratones hembra son más susceptibles a la infección experimental por el cisticarco de la *Taenia crassiceps* que los ratones macho, y que esta susceptibilidad asociada al sexo desaparece durante la infección crónica (Larraide et al, 1995). Al mismo tiempo, se sabe que al gonadectomizar a ambos sexos, desaparece la diferencia de susceptibilidad asociada al sexo, al reducirse el promedio de la carga parasitaria de las hembras y triplicarse el promedio de los machos. Igualmente, se determinó que el efecto de la gonadectomía sólo se manifiesta en presencia del sistema inmune íntegro, ya que ratones de ambos sexos irradiados y después gonadectomizados presentan el mismo número de parásitos (Larraide et al, 1992). Si ambos sexos son gonadectomizados, y se les administra exógenamente 17 $\beta$ -estradiol, la carga parasitaria se incrementan al triple (Terrazas et al, 1994). Por el contrario, la administración de testosterona o dihidrotestosterona inhibe el número de parásitos a las ocho semanas de infección. (Larraide et al, 1995). En otros estudios, se ha demostrado que *in vitro* las hormonas sexuales como son progesterona, testosterona y estradiol no afectan la reproducción, ni el crecimiento de los cisticercos de la *Taenia crassiceps* intactos (Huerta et al, 1992). Todos estos datos, nos hablan de un fuerte control de la infección por factores gonadales.

En 1990, Sciutto y colaboradores demostraron que la vacunación es más efectiva en machos que en hembras, y que la transferencia de suero y anticuerpos de ratones infectados previamente, a ratones sanos, que después se infectaron, es inocua, e incluso facilita la infección. Así pues, la inmunidad humoral (TH<sub>2</sub>) no tienen un papel relevante en la protección de los ratones contra la parasitosis.

Por otra parte, el timo sí afecta de manera importante la susceptibilidad a la infección, ya que ratones de ambos sexos timectomizados neonatalmente y posteriormente parasitados a las 6 semanas de edad, triplican el promedio de sus cargas parasitarias. Sin embargo, la transferencia pasiva de células T a los ratones timectomizados y que posteriormente se parasitaron, disminuye importantemente la carga parasitaria en ambos sexos, llegando a estar al nivel de los controles no timectomizados (Bojallí et al, 1994).

Experimentos recientes de nuestro laboratorio, demuestran que conforme avanza la infección, la respuesta de linfocitos T de bazo a Concanavalina-A también disminuye, y

transferencia pasiva de células T a los ratones timectomizados y que posteriormente se parasitaron, disminuye importantemente la carga parasitaria en ambos sexos, llegando a estar al nivel de los controles no timectomizados (Bojelli et al, 1984).

Experimentos recientes de nuestro laboratorio, demuestran que conforme avanza la infección, la respuesta de linfocitos T de bazo a Concanavalina-A también disminuye, y además, los niveles de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 están disminuidos en los animales crónicamente parasitados, mientras que los niveles de IL-6 e IL-10 están aumentados (Terrazas et al, 1997). Estos datos, sugieren que la inmunidad principalmente encargada de la defensa del huésped contra la infección experimental es la celular (TH<sub>1</sub>) y que la inmunidad humoral ( TH<sub>2</sub>) es irrelevante e incluso facilita a la infección.

Así pues, se propone un sistema de interacciones gónada-sistema inmune en el cual los factores ováricos (estradiol) inhiben los eventos inmunitarios celulares que participan en el ataque al cisticerco, y los factores testiculares (andrógenos) los estimulan.

La razón fundamental para abordar este problema de esta forma, se basa en que existe información relevante sobre la influencia del sexo del huésped sobre la susceptibilidad a muchas enfermedades parasitarias, y se reconoce ampliamente en la actualidad como un factor relevante participante en la relación huésped-parásito. Sin embargo, la investigación de las causas de este fenómeno de susceptibilidad asociada al sexo no se han llevado a cabo en ningún modelo experimental. Por otra parte, se dispone de un modelo adecuado para el estudio de este problema, como lo es la cisticercosis experimental murina producida por el metacástodo de la *Taenia crassiceps*, que ofrece facilidad de manejo en los organismos infectados y control de las características, tanto del parásito como del huésped, permitiendo la exploración sistemática de los factores involucrados en la determinación de la susceptibilidad.

Como ya se menciona, la cisticercosis experimental murina producida por *Taenia crassiceps*, muestra muchas similitudes, tanto, estructurales, morfológicas e inmunológicas con la cisticercosis humana y porcina, producida por *Taenia solium*, lo que hace al modelo experimental excelente para tratar de entender la enfermedad tal y como se manifiesta en cerdos y humanos, en los cuales muestra características muy complejas.

Sin embargo, y a pesar de la importancia del modelo, las interacciones huésped-parásito no se han estudiado en toda su complejidad. De esta forma, los resultados



encontrados en este trabajo serán de utilidad para desarrollar otros estudios en cisticercosis, como por ejemplo, el desarrollo de una vacuna, no sólo contra la cisticercosis, sino contra varias enfermedades producidas por cestodos o por parásitos en general, ya que el primer paso para el desarrollo de ésta, es el conocer la relación huésped-parásito de la manera más completa, y entender los factores involucrados en el establecimiento del parásito en un huésped inmunocompetente desde todos los puntos de vista posibles. De forma tal, que el modelo es excelente para estudiar las relaciones huésped-parásito que se presentan durante una infección crónica.

## **VI.- HIPÓTESIS**

Si durante la infección crónica el cisticerco logra igualar los microambientes hormonales en ambos sexos, por una interacción inmuno-endócrina, de manera que este cambio determina la desaparición a largo plazo de la resistencia inicial del ratón macho a ser colonizado por el parásito, entonces éste disminuirá lo que es restrictivo para su crecimiento (andrógenos) y provocará un incremento del metabolismo hacia la producción de factores permisivos para su crecimiento (estradiol). De tal forma que si existe un cambio en el ambiente endocrinológico del huésped, éste se producirá como consecuencia de un daño a nivel celular y molecular tanto en el sistema reproductivo (testículos), como en el sistema inmunitario (timo), lo que determinará el establecimiento del parásito en un huésped inmunocompetente e inicialmente resistente a la infección. Además, este cambio de esteroides sexuales redundará en la alteración de funciones fisiológicas importantes del huésped macho, como son la reproducción. Entonces, el éxito del establecimiento del parásito se derivará de un manejo immunoendocrinológico del huésped macho.

## VII - OBJETIVOS

### A - OBJETIVO GENERAL

1.-) Determinar los mecanismos inmunoendocrinológicos por los cuales el cisticerco de la *Taenia crassiceps* logra vencer la resistencia inicial del ratón macho a la parasitosis durante la infección crónica.

### B - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.-) Investigar si existe un cambio en la producción de esteroides sexuales en el ratón macho durante el paso de infección aguda a crónica.

2.-) Estudiar si como consecuencia del cambio de esteroides sexuales en el ratón macho, existe daño macroscópico y microscópico a nivel del sistema reproductivo.

3.-) Si existe un cambio en la producción de esteroides sexuales del huésped, determinar los mecanismos moleculares que producen este cambio en el ratón macho crónicamente infectado con el cisticerco de la *Taenia crassiceps*.

3.-) Esclarecer el efecto de los esteroides sexuales testosterona, dihidrotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol sobre el establecimiento y crecimiento del parásito durante la cisticercosis experimental murina.

4.-) Estudiar el efecto del 17 $\beta$ -estradiol, testosterona y dihidrotestosterona sobre la respuesta inmune de los machos y las hembras durante la infección crónica con el cisticerco de la *Taenia crassiceps*.

5.-) Estudiar el comportamiento sexual del ratón macho durante la cicloprosis experimental murina.

6.-) Determinar si existe una interacción immunoendócrina que afecte el establecimiento y reproducción del cicloproco de la *Taenia crassiceps* durante la infección crónica.

7.-) Establecer si durante la infección crónica por el cicloproco de la *Taenia crassiceps* en el ratón macho, existen cambios en la expresión de genes estrógeno-regulados como los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*, además de *bcl-2*, y el gen supresor de tumores *p-53*, que a su vez regulan la expresión de otros genes importantes en la función del sistema inmune y endócrino.

8.-) Determinar si la expresión de estos genes estrógeno-regulados afecta de manera importante la función y maduración de células tímicas.

9.-) Establecer si el cicloproco de la *Taenia crassiceps* es capaz de utilizar el mismo mecanismo de evasión de la respuesta inmune en el macho crónicamente parasitado en una cepa de ratón más resistente a la infección, como es la cepa BALB/c.

## **VIII.- ARTÍCULOS PUBLICADOS**



## Sex Hormone Changes Induced by the Parasite Lead to Feminization of the Male Host in Murine *Taenia crassiceps* Cysticercosis

C. Larraide,<sup>1</sup> J. Morales,<sup>2</sup> I. Terrazas,<sup>1</sup> T. Govezensky<sup>1</sup> and M. C. Romano<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 7022B, México, D.F. 04510, México and <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Laboratorio de Endocrinología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740 México, D.F. 07000, México

Female mice are more susceptible to *Taenia crassiceps* (TC) infection than males. However, after a month parasite load increases massively in both genders reaching thousands of parasites per host. The possibility of hormonal changes in the infected mice was envisaged. Sex hormones levels were assayed after different periods of infection, the parasites present in the peritoneal cavity were cultured and gonads, testes and seminal vesicles were weighed. In male mice, serum estradiol increased to levels 200 times their normal values whilst those of testosterone decreased 90% relative to controls. The weight of seminal vesicles was significantly diminished. Infected female mice also showed a slight increase in estrogen blood levels after 8 weeks of infection and the weight of the uterus was significantly increased relative to controls. Serum estradiol and testosterone were almost undetectable after gonadectomy. Cytokines such as IL-6 are capable of stimulating aromatase activity and we found that splenocytes from infected mice produced amounts of IL-6 higher than control as measured by ELISA. In conclusion *T. crassiceps* infection triggers a feminization process in the infected hosts. The gonads are required for the parasite to induce higher estrogen synthesis. IL-6 could be involved in the immunendocrine mechanism used by the parasite to maintain a highly permissive environment for its rapid growth.

*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 52, No. 6, pp. 575-580, 1995

### INTRODUCTION

The sexual dimorphism that exists in the normal immune response and in many autoimmune diseases strongly suggests that a linkage between the immune and the reproductive endocrine system exists [1,2].

Endocrinological, reciprocal interactions between host and parasite are receiving increased attention as influential in parasite success [3]. For instance *Taenia taeniformis* is known to alter reproduction in rats by somehow interfering with the normal functions of sex steroids [4]. The reproduction of *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* is modulated by ecdysteroids [5]. Sexual changes in body morphology as well as sex-

related behavioral changes have been observed in crabs when parasitized with *Rhizocefalan* [6] through mechanisms that are still obscure and could involve changes in the hormonal pattern of the host. Sex preferences in several parasite diseases are well known [7-14].

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* has been used to explore the role of biological factors involved in host susceptibility. Several factors, such as genetics (major histocompatibility complex) and immune status (vaccinations), affect parasite growth [15, 16]. Furthermore, susceptibility to *T. crassiceps* infection in mice is associated with sex: in early infections females carry larger parasite loads than males although, later on, males also become massively parasitized [15]. The sluggish massive colonization of male mice by *T. crassiceps* suggested a sex hormone change in the host induced by the parasite resulting later-on

\*Correspondence to M. C. Romano.  
Received 3 Nov. 1994; accepted 31 Jan. 1995.

in an increased susceptibility to the infection. To test the hypothesis we measured the level of major sex hormones and the weights of their target organs in chronically parasitized male and female mice. Gonadectomies, and androgen reconstruction, were performed to identify the specific organs and hormones involved in the host-parasite interactions. IL-6 was also studied, as a possible candidate mediating hormonal changes [17] in infected mice [18].

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Male and female Balb/c inbred mice were bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations, starting with original stock from Jackson Labs in 1982, and were fed Purina's Diet 5015 ad libitum.

### Parasites and experimental infections

The fast-growing ORF strain of *T. crassiceps*, isolated by Freyman in 1962 [19], was used for mice infection in all experiments and was supplied by Dr B. Bänder (Behringwerke, Marburg, Germany) in 1986. Since then the parasites have been maintained in female Balb/c mice by i.p. sequential inoculation of metastases in their peritoneal cavity [19]. Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 weeks before. Ten small (approx. 2 mm diameter) non-budding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected i.p. into each 42-day-old mouse using a 25 gauge needle. Mice were sacrificed (etharization) in different periods after infection and all the cysts found inside the peritoneal cavity were counted. A complete parasitic count was performed visually in each mouse after sacrifice by collecting all parasites present in the peritoneal cavity after thoroughly rinsing it with phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M). An autopsy followed, including gonads and uterus' or seminal vesicles' weight determinations. Organs were placed in 10% formalin for ulterior light-microscopy examination. In this form of disease the parasites do not migrate to another location in the host. Heavily parasitized mice show enlarged abdomens but the disease does not seem to alter other features nor normal body weights (discounting the weights of parasites, which may actually equal that of the host, approx. 25 g).

### Treatment procedures

Gonadectomies were surgically performed under ether anesthesia on 6-week-old mice of both sexes. Mice were then allowed a 1 week recovery period before inoculation with parasites. In reconstitution experiments, androgen was administered 7 days after gonadectomy with either testosterone or 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (0.5 mg in 3 weeks release pellets,

Innovative Research of America, Toledo, OH). After another 7 days mice were inoculated with parasites as described above. The effects of the androgens upon parasite loads were measured 8 weeks after infection.

### Hormone measurements

Blood for estradiol and testosterone determinations was collected *in vivo* by retrocular venous puncture performed in mice under ether anesthesia. After incubation for 18 h at 4°C the blood clot was centrifuged and serum was separated. Steroids were ether-extracted and solubilized in the phosphate buffer used for radioimmunoassay (RIA) [20, 21]. The concentrations of estradiol and testosterone were determined by RIA, each in duplicate. The antisera were all supplied by ICN Biomedical Inc. (Costa Mesa, CA). The estradiol antiserum cross-reacts 2.5% with oestrone and 1.3% with 17 $\alpha$ -estradiol, and the testosterone antiserum cross-reacts 18.8% with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) and 3% with 5 $\alpha$ -androstene-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diol. Tritiated ligands 1,2,4,6-<sup>3</sup>Htestosterone and 1,2,4,6-<sup>3</sup>Hestradiol were supplied by New England Nuclear (Boston, MS). RIA data were analyzed by the logit/log regression analysis as described [20, 21].

### Interleukin-6 assays

IL-6 measurement in stimulated lymphocytes [22] and in serum were performed by ELISA using a kit of Pharmingen (San Diego, CA). Lymphocytes were obtained from the spleens of 4 and 32 weeks parasitized animals and their respective controls. Cells were cultured in the presence or absence of concanavalin-A, and after incubation (37°C, 48 h) IL-6 was measured in the culture medium by ELISA, following the kits' instructions.

## RESULTS

### Parasite load

A few days after inoculation cysticerci begin active asexual reproduction by budding in one of the poles of their oblong cystic structure [Fig. 1(b)]. A few months later they count in the hundreds or thousands, reaching masses that may equal those of the host [Fig. 1(a)] illustrates the differences in abdomen size between a normal mouse and its parasitized litter-mate after 6 months of infection). *T. crassiceps* cysticerci initially grow faster in females than in males but, in late infections, males are also burdened by huge parasite loads (Table 1). Health of the massively parasitized mice is not seriously affected in laboratory conditions nor are there macroscopic or microscopic signs of serious illness or malnutrition.

### Testosterone and estradiol serum levels

Figure 2 shows the results obtained measuring serum levels of testosterone and estradiol in male and female mice during the course of cysticercus infection. The

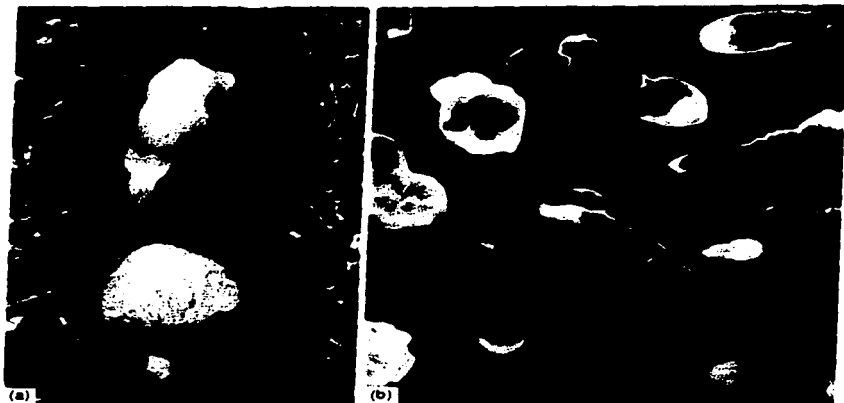


Fig. 1. Main features of experimental murine cysticercosis. (a) This figure illustrates the differences in abdomen size between a normal mouse and its parasitized litter-mate after 6 months of infection. (b) Asexual reproduction of parasites begins a couple of weeks after injection into the peritoneal cavity of mice.

growth of the parasite in the abdominal cavity of males is followed by an increment in blood estradiol that increases to levels 200 times their normal values whilst that of testosterone decreases 90% relative to control [Fig. 2]. Infected females also show increased blood levels of estradiol at 8 and 16 weeks after infection [Fig. 2].

#### Weights of uterus and seminal vesicles

The weight of the uterus in infected females is increased relative to controls after 4 weeks of infection and remains hypertrophied at 16 weeks of infection (Fig. 3, bottom). The weight of the seminal vesicles is

significantly reduced in parasitized males after 4 weeks of infection and differences continued being evident at 8 and 16 weeks post infection (Fig. 3, top).

#### Effects of gonadectomy

The origin of the increment in blood estradiol was examined by simultaneously studying parasite loads and levels of sex steroids 4 and 8 weeks after experimental infection in both control and gonadectomized male and female mice, a time of infection when major endocrinological alterations were clearly detectable in the previous experiments with intact mice. After gonadectomy serum estradiol and testosterone decreased

Table 1. Time-course of infection in male and female mice. Initially *T. Crassiceps* cysticerci grow faster in females than in males but, in late infections, males are also burdened by huge parasite loads

	Infection time (days)									
	1	2	3	5	8	15	20	30	60	150
Female	0.8 ± 0.4 n = 9	1.8 ± 1.0 n = 5	3.1 ± 0.5 n = 19	0.6 ± 0.3 n = 14	5.9 ± 0.5 n = 53	10.8 ± 1.0 n = 20	25.7 ± 4.5 n = 27	131.8 ± 5.1 n = 371	582.1 ± 40.4 n = 34	2642.9 ± 171.8 n = 18
Male	0.4 ± 0.2 n = 9	0.5 ± 0.2 n = 6	2.1 ± 0.5 n = 19	0.0 ± 0.0 n = 14	2.2 ± 0.3 n = 53	6.3 ± 0.8 n = 20	7.6 ± 1.4 n = 28	30.0 ± 1.9 n = 329	247.5 ± 49.9 n = 28	1144.3 ± 130.3 n = 19

Data represent mean ± SE of individual parasite loads of a total of 573 female and 525 male infected, and otherwise untreated mice, registered in the database, over a number of experiments performed at different times.



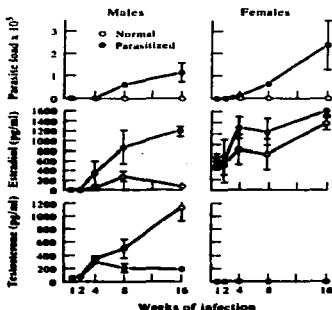


Fig. 2. Impact of cyclospora on levels of sex-steroids. Modifications in individual parasitic oocysts and in estradiol and testosterone serum concentrations of male and female mice after different weeks of intraperitoneal infection. Each symbol in the graph represents the mean  $\pm$  1 SD of the response variable as obtained from at least 5 mice in each time of infection, and by duplicate in each mouse for sex steroid assessments. The experiment was performed a second time in the same conditions with essentially the same results.

to almost undetectable levels in both male and female mice (not shown). However, 8 weeks after infection, the parasite loads in gonadectomized males were greater than those of intact controls and smaller in gonadectomized female mice than those of controls (Table 2).

#### Effects of androgen reconstitution

To test the androgen's parasite restrictive activities, testosterone and DHT were administered to gonadectomized male and female mice as described. Both testosterone and DHT decreased parasite load, although the effect of androgens on males is less significant (Table 2). Testosterone decreased parasite load by 32% in females ( $P < 0.01$ ) and by 32% in males ( $P < 0.01$ ), while DHT decreases 34% parasite load in females ( $P < 0.01$ ) and 27% in males ( $P < 0.01$ ).

#### IL-6 assays

Table 3 and Fig. 4 show the results obtained in this set of experiments as performed in intact control and parasitized male and female mice. Serum levels of IL-6 are significantly increased in parasitized male and female mice and so is IL-6 production in the cultured medium of lymphocytes from parasitized mice 4 and 32 weeks after infection.

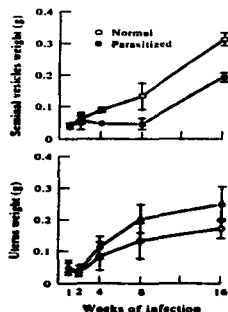


Fig. 3. Impact of cyclospora on sex-steroids target organs. Wet weights (average  $\pm$  1 SD;  $n = 5$  for each time) of sex-steroids' main target organs of mice in the course of intraperitoneal infection with *T. crassiceps* cyclospore. The weight of seminal vesicles are reduced relative to control mice after 4 weeks of infection ( $P < 0.01$ ), whereas the weight of uterus increased significantly in infected females after 8 weeks of infection ( $P < 0.05$ ). Statistics were calculated by analysis of variance of the multifactorial design with gender, weeks of infection and infested or not, as treatment variables; and weight of organs as response variable, and replicates (mice) = 5 in each treatment combination. Data express the mean  $\pm$  1 SD.

## DISCUSSION

The measurement of sex steroids in infected male and female mice indicates that *T. crassiceps* triggers a feminization process in both genders. Feminization is most outstanding in male mice where blood estradiol increases to levels 200 times their normal values, roughly similar to those of normal females, whilst those of testosterone decrease 90% relative to control. The weight changes in target organs sex hormones (seminal vesicles and uterus) support that the hormone changes in the infected host are physiologically relevant.

Table 2. Parasite load 8 weeks after infection with *T. Crassiceps* in intact (P) and gonadectomized (Gx) male and female mice. Some animals were implanted with testosterone (T) or dehydrotestosterone (DHT) release pellets

n	Female		Male	
	P	GxP	P	GxP
10	998.90 $\pm$ 519.22	188.90 $\pm$ 93.32	276.80 $\pm$ 50.98	302.30 $\pm$ 103.39
10	GxP + T	186.70 $\pm$ 50.01	205.40 $\pm$ 28.64	
10	GxP + DHT	182.10 $\pm$ 57.73	221.67 $\pm$ 81.06	

Data represent mean number of parasites/mouse  $\pm$  SD.

Table 3. Serum IL-6 concentration in male and female mice after 4 and 8 weeks of infection

	Female	Male
4 weeks		
Control	25.01 $\pm$ 14.44	0.964 $\pm$ 0.556
Parasitized	110.70 $\pm$ 66.05	45.98 $\pm$ 20.52
8 weeks		
Control	119.10 $\pm$ 8.60	82 $\pm$ 57
Parasitized	136.78 $\pm$ 90.65	165.13 $\pm$ 12.49

IL-6 (pg/ml) was determined by ELISA in each serum by triplicate.

Data represent mean  $\pm$  SD.

How does the cysticercus manage to feminize and demasculate its host? Perhaps the cysticercus favors its growth by producing its own estrogens (as *Spirometra musmolderei* produces a kind of growth hormone when infecting rodents [23] and many other parasites produce ecdysone [3]), or somehow stimulates the host's endocrine system towards abnormal estrogen synthesis. Serum estradiol and testosterone decreases to almost undetectable levels in infected gonadectomized mice, thus indicating that the host's gonads are re-

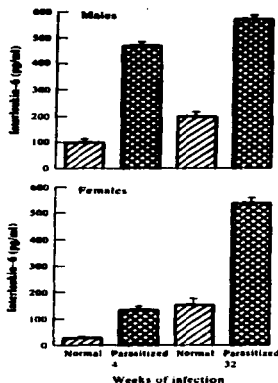


Fig. 4. Production of IL-6 by lymphocytes. IL-6 production was measured in the culture medium of spleen lymphocytes of male (top) and female (bottom) mice after being cultured for 48 h in the presence of concanavalin-A. Data represent mean  $\pm$  1 SD of an experiment made by triplicate at 4 and 32 weeks of infection.

quired for the parasite to induce high estradiol synthesis in both sexes. However, the absence of estrogens does not prevent the growth of parasites in both genders demonstrating that although estradiol favors *T. crassiceps* development [24-26] it is not indispensable for parasite growth. Other gonad-associated factors in the control of parasite growth and a more intricate strategy in the parasite's activity has to be considered. Perhaps the low androgen levels are the principal feature in this intriguing puzzle. Because the parasite-loads of males increased upon castration, even in the absence of estradiol, we suspected that androgens are inhibitory, a hypothesis that was confirmed when testosterone and DHT decreased parasite loads in gonadectomized male and female mice.

At this point we conclude that sexual differences in parasite loads in intact mice favor females because estradiol promotes and androgen restricts the growth of *T. crassiceps* cysticerci. We further deduce that the cysticerci eventually grow as massively in male as in female hosts because it induces an estrogenization and deandrogenization process in the male host by disabling the normal hormonal function of the testis.

A simple strategy of the cysticercus to achieve these high levels of estradiol and low levels of testosterone in the male host would involve stimulation of the aromatase pathway, the enzyme responsible for the conversion of testosterone to estradiol [27]. This possibility would also be consistent with the preference of the parasite towards females in the normal hosts, in which through an active aromatization process high levels of estradiol are naturally being produced.

Speculations about an enhanced aromatase activity requires revision of the factors involved in its modulation. For instance, IL-6 has been shown to stimulate aromatase activity in breast cancer cells [17] and to be deeply altered in a variety of infections [18]. Thus, we measured the production of this cytokine in parasitized mice. The results shown in this paper demonstrate an important increment in IL-6 concentration of blood and culture medium of lymphocytes from parasitized mice, that could be a factor involved in the feminization process that develops in infected mice.

The cunning hormonally based strategy employed by *T. crassiceps* to establish an unsexually mass of foreign tissue in an initially normal comparatively resistant male mouse may be of interest for consideration in other chronic and massive host-parasite confrontations. Host feminization by parasitic disease illustrates the plasticity of sexual phenotype in response to infections involving the immune system and, by endangering the reproductive capacity of the host, poses novel forms of affecting the evolution of both host and parasite other than the prey/predator approach.

*Acknowledgments*.—This work is part of the PhD thesis of Jorge Morales M. who is a CONACYT fellow. This work was supported in part by Grant #209393 of the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, and by the Grant #1276-N9264 of

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México. The authors wish to thank Dr César Lomeli for providing and taking care of the water used in these experiments, and Luz María Domínguez for expert and patient word processing. We are also grateful to Drs. Mafalda Pacheco, Edelmundo Lomeli, Víctor González, Leticia Orosio Ortiz and Raúl Mancilla for criticism and helpful suggestions.

## REFERENCES

- Grossman C. J., Rosillo G. A. and Mendirubali C. L. J.: Sex steroid regulation of gonadotropin. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 619-637.
- Hama-Delarche F., Filippovich F., Charoff N., Nadeau E. A., Bush J. P. and Davidson M.: Sex steroids, glucocorticoids, stress and gonadotropin. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 619-637.
- Bohacek M. E.: Host-parasite hormonal relationships: a common theme? *Exp. Parasitol.* 72 (1991) 332-338.
- Lin Y. C., Kikkawa Y., Kono H. and Oh Y.: Effects of larval exposure (*Taenia taeniiformis*) infections on reproductive functions in male and female host rats. *Exp. Parasitol.* 70 (1990) 346-352.
- Bohacek G. C., Adams S. G., Ross H. M. and Howarth B. E.: The effect of androgens on the microbial production of *Bregia pabuli* and the control of immune constituents in the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Parasitol. Res.* 77 (1991) 65-71.
- Phillips W. J. and Cannon L. B. G.: Ecological observations on the commercial sand crab, *Parasquilla pulegiata* (L.), and its parasite, *Saundersia quadrata* Bushman, 1973 (Ciliophora: Balantidophila). I (1978) 137-169.
- Bohacek G. J., Stewart G. L., Kesteven G. W. and Kesteven M. A.: The effects of host sex and hormones on *Frederickia stultorum* in the mussel. *Parasitol.* 87 (1981) 265-273.
- Philippovich F., Matuschewski P., Bush W. P. M., Schimmler-Wrede W. P. M. and Matuschewski H.: Testosterone and other steroid hormones control the efficacy of genes controlling resistance to *Frederickia stultorum* in the mussel. *Parasitol.* 113 (1991) 357-363.
- Peng G. and Lomeli M.: *Taeniopsis grandis*: decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Exp. Parasitol.* 64 (1988) 49-56.
- de-Saena S., Olson M. J., Corvao-Oliveira E. and Coffey D. G.: *Schistosoma mansoni*: immunity, autohygiene and susceptibility to infection in male and female mice. *Exp. Parasitol.* 73 (1992) 169-175.
- Shaw W. P., Wamboldt P. and Johnson H.: Phorbol ester administration suppresses autohygiene, but not stress dependent immunity. *Exp. Parasitol.* 75 (1992) 168.
- Mohr B. A. and Macy C. A.: Hormonal modulation of sex differences in *Schistosoma mansoni* ovarian infections. *Parasitol.* 96 (1988) 331-6.
- Hirotsugu, Mochizuki, Hori Y., Tsumahira K. and Fujita K.: Effect of stressors on the susceptibility of C57 BL/6 mice to infection with *Bregia pabuli* with reference to influenza and pneumo. *Parasitology* 78 (1989) 455.
- Saenz C. B.: Host hormones and parasitic infection. *Int. Rev. Tropical Med.* 13 (1988) 101-158.
- Sciama E., Frasco G., Diaz M. L., Valdez F., Lomeli C., Grossman C. B., Muroya R. M. and Larralde C.: Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: MZ and sex influence on susceptibility. *Parasitol.* Res. 77 (1991) 243-246.
- Sciama E., Frasco G., Trueta L., Lomeli D., Diaz M. L., Muroya R. M., Grossman C. B., Lomeli C. and Larralde C.: Cysticercosis infection: stress potentiating immunity with *Taenioclonus ocellatus* against experimental murine cysticercosis. *Parasitology* 112 (1990) 687-696.
- Reed M. J., Topping L., Colburn N. G., Parohit A., Ghillichik M. W. and Jones V. H. T.: Control of arachidonic activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 589-596.
- Kopf M., Baumann M., Furrer G., Frensdorfer M., Lanero M., Tschannin K., Zuberwagel H., Blumhagen H. and Köhler G.: Impaired immune and neurohormonal responses in interleukin-6 deficient mice. *Nature* 356 (1994) 330-342.
- Franssen B. B.: Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeller 1880) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 49 (1981) 869-900.
- Aguiar G. and Bushman M.: Influence of the thymus on parasitogenesis by rat ovarian cell *in vitro*. *J. Endocr.* 3 (1969) 367-373.
- Reyes-Santana J. and Ramirez M.: An egg-dependent thymic secretion modulates mast cell function. *J. Steroid Biochem.* 36 (1989) 541-543.
- Grove C. W. and Kesteven B. G.: Lymphoblasts from immunized *A. mus musculus* lymphocyte cultures rat granulosa cell neuroendocrine. *Endocrinology* 123 (1988) 3453-3471.
- Plattin C. K., Shaffer J. L. and Hirsfeld M. L.: Molecular aspects of host-parasite interactions. In *Immune Regulation and Assays* (Edited by L. M. J. Van Der Pluijm, C. B. Casan and H. J. Vange). Academic Press, NY (1989) Chap. 13, pp. 109-161.
- Muñoz L., Torres I. I., Salazar E. and Larralde C.: Immunohistochemical evidence of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* neurocystodes. *J. Parasitol.* 78 (1992) 471-476.
- Salazar E., Torres I. I., Grossman T., Sciama E. and Larralde C.: Thyroid-related cellular immune mechanisms in sex-diminished responses to murine rat granulosa cell cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 78 (1992) 471-476.
- Torres I. I., Salazar E., Grossman T. and Larralde C.: A rat for 17 $\beta$ -oestradiol is immunomodulatory regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 89 (1993) 563-569.
- Neil Matt P.: Testicular steroid synthesis: organization and control. In *Testosterone in Testes and Ovaries* (Edited by J. Karsh and J. D. Neil) Raven Press, NY (1988) Vol. 1, pp. 975-998.

## INHIBITION OF SEXUAL BEHAVIOR IN MALE MICE INFECTED WITH *TAENIA CRASSICEPS* CYSTICERCUS

J. Morales, C. Larralde, M. Arteaga\*, T. Gouveanahy, M. C. Ramirez†, and G. Morán‡

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 04510, México DF, México

**ABSTRACT:** Premature spermatization and demasculinization occur in male mice as a consequence of experimental intraperitoneal infection with *Taenia crassiceps* cysticercus. The impact of 15 wk of cohabitation with infected females on the endocrinological male mice, including testosterone, and epididymal regression intensity declined as infection progressed. Sex-steroid effects induced by the infected mice during the infection period were similar to those observed in castrated mice, and their testes increased, until, by the 13th wk, some of the parasitized mice showed any sexual response with female mice. Fifteen weeks after infection, the number of spermatozoa per head had increased to a couple of thousand, the mean serum testosterone level was 4 times higher than the normal level, and 20% of the parasitized mice showed any sexual response. The inhibition of sexual behavior resulted from the decrease in testosterone levels, a group of 8-10 infected mice survived testosterone, and complete restoration of their sexual behavior was observed. Inhibition of masculine animal behavior during the infection period is the result of hormonal changes, estradiol being ineffective in maintaining copulations.

Sexual dimorphism is recognized in numerous diseases and parasite infections of vertebrates. It is generally held that males are more susceptible than females to bacterial and protozoan infections (Ahmed et al., 1983; Alexander and Stimson, 1988). However, males are more resistant than females to some cestode parasites (Dobson and Owen, 1978; Chernigoi et al., 1981; Bundy, 1982; Scituito et al., 1991). Some differences in susceptibility to parasites could stem from sexual dimorphism in immunity, with the cellular immune response in females being less effective than in males, presumably because of the differential production of estrogen (Alexander and Stimson, 1988). In addition, reciprocal endocrinological interactions between host and parasite are being recognized as influential in parasite success (Backage, 1991). There are sexual changes in body morphology as well as sex-related behavioral changes in crabs when parasitized with a rhizocephalan (Phillips and Cannon, 1978) through mechanisms that are still obscure but could involve changes in the hormonal pattern of the host. *Taenia taeniiformis* is also known to alter reproduction in rats by interfering with sex steroids (Lin et al., 1990); the reproduction of *Brugia pahangi* and *Divorharia immitis* is modulated by ecdysteroids (Barber et al., 1991). The possibility of combined immunoendocrinological interaction in host-parasite systems is intriguing.

In experimental acute murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962, 1964; Culbreth et al., 1972) there is a remarkable sex-associated susceptibility in all strains of mice studied, with female mice being more susceptible than males as measured by parasite loads 30 days after infection (Dorais and Eick, 1969; Scituito et al., 1991; Boudali et al., 1993). However, in chronic infections sex-associated differences in parasite loads tend to diminish, with parasite loads in males eventually be-

coming as large as those of females. The less increase in parasite numbers in males is associated with an increase in their serum estrogen levels and a decrease in testosterone (Larralde et al., 1993). On the other hand, immunological experiments have demonstrated that 17 $\beta$ -estradiol positively regulates parasite reproduction in hosts of both genders, presumably by interfering with the thymus-dependent cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth (TH1) and enhancing those that facilitate it (TH2) (Terrasas et al., 1994). Thus, the striking differences in susceptibility to cysticercosis between female and male mice may involve the joint action of the immune system and the gonads, both influenced by a parasite that finds the female environment more favorable for subsistence and reproduction and resourcefully changes the male environment when it happens to infect males.

If the hormonal changes induced in the male host by the parasite affect other functional spheres of the host besides the immunological system is also of interest in the wide biological sense of host-parasite coevolution and in the more restricted but practical matter of the parasite modifying the gender-associated behavior of the host. Thus, we assessed the sexual behavior of male mice during 15 wk of intraperitoneal infection with *T. crassiceps* cysticercus and correlated the pattern of sexual behavior with parasite intensity and hormonal changes in the host.

### MATERIALS AND METHODS

Balb/c inbred mice of both sexes were bred in our animal facilities by the "single line breeding system" over 20 generations, starting with original stock from Jackson Laboratories in 1962. Mice were fed Purina Diet 5015 and sterile water ad libitum. They were maintained under a reversed light-dark cycle (14 h light:10 h dark). Six-week-old male subjects ( $n = 11$ ) were selected on the basis of their normal display of the pattern of sexual behavior, including ejaculation in at least 1 of 2 screening tests.

The fast growing ORF strain of *T. crassiceps* (Smith et al., 1972) isolated by Freeman (1962) was used for mice infection in all experiments. The parasites have been maintained in female Balb/c mice by intraperitoneal sequential inoculation of meicrocysts into their peritoneal cavity. Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected for 2-6 mo. Ten small (approximately 2 mm in diameter), nonbudding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml phosphate-buffered saline (PBS: 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium

Received 14 December 1995; revised 24 May 1996; accepted 24 May 1996.

\* Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, AP 55-535, México DF 09340, D.F., México.

† Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencia, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, AP 14-740, México 07000, D.F., México.

‡ Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, AP 73-032, México 03020, D.F., México.

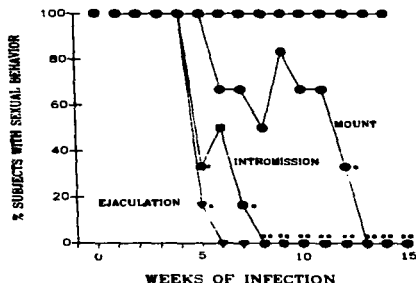


FIGURE 1. Effect of infection with *Toxaria chrysozoni* cysticercus upon the percentage of male mice showing sexual behavior. Week zero corresponds to the test performed 1 wk before infection. Control mice ( $n = 5$ ) (open symbols) displayed mount, intromission, and ejaculation behavior throughout the observation period. Parasitized mice ( $n = 6$ ) (filled symbols) gradually ceased to show the components of sexual behavior, until wk 13 in which all behavioral responses disappeared. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ .

phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into 6 male mice by using a 25-gauge needle, and 3 subjects remained as controls. Male sexual behavior was evaluated both in screening and experimental tests under the same conditions. Testing was started 3 hr after the lights went off during the dark phase of the cycle under dim, red light. Mice were placed in piracetam cages ( $48 \times 36 \times 18$  cm) and, after a 3-min adaptation period, each subject was presented with a receptive female mouse. Stimulus females were injected subcutaneously with 3  $\mu$ g estradiol valerate 3 times per week, and 500  $\mu$ g progesterone 4 hr before testing. The number of mount and intromission responses, as well as the mount, intromission, and ejaculation latencies were measured and recorded as described elsewhere (McGill, 1962; Was et al., 1963). Intromission responses are distinguished from mounts by the display of a period of repeated, slow, deep pelvic thrusting during intravaginal penis insertion. Ejaculation responses are characterized by the presence of a period of deep pelvic thrusting directed toward the end of penis insertion, often followed by the male falling off the female to the side, and were confirmed by the presence of a seminal plug in the vagina. Mount and intromission latencies are defined as the time that elapses from the introduction of the stimulus female to the observation cage until the first mount or intromission response by the male. Ejaculation latency is the time elapsed from the first intromission response until ejaculation. The test was ended when the male presented the ejaculation response if no ejaculation occurred. Males that did not display mount, intromission, or ejaculation responses in a given test were assigned latency values of  $>30$  min (30.01 min for averaging purposes). A sexual behavior test was performed before infection (test 0). Testing continued thereafter at weekly intervals up to the 15th wk of infection.

To assess if changes in sexual behavior related more to testosterone (T) levels than to a general debilitation due to disease, T levels were antagonously removed in infected mice expecting to restore their sexual behavior. These experiments were performed in a different group of mice. Eighteen mice were tested for sexual behavior 8 wk after infection. Then they were assigned to 1 of 3 groups receiving either testosterone

propionate (TP, 100  $\mu$ g/day;  $n = 6$ ), dihydrotestosterone propionate (DHTP, 100  $\mu$ g/day;  $n = 6$ ), or 50  $\mu$ l of corn oil ( $n = 6$ ) for 7 days. After that period, they were tested again for sexual behavior as previously described. The TP and DHTP were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

At the end of the 15th wk of infection, 1 day after the last test of sexual behavior, blood for serum determination was collected *in vitro* by severally various punctures of mice under ether anesthesia. After incubation for 5 hr at room temperature and 10 hr at 4 C, the blood clot was removed and centrifuged at 1,000 rpm for 10 min. The serum removed and substituted in the buffer used for radioimmunoassay (RIA). Radioimmunoassay was performed using a radioimmunoassay system as described previously (Aguiar and Ramirez, 1969; Beyer-Espartero and Ramirez, 1969). The antisera were all supplied by ICH Biochemicals, Inc., Los Angeles, California. Estradiol antiserum cross-reacts 2.5% with estrone and 1.3% with 17 $\alpha$ -estradiol, and T antiserum cross-reacts 18.5% with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) and 3% with 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Treated female 1,2,4,6-tetrahydro-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ ,18,19-estradiol was supplied by New England Nuclear (Boston, Massachusetts). The RIA data were calculated by the log<sub>10</sub>-log regression method (Radford et al., 1969). After other standard curves and dilutions, all the cysts found inside the peritoneal cavity were collected after thorough rinsing with PBS and counted. The testes and uterine vesicles were removed and weighed wet.

The proportions of mice showing mount, intromission, and ejaculation behavior were compared between the parasitized and the control group, as well as among the oil-, TP-, and DHTP-treated mice, by means of the Fisher's exact test. Number of sexual responses per test, as well as the behavioral response latency, were compared between groups by an ANOVA for repeated observations. Organ weights and hormonal levels were compared between groups by the Student's *t*-test. Differences were considered significant where  $P < 0.05$  was reached.

## RESULTS

As shown in Figure 1, the percentages of parasitized male mice showing mount, intromission, and ejaculation responses declined as infection progressed. Thus, the differences between showing ejaculation differed between the experimental and control groups from 5 wk of infection onward; 6 wk after infection, none of the parasitized mice showed an ejaculation response. The number of parasitized mice that showed a diminishing intromission response differed significantly from that of the control group from 5 wk of infection to the end of the study, and at 8 wk the infected mice did not display intromissions. Mounting continued for a longer period, until wk 13, at which time parasitized animals ceased to exhibit any sexual behavioral response. All control mice continued showing the normal pattern of sexual behavior, including ejaculation, throughout the observation period.

Mount latency started to increase in the parasitized group at 5 wk compared to previous values and to the control group (Fig. 2), and the differences were significant on wk 6 onward. Intromission latency was also longer in the parasitized group from 5 up to 7 wk compared to previous values and to the control group. Thereafter, intromissions were no longer displayed. Ejaculation latency of infected mice retained similar values to those of control mice until the response ceased to be displayed. The number of mounts per test shown by the parasitized males (Fig. 3) was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) on wk 6 up to 12 and mounts totally disappeared by wk 13. Likewise, the number of intromission responses of this group decreased from wk 5 to 7 (Fig. 3) and by wk 8 intromissions were no longer displayed.

At 15 wk of infection, the mean  $\pm$  SD of the number of parasites recovered from the peritoneal cavity of parasitized

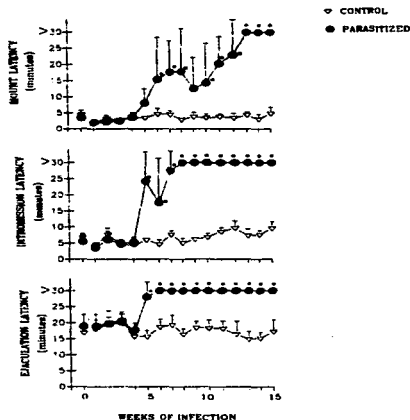


FIGURE 2. Mating, intromission, and ejaculation latencies shown by male mice during 15 wk of experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. All response latencies started to increase 5 wk after induction in the parasitized mice (filled symbols) compared both to previous values and to the control group (open symbols). Nonresponding males were assigned latency values of >30 min. Data represent the mean  $\pm$  SD of the latencies shown by 5 control or 6 parasitized mice in each week of infection. \* $P < 0.05$ .

mice was  $2,105 \pm 303$ . No parasites were found in control mice. In order to correlate the changes in sexual behavior with sex hormone levels, T and estradiol were measured in sera from control and parasitized mice after 15 wk of infection. The striking differences in serum steroid levels between controls and infected (15 wk) mice are shown in Table I; parasitism significantly increased the serum estradiol level in parasitized males (30 times) compared to control mice of the same age, whereas T levels were diminished by 95.3% at this time of infection. Testes weight decreased by 22% compared to control males of the same age, and weight of the seminal vesicles, a target organ for androgens, fell by 47% relative to controls (Table I). The sexual behavior of 8-wk-parasitized mice that later received oil, TP, or DNTP is shown in Table II. The TP and to a lesser extent DNTP, fully restored the display of male sexual behavior in infected animals (Table II), whereas treatment with corn oil had no effect.

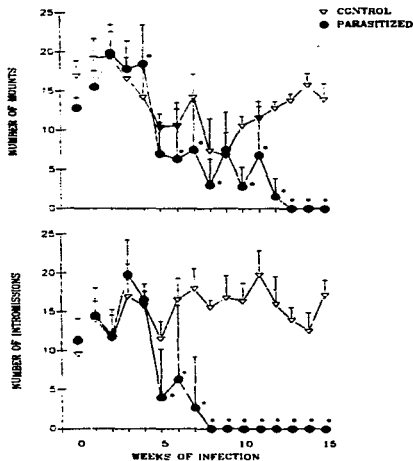


FIGURE 3. Mean numbers of mounts and intromissions per test displayed by male mice during 15 wk of experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. The number of mounts per test started to decrease in parasitized (filled symbols) compared to control (open symbols) mice from wk 6 onward. The mean number of intromissions per test declined from wk 5 onward in infected mice. Data represent the mean  $\pm$  SD of the values of 6 parasitized and 5 control mice in each week of infection. \* $P < 0.05$ .

#### DISCUSSION

*Taenia crassiceps* cysticercosis is known to trigger a feminization process in its male murine host. Parasitized males showed a gradual increase in serum estradiol levels, reaching in 16 wk, 200 times their normal values, whereas those of T decreased 90% relative to controls (Larralde et al., 1995). Present results confirm the endocrine changes found in that study in mice after 15 wk of infection and demonstrate that they are physiologically relevant to the host, being manifested as a progressive diminution in the sexual behavior of male mice as infection progresses. A close relationship was found between the inhibition of sexual behavior and the dynamics of the endocrine changes. Thus, there was a decrease in the sexual behavioral parameters of the parasitized mice that became more pronounced between

TABLE I. Effect of chronic infection with *Toxaria crassiceps cysticerci* on the level of sex steroids and on testes and seminal vesicles weight.<sup>1</sup>

	Control (n = 5)	Parasitized (n = 6)
Serum estradiol (pg/ml)	18.7 ± 2.7	939.8 ± 172.8†
Serum testosterone (pg/ml)	242.1 ± 132.5	11.4 ± 2.8
Seminal vesicles weight (mg)	38.8 ± 9.8	192.3 ± 17.0†
Testes weight (mg)	39.0 ± 38.6	221.6 ± 14.1†

<sup>1</sup> Data are presented as mean ± SD.

† P < 0.01; ‡ P < 0.05 compared to the control group, Student's t-test.

wk 4 and 8 of infection, a period in which the changes in serum estradiol and T levels also become more evident (Larrañaga et al., 1995).

The decline in sexual responsiveness is unlikely to result from debilitation caused by the parasite infection, because infected mice were similar to controls in relation to fur appearance and other signs of health, reactivity to stimuli, as well as food and water intake. Besides, they were as active in every way as the nonparasitized controls, showing a similar level of locomotor activity and exploring in the observation cage until wk 12, at which time they showed a slight decrease in general activity and intermale aggressive behavior. Infected mice used in other studies of our laboratories, and not sacrificed at 15 wk, showed a long life span, similar to that of control animals. In addition, the restoration of mounting, intromission, and ejaculatory behavior observed in infected mice treated with TP and to a lesser extent with DHTP strongly suggests that the inhibition of sexual behavior observed in infected mice was due to the decrease in the levels of T and not to a nonhormonal effect associated with the presence of parasites or illness.

The temporal course of the behavioral changes observed in the parasitized mice is similar to the decline of sexual behavior that has been described for this strain of mice following castration (McGill and Manning, 1976). The males of many mammals retain sexual responsiveness following castration to an extent that varies greatly between and within species. The basis of such variation is not well understood, but, for mice in particular, the genotype apparently exerts a prominent influence. Thus, McGill and Manning (1976) reported a more rapid decline in sexual activity of Balb/c mice after castration, as compared to other strains. In addition, hybrid males resulting from the cross between Balb/c males with females of other 2 inbred strains, DBA/2 and C57BL/6, also showed a rapid decline in their sexual behavior, displaying the ejaculatory response for only the first 3 wk after castration. Considering that the endocrine changes resulting from cysticercosis begin to be more evident between wk 4 and 8 of infection (Larrañaga et al., 1995), the absence of ejaculatory and intromission responses at 6 and 8 wk, respectively, in the present study may represent the direct effect of the decline in T level.

Few data exist in relation to the hormonal basis of the display of masculine sexual behavior. Furthermore, a wide variation among strains of mice has been reported. The relative effectiveness of T, DHT, androstenedione, and estradiol for maintaining or restoring the display of masculine sexual behavior in mice after castration varies among the strains. CD-1 and Balb/c male mice seem to be very dependent on T, whereas Swiss-

TABLE II. Percent of 8-wk-infected Balb/c male mice displaying sexual behavior before and after 1 wk of treatment with testosterone propionate (TP, 100 µg/day) or dihydrotestosterone propionate (DHTP, 100 µg/day) or corn oil (50 µl/day).<sup>1</sup>

	OH		TP		DHTP	
	Before	After	Before	After	Before	After
Mount	100.0	66.7	100.0	100.0	100.0	100.0
Intromission	0.0	0.0	0.0	83.3†	0.0	83.3†
Ejaculation	0.0	0.0	0.0	83.3†	0.0	33.3

<sup>1</sup> Data were obtained from groups of 6 animals per treatment.

† P < 0.01 compared to data obtained before treatment; Fisher's exact probability test.

Weibster mice respond in a similar fashion to T and DHT (Champain et al., 1963; Lutjens and Mall, 1973). Estrogen appears to be an important T metabolite related to the facilitation of male sexual behavior in different species (Beyer et al., 1976; Morali et al., 1977; Lutjens, 1979; Sodersten, 1979). This possibility has been explored in some strains of mice. In fact, castrated Swiss-Webster male mice display a high level of mounting behavior but no intromissions or ejaculations in response to estradiol benzoate (Edwards and Burge, 1971). Estradiol facilitates the display of intromission behavior in CD-1 castrates (Dafreirio et al., 1979; Wallis and Lutjens, 1979). Hybrid males of the BD2F<sub>2</sub> strain that ceased to copulate after castration display full sexual behavior including ejaculation when treated with estradiol benzoate (Wee et al., 1988). Thus, one would expect that the sexual behavior of parasitized mice were maintained by the high estradiol levels. However, there being strain variations, it is possible that Balb/c mice respond poorly to estradiol, as suggested by the inhibition of sexual behavior in the highly estrogenized parasitized mice.

Although the precise mechanisms by which cysticercosis affects the levels and activities of the host sex hormones and behavior are not yet known with precision, there is no question regarding the strong biochemical and behavioral impact of the parasite upon the host. We have suggested elsewhere (Larrañaga et al., 1995) that it could involve the activation of the aromatase responsible for estradiol synthesis from T by way of a high interleukin-6 response, as described for breast cancer cells (Reed et al., 1993), but more experiments are required to elucidate the precise mechanisms responsible of these changes.

Host feminization by cysticercosis and other parasites, e.g., *Schistosoma mansoni* (Immeroff et al., 1989), should not be regarded as biological curiosities but more as strong evidence of the plasticity of the sexual phenotype in response to infection by parasitic helminths. Furthermore, by changing the reproductive capacity of the host, parasites generate novel questions regarding the evolution of host-parasite relationships in ways other than the prey/predator interactions (Hart, 1994).

#### ACKNOWLEDGMENTS

Jorge Morales is recipient of a doctoral fellowship from CONACYT, México. This work was supported in part by grant 209393 of the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, and by grant 1276-N9204 of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. We are grateful to B. Eaders

(Behringwerke, Marburg Germany) for supplying *T. crassiceps* ORF strains. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript.

#### LITERATURE CITED

- ACQUERIA, G., AND M. C. ROSSIGNI. 1979. Influence of the thyroxin on serotonergic system in rat ovarian cells in vitro. *Journal of Endocrinology* 5: 367-373.
- ARMED, S. A., W. J. FERRALL, AND N. TALAL. 1965. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex action. *Advances in Immunology*, p. 131-151.
- ALEXANDER, J., AND W. H. STANSON. 1958. Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology Today* 4: 189-193.
- BAGGOT, G. C., S. G. MURPHY, H. H. REES, AND R. E. MCGILL. 1991. The effect of oestrogens on the microvillar production of Brugia pahangi and the control of mucous reabsorption in the cecum of *Drosophila imitator*. *Parasitology Research* 77: 65-71.
- BICKHAJ, N. E. 1991. How parasite hormonal relationships: A common thread? *Experimental Parasitology* 72: 332-339.
- BEVER, C., G. MORGAN, F. NAPOLI, K. LARSON, AND G. PARR-PALACIOS. 1976. Effect of some anemoregins and anemoregulin inhibitors on endocrine induced sexual behavior in castrated male rats. *Hormones and Behavior* 7: 353-363.
- BOJALLI, R., L. I. TRINIDAD, T. GOVINDARAY, E. SCUTTO, AND C. LARSON. 1993. Thyroxine-induced cellular immune dysfunction in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Parvulus crassiceps*). *Journal of Parasitology* 79: 471-476.
- BUNNY, D. A. F. 1961. Gender-dependent patterns of infection and disease. *Parasitology Today* 4: 184-193.
- CHAMPLIN, A. K., C. BLUMER, AND E. MCGILL. 1963. The effects of varying levels of testosterone on the sexual behavior of the male mouse. *Animal Behavior* 11: 244-245.
- CHAMPAGNE, L., G. L. SWANLEY, W. J. KALASH, AND I. A. STRAUSS. 1981. The effects of host sex on enteric response to infection with *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology* 67: 917-922.
- CULBERTS, K., G. W. ECKH, AND R. E. MANN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda) III. The relationship between larval biomass and the number and composition of C-tracter. *Experimental Parasitology* 28: 272-311.
- DALTON, S., A. BASTEN, AND R. BYRLEN. 1979. A simple injection of 17 $\beta$ -oestradiol in oestrogen treated rats in castrated male mice. *Hormones and Behavior* 13: 314-327.
- DEBON, C., AND M. E. COHEN. 1978. Effect of host sex on passive immunity in mice infected with *Neurospora debilis*. *International Journal for Parasitology* 8: 359-366.
- DOBBS, F. J., AND G. W. ECKH. 1969. Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology* 28: 193-196.
- EDWARDS, D. A., AND K. G. BURCH. 1971. Estrogenic stress of aggressive behavior and masculine sexual behavior in male and female mice. *Hormones and Behavior* 2: 239-245.
- FERRALL, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeller, 1809) (Euphyllo, 1810) (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 949-950.
- . 1964. Studies on responses of intracellular hosts to infection with *Taenia crassiceps* (Zeller, 1809) (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 42: 367-385.
- HART, B. L. 1994. Behavioral defense against parasite: Interaction with female sex. *Parasitology* 109: 819-831.
- INSOLFO, M., F. W. SULLIVAN, C. L. BURDETTE, P. L. JONES, W. G. FISHER, T. RYDQVIST, AND K. T. GARDNER. 1999. Schistosomiasis: Role of endogenous opioids in suppression of gonadal steroid secretion. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96A: 41-49.
- LARSON, C., J. MORALIS, I. TRINIDAD, T. GOVINDARAY, AND M. C. ROSSIGNI. 1993. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Neuroendocrinology and Molecular Biology* 23: 375-380.
- LIU, Y., C. Y. KANG, H. H. KONG, AND Y. GU. 1990. Effects of larval sex ratio (*Taenia leucostoma*) on reproductive function in male and female host rats. *Experimental Parasitology* 70: 344-352.
- LITTON, W. G. 1979. Endocrine control of mammalian sexual behavior: The potential role of testosterone neurohormones. *In Endocrine control of sexual behavior*, C. Byer (ed.), Raven Press, New York, New York, p. 341-363.
- . AND N. H. REES. 1973. Differential effectiveness of testosterone and its metabolites in the induction of male sexual behavior in two strains of albino mice. *Hormones and Behavior* 4: 31-43.
- MCGILL, T. E. 1962. Sexual behavior in three related strains of mice. *Behavior* 19: 341-350.
- . AND N. H. REES. 1976. Genotype and retention of the ejaculatory reflex in castrated male mice. *Animal Behavior* 24: 507-518.
- MORGAN, G., K. LARSON, AND C. BEVER. 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by anemoregulin. *Hormones and Behavior* 9: 203-213.
- PALLAS, W. J., AND E. R. G. CAMERON. 1978. Ecological observations on the commercial sand crab *Portunus pilosus* (L.) and its parasite, *Securinus grandis* Boshuisi, 1973 (Cirrropoda: Microsporida). *Journal of Fish Diseases* 1: 137-149.
- REES, N. H., L. TOFFNER, N. G. COLLEMAN, A. PUGHOT, M. W. CHAMBERS, AND V. M. T. JAMES. 1993. Control of gonadotropin activity in the castrated male rat: The role of cytochrome and growth factor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 46: 589-596.
- REYES-HERNANDEZ, J., AND M. ROSSIGNI. 1999. An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 66: 543-545.
- ROSSIGNI, D., W. BURBON, AND P. L. RAYBURN. 1969. Rapid calculation of testosterone radioactivity. *Laboratory of Clinical Medicine* 74: 79-70.
- SCUTTO, E., G. FRACORO, M. L. DEAR, F. VALERIE, C. LONGHI, T. GOVINDARAY, R. M. BERTUCCI, AND C. LARSON. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
- SWANLEY, K. J., W. ECKH, AND R. E. MANN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda) I. Autecology in the experimental ORF strain. *International Journal for Parasitology* 2: 281-283.
- SCHMIDTKE, P. 1979. Role of estrogen in the display and development of sexual behavior in male rats. *In Endocrine control of sexual behavior*, C. Byer (ed.), Raven Press, New York, New York, p. 303-311.
- TRINIDAD, L. I., R. BOJALLI, T. GOVINDARAY, AND C. LARSON. 1994. A role for 17 $\beta$ -oestradiol in immunomodulatory regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 68: 543-548.
- WALTON, C. J., AND G. LITTON. 1979. Relationship of male sexual behavior by combined treatment with oestrogen and dihydrotestosterone in CD-1 mice. *Journal of Endocrinology* 60: 257-262.
- WANG, B. E., D. WAGNER, AND L. G. CLAYTON. 1988. Hormonal persistence of masculine sexual behavior in long-term castrated (SDP1) mice. *Physiology and Behavior* 43: 77-82.



Date: Wed, 3 Sept 1997 18:14:41 -0100  
From: "Gerald W. Esch" <esch@wfu.edu>  
To: macer@servidor.unam.mx  
Subject: Manuscript Acceptance

[The following text is in the "iso-8859-1" character set]  
[Your display is set for the "US-ASCII" character set]  
[Some characters may be displayed incorrectly]

Dear Dr. Carbón,

Congratulations! This is a short note to let you know that your manuscript GE-1237 Moraes-Montor et al., Tissue damage and differential expression of P450-SCC, steroid 5 $\alpha$ -reductase type II and Aromatase in the male reproductive system during experimental murine *Toxaria crassiceps* cysticercosis has been accepted for publication in the Journal of Parasitology.

We have already send you the three comments reviews. By addressing the reviewers recommendations the paper will be substantively improved. I look forward to working with you

Sincerely yours,  
Vickie

---

Vickie Hennings, Assistant to the Editor  
Journal of Parasitology  
phone: (910) 759-6008  
fax: (910) 759-6008  
email: esch@wfu.edu

Help M Main Menu PPrevMsg -PrevPage D Delete R Reply  
O OTHER CMDS V ViewAtch N NextMsg Spc NextPage U Undelete F Forward

**RH: Damage in the male reproductive system during cysticercosis.**

**Testicular damage and differential expression of P-450 SCC, steroid 5 $\alpha$ -reductase type II and Aromatase in the male reproductive system during experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis.**

**J. Morales-Montor<sup>1</sup>, A. Gamboa-Domínguez<sup>2</sup>, M. Rodríguez-Dorantes and M. A. Cerbón<sup>2\*</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, AP 70228, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

\*Correspondence adress.

**ABSTRACT:** Chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci in male mice exhibit an increase in serum estradiol levels, whilst those of testosterone are strongly diminished; concomitantly, male mice loose their typical sexual behavior. This study was undertaken to determine the tissular damage in the reproductive system of male mice, and whether this alteration affects the normal steroidogenesis of the reproductive system. Histological analysis, and expression of steroidogenic enzymes were assessed by Northern blot technique in the reproductive tissues of the parasitized male mice. At 16 wk of infection, testes and seminal vesicles presented high inflammatory infiltrate. The tissue lesions observed included dilatation and peripheral fibrosis. The expression of 5 $\alpha$ -reductase in the tissues of the reproductive tract in male mice was diminished. In contrast, aromatase was expressed at a higher level in the testes of parasitized mice, and there were no changes in the mRNA content for P450c<sub>17</sub>. These findings suggest that the alteration specifically acts at the testosterone metabolism and not on all steroidogenic pathway. The overall results suggest that the feminization process produced by the chronic infection in the male mice, is because the male reproductive system is atrophied, presumably by the lack of testosterone and the high inflammatory response in the same.

In experimental acute murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962, 1964; Culbreth et al, 1972) there is a remarkable sex-associated susceptibility in all strains of mice studied, female mice being more susceptible than male as measured by parasite loads 30 days after infection (Doris and Esch, 1969; Sciutto et al, 1980). However, during chronic infection, this sex-associated susceptibility disappears and male mice presents a number of parasites similar to that of female mice. At the same time a feminization process occurs in the male mice, which is characterized by a 200 fold increase of serum estradiol level, 90% in testosterone level decrease, and a diminution of 50% in the seminal vesicles and testes weight (Larraide et al, 1995). Furthermore, during the infection process, male mice sequentially loose their normal sexual behavior pattern by losing ejaculation response, later the intromission response and finally, at 16 wk of infection, the mount response is also abolished (Morales et al, 1986).

Reciprocal endocrinological interactions between hosts and parasites have been recognized as enhance parasite success (Beckage, 1990). For instance, during chronic infection, *Taenia taeniarformis* is also known to alter reproduction in rats by decreasing plasma testosterone concentration (Lin et al, 1990). The reproduction of *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* is also modulated by a change in host ecdisteroids content (Barker et al, 1991). It has been reported that during acute infection with *Trypanosoma cruzi* in male mice, structural alterations of the vas deferens exists, and that the parasite is present

close to the lumen of epididymal duct (Carvalho et al, 1991). Furthermore, after acute infection the relative weight of the epididymis, vas deferens and seminal vesicles were significantly increased and rats were unable to reproduce (Carraro et al, 1992). Interestingly, during chronic infection with a Bolivian strain of *Trypanosoma cruzi* in Wistar male rats, a significant decrease was observed in the absolute weight and in the fructose content of the seminal vesicle and ventral prostate of chagasic rats. A decrease in plasma testosterone levels was also reported (Tavares et al, 1994).

However, the precise molecular and physiological mechanisms by which parasites produce these steroid changes in their hosts have not been explored, although they could be related with changes in the expression of key enzymes in the gonadal steroidogenic pathway.

Cholesterol side-chain cleavage enzyme (SCC) is expressed in all steroidogenic tissues and catalyzes the first and rate limiting step in steroid hormone biosynthesis: the conversion of cholesterol to pregnenolone ( Rice et al, 1990). A large number of agents affect the levels of SCC mRNA in the different steroidogenic tissues, including products of the immune system such as  $\gamma$ -interferon (Orava et al, 1989).

Aromatase cytochrome P-450 (P450arom) is an enzyme required for the conversion of testosterone (T) to estradiol (E) in the ovary and testes of many mammalian. Its activity has been extensively studied, and it is well known that factors that increase aromatase activity include gonadotropins as follicle stimulating hormone (FSH) (Richards et al, 1987;), forskolin (Fitzpatrick and

Richards, 1991), 8-bromo cAMP (Price and O'Brien, 1993) and interleukin-6 (IL-6) (Reed et al. 1992; 1993). In the mammalian male this enzymatic activity is very low and the levels of estradiol are not detectable, presumably due to a preferential metabolism from T to dihydrotestosterone (DHT) by steroid 5 $\alpha$ -reductase type II isozyme (Romer, 1989).

Since during chronic infection of parasitized male mice there is an increase in estradiol levels and a decrease in testosterone, concomitant with an inhibition of the typical sexual behavior which correlates with sex steroid changes and parasite loads in the peritoneal cavity, the aim of this study was to investigate whether as a consequence of chronic infection, the reproductive organs of the male mice were damaged at macroscopic and microscopic levels, and to assess whether at the molecular level there were changes in steroidogenic key genes expression levels, which could explain the change in sex steroids concentrations observed during chronic experimental male murine *Taenia crassiceps* cysticercosis.

## MATERIALS AND METHODS

Male BALB/c inbred mice were bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations, starting with an original stock from Jackson Laboratories obtained in 1962. They were fed Purina Diet 5015 and water *ad libitum*.

The fast growing ORF strain of *Taenia crassiceps* (Smith et al., 1972), isolated by Freeman in 1962, was used for mice infection in all experiments. Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 months before. Ten non budding *Taenia crassiceps* larvae (approximately 2mm diameter) were suspended in 0.3 ml phosphate-buffered saline (PBS:0.15M NaCl, 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into each of 10 42-day-old male mice using a 0.25 gauge needle. Ten subjects of the same age, remained as non-parasitized controls. Mice were sacrificed by cervical dislocation after deep ether anesthesia at 16 wk of infection and all the cysts found inside the peritoneal cavity were collected after rinsing it with PBS and visually counted. Reproductive tissues were surgically extracted, and fixed in buffered formalin 10%, paraffin-embedded and cut in a microtome (4-6µm). All slides were stained with hematoxylin-eosin and observed in a 100x light microscope (Olympus Optical, Japan).

Total RNA was isolated from the testes, seminal vesicles, epididymis, prostate, and spleen of control and 16 wk parasitized males, together with the ovary of a female normal mice, using the single step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL.

NY, USA). In brief, each tissue was removed and immediately disrupted in TRIzol reagent (1 ml/ 0.1g tissue). 0.2ml of chloroform were added per ml of TRIzol. The aqueous phase was recovered after a 10 minutes centrifugation at 14000 x g. RNA was precipitated with isopropyl alcohol, washed with 75% ethanol and redissolved in RNase-free water. RNA concentration was determined by absorbance at 260nm. Aliquots of total RNA containing 20 µg from each tissue were denatured and electrophoresed in a 1.0% of formaldehyde-agarose gel as previously described (Sambrook et al, 1989). The integrity of the RNA was ascertained by UV visualization of the ethidium bromide-stained gels. The RNA in the gel was blotted overnight to a nylon membrane (Gene Screen plus, DUPONT, Boston) and was subsequently hybridized with specific probes of P-450<sub>acc</sub>, P-450<sub>aromatase</sub>, 5 $\alpha$ -reductase or cyclophylin. The probes were <sup>32</sup>P-labeled by the random-primer labeling system, (Gibco BRL, NY) according to manufacturer's indications. After hybridization to 42°C during 24 h membranes were washed twice with 2X SSC at room temperature for 30 min, followed by 0.1X SSC-0.1 % SDS at 55° C for 40 min. The membranes were then exposed to Kodak XAR-5 X-ray film (Eastman Kodak Co. Rochester, USA) for 48-72 h at -70°C. Hybridization signals were quantified by densitometric scanning of multiple autoradiograms of various exposure times, and were represented as the ratio of the signal of each studied gene relative to the cyclophylin gene expression which is a constitutive gene used as an internal control. All experiments were performed in triplicate, and the data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test of individual



differences between means. The Epistat statistics program (Epistat Services) was used for calculating probability values. Differences were considered significant when P values were  $<0.05$ .

## Results

The histologic changes observed in the testes and seminal vesicles of the parasitized male mice are shown in Figure 1. It is evident that chronic infection produced severe atrophy of the reproductive tract, presumably due to the high parasite load in the peritoneal cavity ( $2546 \pm 464$ ). Interestingly parasites were never found outside the peritoneal cavity.

Figure 2 shows the histologic structure of the reproductive organs of parasitized and control male mice. The tissue damage produced by chronic infection is observed. In the normal mice, the testes show thin tunica albuginea and the seminiferous tubules depict normal maturation of the germinal epithelium (A). In parasitized mice, albuginea is thicker due to fibrosis and chronic inflammatory infiltrate. Tubules are larger and show minimal spermatogenesis (B). In C (control mice) the seminal vesicles present a thin fibromuscular layer that surrounds the papillary projections of the epithelium. The vesicular lumen is filled with a homogeneous eosinophilic material. Figure 2 D (seminal vesicles of parasitized mice) shows abundant chronic inflammatory infiltrate with fibrinoid deposits in the stroma and the loss of the honeycomb structure is observed. The presence of eosinophilic intravesicular material is present, which is granular and fragmented. In E is shown a section of prostate, epididymis and deferent ducts of control mice. The glands and luminal structures of prostate and epididymis are surrounded by a thin fibrous capsule. In contrast, the parasitized animals ( F ) show abundant inflammatory infiltrate, fibrosis and focal necrosis in the stroma. Glands and tubular structures are dilated and filled with germ cells debris.

Tissue damage observed in the different tissues studied was quantified and represented in the Tables I, II and III. The major alteration presented in the parasitized male mice was a severe inflammatory infiltrate and ischemic necrosis in the organs above mentioned. The most affected structures were the testes (Table I), which presented a marked diminution in spermiogenesis, and peritesticular inflammation. In table II, the principal alterations in the seminal vesicles of the parasitized male mice were recorded. The damage was from a simple dilatation to peripheral fibrosis. The prostate was the less affected of the reproductive tissues analyzed, it only show inflammation.

In order to detect whether any alteration were present in the steroidogenic metabolism at the molecular level, P-450-aromatase expression level was assessed by Northern blot in control and parasitized animals. A representative result is depicted in figure 3 (upper panel). The expression level of the constitutive gene cyclophylin (Cph) was constant in all examined tissues (lower panel) (Figure 3a). The densitometric analysis of the autoradiogram showed that the testes of parasitized males presented an 8-fold increase in mRNA content for P-450 aromatase ( $P < 0.01$ ) as compared with control testes. The expression level of P-450 aromatase in the testes of the parasitized male mice was 1.5-fold higher ( $P < 0.01$ ), than that in the ovary of normal female animals. In contrast, there was no detectable expression of aromatase in the muscle of the normal male mice (Figure 3b). Figure 3c depicts the analysis of the RNA sample used for the Northern blot analysis by denaturing agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, and shows that the RNA was intact and present the

same amount in all samples. In contrast, Northern blot analysis of  $5\alpha$ -reductase expression level shows a clear diminution in RNA content for this enzyme in the reproductive tissues from 16-wk-parasitized males (lanes 4, 6, 8 and 10), compared with non-parasitized males (lanes 3, 5, 7 and 9). In the epididymis of the parasitized male mice, no diminution in the mRNA content for this enzyme was observed as compared with the epididymis from control male mice. In contrast to the testes, seminal vesicles and prostate presented a clear diminution in gene expression for this enzyme in the parasitized animals, compared to that of control mice (Figure 4a). The relative expression level was plotted in Figure 4b. A marked diminution of approximately 75% was observed in the total expression level of  $5\alpha$ -reductase type II in parasitized male compared with control male mice. In figure 4c the integrity of the RNA used for the Northern blot analysis is shown. No degradation and the same amount of total RNA for all samples was observed.

In order to establish whether the alterations observed in the steroidogenesis of the parasitized male mice only affected the aromatase and reductase enzymatic systems, or was a general phenomenon, we decided to measure the P450<sub>c17</sub> expression level. This is the initial enzyme in the steroidogenic process. Figure 5a shows a representative Northern blot for  $5\alpha$ C mRNA detection. It is clear that, in all the tissues analyzed, chronically parasitized male mice and control mice display the same mRNA content for this enzyme. At the same time, the expression of cyclophilin used as a constitutive gene control did not change. However, it is clear too, that there is a differential

expression of the enzyme depending of the analyzed tissue (Figure 5b). Figure 5c depicts the integrity of RNA used for this study. All samples contained the same amount of undegraded RNA.

## DISCUSSION

We have previously shown that intraperitoneal infection with *Taenia crassiceps* cysticerci triggers a feminization process in the male host. This process is characterized by a 200 fold increase of serum estradiol, while testosterone decreases by 90%. Besides, seminal vesicles and testes present a reduction of 50% in wet weight (Larraide et al, 1995), and the chronically parasitized male mice loose their typical sexual behavior (Morales et al, 1995). All these disturbances have been related with the low testosterone levels, because the sexual behavior is totally restored by testosterone or dihydrotestosterone replacement into parasitized male mice (Morales et al, 1995). Furthermore, other experiments have demonstrated that estradiol positively regulates parasite number in the host, either feminine or masculine, presumably, by interfering with the thymus-dependant cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth (TH1) and enhancing those that facilitate (TH2) this process (Terrazas et al, 1997).

Our present results show that not only the lack of normal hormonal supply to the reproductive system, but also the high immune infiltrate found in all the reproductive tissues produce the damage. These results are in agreement with those of Tavares et al, 1994, who found that in chronic Chagasic male Wistar rats, the plasma testosterone concentrations are significantly reduced, as well as the seminal vesicle and prostate weight. At the same time, there is inflammation of these organs. Furthermore, Lyn et al, 1991, described that testosterone levels are decreased in male rats parasitized with

*Taenias taeniiformis* larvae. However, in the reports above mentioned, the authors did not analyze the estradiol levels and they attributed the low testosterone serum levels to an alteration in the hepatic function.

Which mechanisms induces or uses the cysticerci to drive the hormonal environment of the host that are restrictive for its establishment (testosterone) to some molecules permissive (estradiol) for his growth?. A simple strategy of the cysticerci to modulate the metabolism of sexual steroids could involve the stimulation of aromatase activity, the key enzyme in conversion of testosterone to estradiol. The results obtained in this study suggest the participation of P-450arom in this feminization process since we found a elevated level of aromatase expression in the testes of the 16-wk parasitized male mice. In contrast, the observed decrease in 5 $\alpha$ -reductase expression level probably is a consequence of the low testosterone level, since the production of this enzyme is down-regulated by the substrate (Romerts , 1999). Moreover, the fact that SCC expression was not altered in all the tissues examined of the parasitized male mice, suggests that the activation of aromatase may be a key factor in the feminization process above mentioned, and is not due to a general disfunction in gonadal steroidogenesis.

One of the main questions during the feminization process induced by *Taenia crassiceps* is the mechanism by which aromatase is activated in the testes of parasitized male mice. An important factor associated to aromatase activation is interleukin-6, a multifunctional cytokine involved in various endocrine pathways, apart from its role in immunological processes during

parasitic infections. For instance, it is well known that in ovarian cancer cells and in breast cancer cells, IL-6 regulates aromatase activity. (Reed et al, 1992, 1993; Spangelo et al, 1989; Gorospe et al, 1992; Yamaguchi et al, 1990) and augments estradiol production, which in turn, maintain cellular growth and reproduction. In addition, IL-6 is produced by many endocrine cells and tissues (Spangelo et al, 1990a; 1990b). We had previously shown, that serum level of this cytokine is markedly increased in chronically parasitized male mice with *Taenia crassiceps* cysticerci (Larraide et al, 1995). This high cytokine level could be associated to the increase in aromatase activity reported in this study. Further studies are required to determine whether IL-6 is the key factor, or whether other biological factors from the parasite or the host induce feminization process during experimental male murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. Thus, the striking differences in susceptibility to cysticercosis between male and female mice may involve the joint action of the immune system and the gonads, both influenced by a parasite which changes the male hormonal milieu during chronic infection.

Host feminization by parasitic disease illustrates the plasticity of sexual phenotype in response to infections. This process could involve the immune system, and endangers the reproductive capacity of the host. This sets novel forms of affecting the evolution of both host and parasite other than the prey/predator interactions (Hart, 1994). Finally, the cunning hormonally based strategy employed by *Taenia crassiceps* to established an unseemly mass of



foreign tissue in an initially resistant male mouse may be of interest for consideration in other chronic massive host-parasite confrontations.

## LITERATURE CITED

- Barker, G. C., S.G. Mercers, H.H. Rees, AND R.E. Howells. 1981. The effect of ecdysteroids on the microfilarial production of *Brugia pahangi* and the control of meiotic reinitiation in the oocytes of *Dirofilaria immitis*. *Parasitology Research* 77: 65-71.
- Beckage, N.E. 1991. Host parasite hormonal relationships: A common theme? *Experimental Parasitology* 72: 332-338.
- Carraro, A. A., R. A. Lopes, R.D. Ribeiro, AND T.L. Lamano Carvalho. 1992. The male reproductive organs in the chronic phase of experimental Chagas' disease. *Angew Parasitology* 33: 3-9.
- Carvalho, T.L., R.D. Ribeiro, AND R.A. Lopes. 1991. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. *Experimental Pathology* 41: 203-214.
- Carvalho, T.L., A.A. Carraro, R.A. Lopes, AND R.D. Ribeiro. 1992. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. II. Morphometric study of the vas deferens in the chronic phase of the disease. *Experimental Toxicology and Pathology*, 44: 147-149.
- Dorais, F.J. AND G. W. Esch. 1969. Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology* 28: 395-398.

- Fitzpatrick S. AND J.S. Richards. 1991. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 129: 1452-1461.
- Folkerd E.J. AND V.H.T. James. 1983. Aromatization of steroids in peripheral tissue. *Journal of Steroid Biochemistry* 19: 667-690.
- Freeman R.S. 1982. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 60: 909-990.
- \_\_\_\_\_. 1984. Studies on responses of intermediate hosts to infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 62: 989-990.
- Gorospe C.W., F.M. Hughes, AND Spangelo B.L. 1992. Interleukin-6: Effects On and production by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*. 130: 1750-1752.
- Hart, B.L. 1984. Behavioral defense against parasites: Interaction with parasite invasiveness. *Parasitology* 100: S139-S151.
- Larraide C., J. Morales, L.I. Terrazas, T. Govezensky, AND M.C. Romano. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53: 575-580.
- Lin Y. C., Y. Kikihisha, H. Kono, AND Y. Gu. 1990. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniiformis*) on reproductive functions in male and female host rats. *Experimental Parasitology* 70: 344-352.

Morales J., C. Larralde, M. Arteaga, T. Govezensky, M.C. Romano, AND G. Morali. 1988. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Toxaria creosiceps* cysticerci. *Journal of Parasitology* 82: 689-693.

Nakai Y., J. Fukata, T. Tomimaga, Y. Nakai, S. Tamai, K. Mori, AND H. Imura. 1988. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochemical Biophysical Research Communication* 156: 1459-1463.

Orava, M., R. Voutilainen, AND R. Vihko. 1989. Interferon-gamma inhibits steroidogenesis and accumulation of mRNA of the steroidogenic enzymes P450<sub>scc</sub> and

Price M.T. AND S.N. O'Brien. 1993. Determination of estrogen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and cytochrome P450 aromatase mRNA levels in adipocytes and adipose stromal cells by competitive polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Endocrine Metabolism* 77: 1041-1045.

Reed M.J., L. Topping, N.G. Coldham, A. Purohit, M.W. Ghichik, AND V.H.T. James. 1993. Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 44: 589-595.

Reed M.J., N.G. Coldham, S.R. Patel, M.W. Ghichik, AND V.H.T. James. 1992. Interleukin-1 and Interleukin-6 in breast cyst fluid: their role in regulating aromatase activity in breast cancer cells. *Journal of Endocrinology* 132: R5-R8.

- Rice, D.A., M. Sue Kiriman, L.D. Aitkens, A.R. Mouw, B. P. Schimers AND K.L. Parker. 1990. Analysis of the promoter region of the gene encoding mouse cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 265: 11713-11720.
- Richards J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: action and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews* 60 51-89.
- Richards J.S., G.J. Hickey, S. Chen, J.E. Shively, P.F. Hall, D. Gaddy-Kurten AND R. Kurten. 1987. Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Steroids* 68: 383-409.
- Romerts F.F.G. AND H.J. Van der Molen. 1989. Testicular Steroidogenesis. In *The Testis* ( Edited by H. Burger and D. de Krester) Raven Press, NY pp 303-327.
- Sembrook, J., E.F. Fritsch, AND T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual, Volume 2*, pp. 10.14-10.15, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sciuto E., G. Fragozo, M.L. Díaz, F. Valdez, C. Lomeli, T. Govezensky, R.M. Montoya, AND C. Larralde. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
- Simpson E.R., Cleland W.H. and Mendelson C.R. 1983. Aromatization of androgens by human adipose tissue *in vitro*. *Journal of Steroid Biochemistry* 19: 707-713.

- Smith, K.J., G. W. Esch, AND R.E. Kuhn. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda) I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology*. 2: 261-263.
- Spengelo B.L., A.M. Judd, P.C. Isakson, AND R. MacLeod. 1989. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormones release *in vitro*. *Endocrinology*. 126: 575-577.
- \_\_\_\_\_. R.M. MacLeod, AND P.C. Isakson. 1990a. Production of Interleukin-6 by anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology*. 126: 582-586.
- \_\_\_\_\_. A.M. Judd, R.M. MacLeod, D.W. Goodman, AND P.C. Isakson. 1990b. Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus. *Endocrinology*. 127: 1779-1785.
- Tavares, M.C., A.A. Carraro, A.L. Favaretto, S.O. Peterussi, R.A. Lopes, R.D. Ribeiro, AND T.L. Carvalho. 1984. The male organs in experimental Chagas' disease. III. Plasma testosterone and accessory sex glands in the acute phase of the disease. *Experimental Toxicology and Pathology*. 46: 243-246.
- Terrazas, L.I., R. Bojalil, T. Govezensky, AND C. Larraide. 1994. A role for 17 $\beta$ -estradiol in immunendocrine regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 80: 257-262.
- \_\_\_\_\_. J. Morales, R. Bojalil, T. Govezensky, AND C. Larraide. 1997. Shift from TH1 protective immune response to a TH2 late permissive during murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. Manuscript in revision.

Terahima, M., K. Toda, T. Kawamoto, I. Kuribayashi, Y. Ogawa, T. Maeda, AND Shizuta, Y. 1991. Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288: 231-237.

Yamaguchi M., N. Matsuzaki, K. Hirota, A. Miyake AND O. Tanizawa. 1990. Interleukin-6 possibly induced by Interleukin-1 $\beta$  in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinologica*. 122: 101-205.

**FALTA PAGINA**

**No. 23a la 25**



### **ACKNOWLEDGMENTS**

Jorge Morales is a recipient of a doctoral fellowship from CONACyT, México. This work was supported by grant IN207085 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M., México. We are grateful to Flora Itzel García-Formenti from CELE, U.N.A.M. for revising and correcting the English version of the manuscript, and Enrique Ortega and Claudia Hefel (Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M) for their help in the densitometric analysis. We are grateful to Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg Germany) for supplying *Taenia crassiceps* ORF strain.

## FOOTNOTES

<sup>2</sup>Departamento de Patología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), Vasco de Quiroga 15, Delegación Tlalpan, México D.F. 14000, México.

<sup>3</sup> Facultad de Química, Departamento de Biología, Laboratorio de Endocrinología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México D.F. 04510, México.

Main histological alterations in the testes of BALB/c mice chronically parasitized with *Taenia crassiceps*.

<i>Tissue Injury</i>	<i>Reduced Spermatogenesis</i>	<i>Posttesticular Fibrosis</i>	<i>Acute Inflammation</i>	<i>Chronic Inflammation</i>
Slight	62	61	67	37
Moderate	7	18	12	43
Severe	1	1	1	20

Table I.- Histological analysis was performed in slides of testes of 16-wk-infected mice after being fixed in 10% formaldehyde-PBS solution and stained with hematoxylin-eosine. Results are expressed as the percent of alterations recorded in 100 slides of 10 parasitized mice.

Main histological alterations recorded in the seminal vesicles from BALB/c mice chronically parasitized with *Taenia crassiceps* cysticerci.

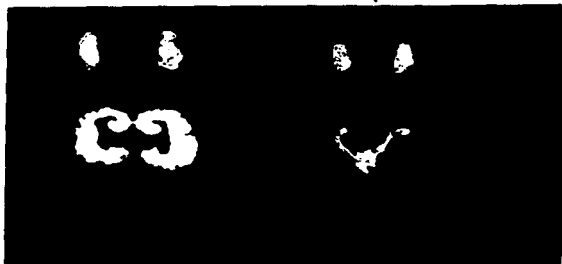
Tissue Injury	Dilatation	Atrophy	Acute Inflammation	Ischemic Necrosis	Epithelial Regeneration	Peripharal Fibrosis
Not affected	0	0	46	46	67	0
Slight	93	93	40	40	33	33
Moderate	7	7	0	14	0	67
Severe	0	0	14	0	0	0

Table II.- Histological analysis was performed in slides from seminal vesicles obtained from 16-wk-infected mice after being fixed in 10% formaldehyde-PBS solution and stained with hematoxyline-eosine. Results represent the percentage of alterations in 100 slides analyzed of 10 parasitized animals.

**Histological alterations of prostate from chronically parasitized mice with *Taenia crassiceps cysticerci*.**

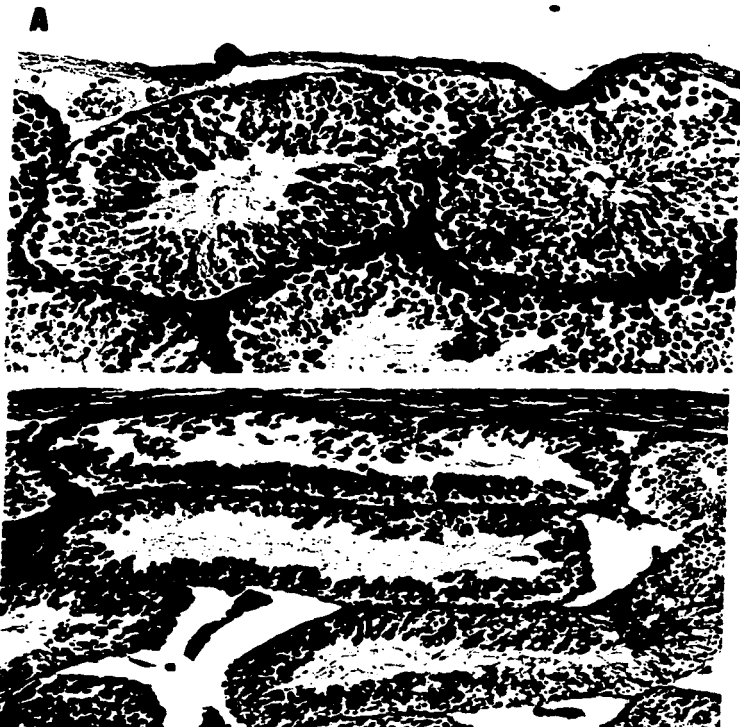
<b>Tissue Injury</b>	<b>Acute Inflammation</b>	<b>Chronic Inflammation</b>
<b>Not Affected</b>	<b>50</b>	<b>0</b>
<b>Slight</b>	<b>42</b>	<b>0</b>
<b>Moderate</b>	<b>8</b>	<b>42</b>
<b>Severe</b>	<b>0</b>	<b>58</b>

**Table III.** Histological analysis was performed in prostatic tissues fixed with 10% formaldehyde-PBS and stained with hematoxylin eosin. Results represent the percentage of alterations recorded in 100 slides of 10 affected animals.



**Figure 1.-** Macroscopic aspect of the reproductive system of a male mice chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci.

Representative aspect of the seminal vesicles, testes and epididymis surgically extracted from a 16 wk infected male mouse, which clearly shows atrophy. The picture is a representative case of 10 infected and 10 normal BALB/c mice.



**Figure 2.-** Microscopic slides of the entire reproductive tract of the male mice chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci.

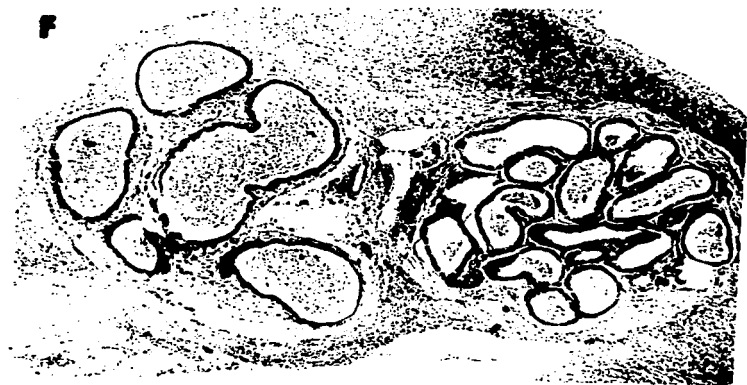
A) Section of testes of normal mice. B) Section of testes of parasitized mice. C) Section of seminal vesicles of a normal mice. D) Section of seminal vesicles of a parasitized mice. E) Section of prostate, epididymis and deferent ducts of normal mice. F) Section of prostate of parasitized mice.

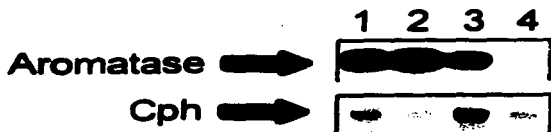
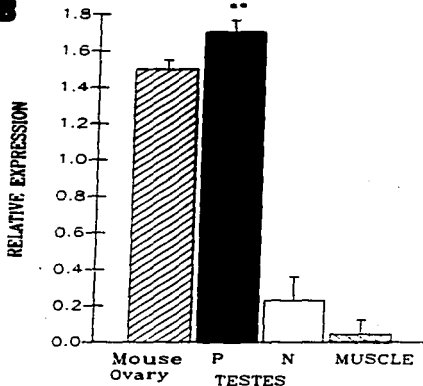
All the organs were surgically extracted and immediately fixed in 10% formalin and stained as described in Methods. The Figure shows a representative set of pictures of 30 slides of 10 normal and 30 slides of 10 infected analyzed male mice.

6



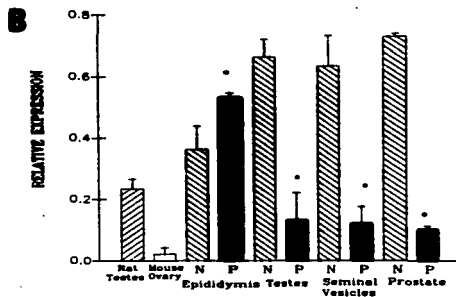




**A****B**

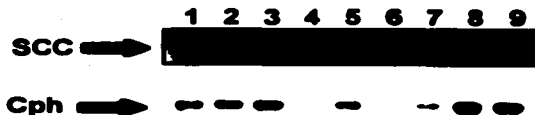
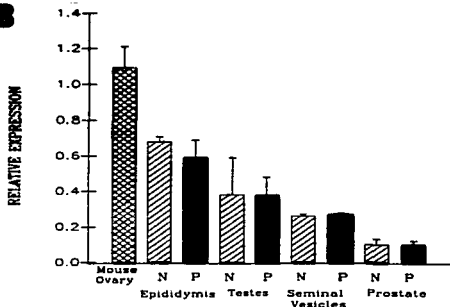
**Figure 3.- Increased mRNA content for *P-450* aromatase gene in the testes of parasitized male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci.**

(a) A representative Northern blot as described in Materials and Methods from various tissues of normal and parasitized mice. Lane 1 Ovary from a normal female mice, Lane 2 Parasitized testes, Lane 3 Normal testes and Lane 4 Muscle from a male normal mice, used as a negative expression control. Data represents pools of 5 mice, and each experiment was made in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data obtained from the autoradiogram signal. The relative expression was obtained by dividing the expression of the studied gene by that of cyclophilin (Cph), used as a constitutively expressed gene, in order to obtain the relative expression. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$ .

**A**

**Figure 4.-** Steroid 5 $\alpha$ -reductase type II gene expression is abolished in the male mice during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci.

(a) A representative Northern blot prepared from total RNA as described in Materials and Methods from reproductive tissues. Lane 1 Rat Prostate, Lane 2 Mouse Ovary, Lane 3 Normal Epididymis, Lane 4 Parasitized Epididymis, Lane 5 Normal Testes, Lane 6 Parasitized Testes, Lane 7 Normal Seminal vesicles, Lane 8 Parasitized Seminal vesicles, Lane 9 Normal Prostate, Lane 10 Parasitized Prostate. Data represents pools of 5 mice, and each experiment was made by triplicate. (b) results of gene expression are reported as densitometric data obtained from the autoradiogram signal. The relative expression was obtained in the same way as for aromatase. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \*P < 0.01.

**A****B**

**Figure 5.** SCC mRNA content in the reproductive system of the male mice during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci.

(a) A representative Northern blot prepared from total RNA from reproductive tissues as described in Materials and Methods. Lane 1 Ovary from normal mouse, Lane 2 Normal Testes, Lane 3 Parasitized Testes, Lane 4 Normal Epididymis, Lane 5 Parasitized Epididymis, Lane 6 Normal Seminal vesicles, Lane 7 Parasitized Seminal vesicles, Lane 8 Normal Prostate and Lane 9 Parasitized Prostate. Data represent pools of 5 mice, and each experiment was made in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data obtained from the autoradiogram signal. Relative expression was obtained in the same way that for aromatase and reductase. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$ .

**IX. ARTÍCULOS ENVIADOS A PUBLICAR**

**Differential expression of the estrogen-regulated proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* and *bcl-2* and the tumor suppressor *p53* gene in the male mouse chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci.**

J. Morales-Montor<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Dorantes<sup>2</sup>, C.A. Mendoza-Rodríguez<sup>2</sup> and M.A. Carbón<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, AP 70228.

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

**Running title:** Proto-oncogene expression in murine cysticercosis.

**Correspondence address**

M.A. Carbón, M.D., PhD.  
Telephone: (525) 6 22 30 98  
Fax Number: (525) 6 22 20 10  
e-mail: macer@servidor.unam.mx

**ABSTRACT:** Estradiol regulates the expression of various genes involved in important normal cellular processes. Chronic infection with *Teenia crassiceps* cysticerci, produces a marked increase in serum estradiol levels in male mice. In this study, we investigated whether in the male mice infected with *Teenia crassiceps* cysticerci exists an alteration in the expression pattern of estradiol-regulated genes, *c-fos*, *c-jun*, and in the content of *bcl-2* and *p53*, two genes that participate in the apoptotic process. In the infected male, *c-fos* mRNA content was increased in testes, spleen and thymus, whereas *c-jun* was only increased in the thymus. In contrast, *p53* mRNA content was markedly reduced, whilst the expression of *bcl-2* was totally abolished in the thymus. The thymic cell analysis, showed a diminution in the content of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations in the parasitized male mice. The changes in the normal hormonal milieu of the host, could induce an increase in the rate of apoptosis in the thymus. Furthermore, exists a tissue-specific regulation in the expression of these genes in the chronically infected male mice.

## INTRODUCTION

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* (Freeman et al, 1962, 1964; Culbreth et al, 1972) has been well established as a source of cross-reacting antigens useful in immunodiagnosis of human cestode diseases (Gottstein et al, 1986; Schantz, 1988; Larraide et al, 1990) as well as a practical model for testing vaccines against porcine *Taenia solium* cysticercosis (Veldéz et al, 1994). It is also a manageable experimental system to explore the role of biological factors involved in host susceptibility (Larraide et al, 1995; Morales et al, 1996).

During experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis, there is a remarkable sex-associated susceptibility in all strains of mice studied, being female mice more susceptible than males as measured by parasite loads 30 days after infection (Dorais and Esch, 1989; Sciutto et al, 1991). However, during chronic infection, this difference in sex-associated susceptibility disappears, and the male mice present similar number of parasites as the female mice (Sciutto et al, 1991; Larraide et al, 1995). At the same time, a feminization process occurs in the male mice, which is characterized by an increase in serum estradiol levels to 200 fold their normal values, on the contrary those of testosterone are 90% decreased. In addition, a diminution of 50% in seminal vesicles and testes weight has been detected (Larraide et al, 1995). Furthermore, during infection process, male mice sequentially loose their normal sexual behavior pattern, by loosing ejaculation response, later the intromission response and finally, at 16wk of infection, the mount response is also abolished.



All these sexual behavior is completely restored after testosterone or dihydrotestosterone restitution of the parasitized male mice (Morales et al. 1988). In addition, it has been demonstrated that estradiol positively regulates parasite growth in hosts of both sexes, presumably by interfering with the thymus-dependent cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth (TH<sub>1</sub>) and enhancing those that facilitating (TH<sub>2</sub>) this process ( Bojalil et al, 1983; Terrazas et al, 1994). All reproductive and immunological disturbances previously described in male parasitized animals have been related to the high estradiol and low testosterone levels detected in these animals (Larraide et al, 1995; Morales et al 1996).

In mammals estradiol participate in a large number of physiological processes such as sexual behavior ( Edwards and Burge, 1971), reproduction (Marcus, 1974) and development (Kaye et al, 1972). Estradiol regulates these processes inducing DNA replication, cellular proliferation and growth, through changes in the expression of several proto-oncogens such as *c-fos*; (Loose-Mitchel, 1988, Bigsby et al, 1994 ) and a variety of genes from *jun* families (Ransone and Verma, 1991; Nephew et al. 1993) The expression of these proto-oncogenes is regulated by other hormones, serum proteins and the tumor suppressor p53 protein (Ginsberg et al, 1991).

Several studies indicate that p53 induces apoptosis in different normal tissues (Clarke et al, 1993; Caelles et al, 1994), however, transcriptional regulation by steroid hormones in apoptosis and in other physiological conditions has not been completely elucidated.

The *bcl-2* proto-oncogene is a unique oncogene which expression results in prolonging cells viability, independent of promoting cell division, by overriding programmed cell death mechanisms ( Mc. Donell et al, 1989 ).

Hormonal changes observed in the parasitized male mice may affect several physiological processes of the host, besides the immunological function.

This study was performed to evaluate *c-fos* and *c-jun*, two estrogen regulated genes, and *p53* and *bcl-2* gene expression in testes, spleen and thymus, in the male mouse, which are the mainly affected tissues during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and experimental infections**

Male BALB/c inbred mice were bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations, starting with the original stock from Jackson Laboratories obtained in 1982. They were fed Purina Diet 5015 and water *ad libitum*. The fast growing ORF strain of *Taenia crassiceps* (Smith et al, 1972) isolated by R. Freeman in 1962, was used for mice infection in all experiments and was supplied by Dr. B. Enders in 1986 (Behringwerke, Margburg Germany). Since then, the parasites have been maintained in female BALB/c mice by intraperitoneal sequential inoculation of metacystodes in their peritoneal cavity. Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 months before. Ten non-budding *T. crassiceps* larvae (approx 2mm diameter) were suspended in 0.3 ml PBS (0.15M NaCl, 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into each 42 day-old male mouse using a 0.25 gauge needle. Mice were sacrificed by cervical dislocation after deep ether anesthesia at 16 wk of infection, and parasites were collected of peritoneal cavity after thorough rinsing with PBS. Testes, spleen and thymus were removed and weighed wet.

### **Hormone Measurements**

Blood for steroids determination was collected *in vivo* by retrocular venous puncture of mice under ether anesthesia. After incubation for 5 h at room temperature and 18 h at 4°C, the blood clot was centrifugated and serum was obtained. Steroids were ether extracted and solubilized in the buffer used for

radioimmunoassay (RIA). Estradiol and Testosterone concentrations were determined by RIA as previously described (Larraide, et al 1995; Morales et al, 1996). RIA data were calculated by the logit-log regression analysis (Rodbard et al, 1969).

#### **Total RNA extraction and Northern Blot Analysis**

Total RNA was isolated from the testes, thymus and spleen of normal and 16 wk parasitized males with the single step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRizol reagent (Gibco-BRL, NY, USA). In brief, each tissue was removed and immediately disrupted in TRizol reagent (1 ml/ 0.1g tissue). 0.2ml of chloroform were added per ml of TRizol. The aqueous phase was recovered after a 10 minute centrifugation at 14000 x g. RNA was precipitated with isopropyl alcohol, washed with 75% ethanol and redissolved in RNase-free water. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its purity and integrity was verified after electrophoresis on 1.0% denaturing agarose gel in the presence of 2.2 M formaldehyde. Aliquots of total RNA containing 20 µg from each tissue were denatured and electrophoresed on a 1.0% of formaldehyde-agarose gel as previously described. RNA integrity was ascertained by UV visualization of the ethidium bromide-satined gels, and was blotted overnight to nylon membranes. (Gene Screen plus, DUPONT, Boston) Then, RNA was subsequently hybridized with <sup>32</sup>P-labeled specific cDNA fragments for *c-fos*, *c-jun*, *p-53*, *bcl-2* or cyclophilin prepared by a random-primer labeling system (Gibco BRL, NY) according to manufacturers instructions. Hybridization membranes were washed

twice with 2X SSC at room temperature for 30 min, followed by 0.1X SSC-0.1 % SDS at 50° C for 30 min. The membranes were then exposed to Kodak XAR-5 X-ray film ( Eastman Kodak Co. Rochester) for 24-48 h at -70°C. The autoradiographies were analyzed by densitometry.

#### **Densitometric Analysis**

Hybridization signals were quantified by densitometric scanning of multiple autoradiograms of various exposures, and were expressed as the ratio of the signal of each studied gene relative to the expression of cyclophlyin gene, a constitutive gene used as an internal control.

#### **Analysis of thymic and spleen cell subpopulations**

The proportions of various cell subpopulations in the thymus and spleen of normal and infected mice were determined by indirect immunofluorescence and flow cytometry. Spleen and thymus were surgically extracted in sterile conditions and the cells were obtained by perfusion of each organ, washed and stained in HBSS supplemented with 1% BSA and 0.1% sodium azide. Cells were preincubated with rat mAb 2.4G2 directed against murine FcR to block FcR binding. Cells were incubated with the indicated mAb (0.01 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells) for 30 min at 4°C and washed twice. For indirect labelling, cells were subsequently incubated with FITC-labeled second antibody for an additional 2 h period at 4°C. Relative fluorescence intensities were measured by using FACScan (Beckton Dickinson, San Jose, CA).

### **Statistical Analysis**

All experiments were performed in triplicate, and the data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test of individual differences between means. The Epistats statistics program was used for calculating probability values.

## RESULTS

At 16-wk of infection, the number of parasites found in peritoneal cavity was of  $2450 \pm 321$ . We never found parasites outside of peritoneal cavity.

After this time of infection, testes, spleen and thymus were surgically extracted from normal and parasitized male mice. The wet weight of testes was markedly decreased (50%) in the parasitized animals, however, the weight of thymus and spleen, was 3-fold increased in parasitized males compared to control mice. Serum estradiol level was augmented 150 times, whereas testosterone level was decreased 80% (Table II).

*c-fos* expression the organs mentioned above was assessed by Northern blot. As shown in Figure 1a, at 16 wk of infection there was a clear increase in mRNA content in testes (lane 2), spleen (lane 4) and thymus (lane 6) of parasitized mice compared to control animals (lanes 1,3 and 5). The increase in *c-fos* expression level observed in each tissue was as follows: thymus 5.7-fold ( $p < 0.01$ ), testes 4.3-fold ( $p < 0.01$ ) and spleen 3.5-fold ( $p < 0.01$ ) in relation to *c-fos* expression in control mice tissues (Fig 1b).

*c-jun* expression was markedly increased in the thymus of these animals (lane 6), while in the spleen and testes of the parasitized animals (lane 2 and 4) there were no changes in *c-jun* mRNA content compared to control male mice (lanes 1 and 3) (Fig 2a). Densitometric analysis of Northern blot from figure 2a is depicted in Figure 2b. We can observe that *c-jun* mRNA content in the thymus of the parasitized animals was 5.4-fold increased ( $p < 0.05$ ). In contrast, in testes and spleen we did not find changes in *c-jun* expression in parasitized animals.

Our results show that at infection time point (16 wk), *p53* mRNA content was markedly reduced in all the tissues analyzed from the parasitized male mice (Figure 3, lanes 2, 4 and 6) as compared to normal mice (lanes 1, 3 and 5). The densitometric analysis of autoradiographic signals shows that thymus was the tissue with the major inhibition in *p53* expression (3.2-fold,  $p < 0.01$ ), while spleen has an inhibition of 2.3-fold ( $p < 0.01$ ) and testes 1.9-fold ( $p < 0.01$ ).

As depicted in Figure 4a, *bcl-2* expression was not changed in testes and spleen of 16 wk parasitized male mice (lanes 2 and 4), with respect to normal mice (lanes 1 and 3); however, in the thymus of parasitized animals, *bcl-2* expression was completely abolished (lane 6) with respect to normal thymus (lane 5). This diminution in *bcl-2* expression was 10.8-fold, ( $p < 0.01$ ) as observed in Figure 4b.

We analyzed the content of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the lymphoid tissues of normal and 16-wk parasitized mice. As can be seen in Figure 5, there was no change in the relative number of these cells between spleen of normal and parasitized animals. However, we observed a marked reduction in the relative number of these cells in the thymus of parasitized mice, as compared to normal ones (Figure 6).



## DISCUSSION

We have previously reported, that infection with *Taenia crassiceps* cysticerci triggers a feminization process in the male mice during infection progress, being male mice at 32-wk of infection markedly estrogenized, having estradiol levels similar to normal female mice in proestrus day (Larraide et al, 1995). In this study, we undertake our experiments at 16 wk of parasitization of male mice, because at this time of infection the animals are markedly estrogenized and the parasite loads become similar to those observed in parasitized female mice with the same infection time (Larraide et al, 1995). Furthermore, during this period of infection, male mice present the major molecular and structural changes in reproductive tissues (Morsales-Montor et al, submitted).

In these study we found that thymus weight augmented in animals which presented low testosterone levels. This result is similar to that observed during castration in other animal models, in which the lack of testosterone inhibits the normal regression of the thymus observed in adult animals (Chiodi, 1940; Rebar, 1971). Similarly, the weight of the spleen was augmented, presumably by the high levels of lymphocytes produced by the host against the parasite.

In addition, we assessed the expression of *c-fos* and *c-jun*, two highly regulated genes by estradiol in parasitized and normal male mice. We also assessed the expression of *p53* and *bcl-2* genes, wich have been reported as key molecules in the process of proliferation and programed cell death, and also could be regulated by estradiol ( Travers and Knowier, 1987; Hurd et al, 1995 ).

We have demonstrated that *c-fos* was overexpressed in testes, thymus, and spleen in parasitized animals; in contrast *c-jun* was only overexpressed in the thymus. Previous studies have indicated that  $17\beta$ -estradiol activates *c-jun* and *c-fos* gene transcription in rodents (Loose-Michael et al, 1988; Weizz and Breciani, 1988, Bigsby and Li, 1994). In this study, the highest relative *c-fos* expression in all the mice tissues analyzed, was similar to those observed in the tissues of other animal models after estradiol administration (Bigsby and Li, 1994, Méndozza-Rodríguez et al, 1997) and suggests that the high estradiol levels found in our experimental animals may participate in the overexpression of this gene during chronic infection. Recently, it has been demonstrated that the high expression of *c-fos* in mouse tissues is able to induce apoptosis (Preston et al, 1996).

However, since *c-jun* is only overexpressed in the thymus of the parasitized male mice, a differential tissue-specific regulation of the expression of this gene could exist, and suggest that other biological factors, besides of estradiol, are involved in *c-jun* expression in the thymus of parasitized male mice. Therefore, these proto-oncogenes may be directly involved in tissue-specific responses to estradiol action in the male mice. The functions of these proto-oncogenes are mediated via the formation of AP-1 complexes, which are constituted by heterodimers of c-Jun and c-Fos proteins, c-Jun homodimers and different homodimers and heterodimers of Jun and Fos proto-oncogene families. The fact that *c-jun* mRNA content does not change in spleen and testes suggests that c-Fos can either interact with other members of the Jun and Fos families to form

AP-1 complexes ( Savouret et al, 1994) or that low levels of *c-jun* expression are enough to produce AP-1 functional complexes ( Nephew et al, 1993 ).

Several studies indicate that *p53* induces apoptosis in different normal tissues. However, its regulation by steroid hormones (mainly estradiol) in apoptosis and in other physiological conditions has not been elucidated. In contrast with *c-fos* and *c-jun* mRNA content, we found that *p53* expression was markedly diminished. To our knowledge, this is one of the first evidences indicating that in an animal model which present high concentrations of estradiol, *p53* was diminished. This finding could suggest that during chronic infection *p53* expression is regulated by other factors of the host or parasite, and that apoptotic process could be mediated by others genes, such as *c-fos* or *c-myc* (Murphy et al, 1987).

The expression of genes that are required for ongoing cell proliferation, such as *c-fos*, are transcriptionally inhibited by *p53* in *in vitro* studies ( Ginsberg et al, 1991 ). This finding is on line with our observation that *c-fos* is overexpressed in concordance with the detection of *p53* low levels. The diminution in *p53* gene expression observed in tissues from parasitized mice suggests that other hormones and growth factors, apart from estradiol, are involved in *p53* regulation.

*bcl-2* proto-oncogene is a strong inhibitor of apoptosis, and since the initial profiles of *c-fos* and *c-jun* genes indicated possible induction of apoptosis in the thymus of the parasitized animals, we decided to determine *bcl-2* mRNA content . The diminished expression profile of this gene, as well as the decrease in

thymic cell subpopulation content, suggests that during chronic murine cysticercosis in male mice, exists an increase in the rate of thymic apoptosis which is bcl-2 permissive (Clarke et al, 1993), and benefits parasite establishment.

Apart from the effects that could be mediated by estradiol, other hormonal factors of the host that could participate are glucocorticoids. Since chronic infection is a stressful stimuli in the host, glucocorticoid levels could be altered in the parasitized animal. These hormones have been mainly implicated in the induction of apoptosis and immunosuppression in many diseases ( Alexander and Stimpson, 1988; Grossman et al, 1991) and in this infection could not be the exception. Additional investigation is required in order to clarify this point.

Finally, to our knowledge this is one of the first reports which explores changes in proto-oncogenes and anti-oncogenes during a chronic cestode infection. The overall results could indicate that there are many biological implications in the broad sense of reproduction, behavior and immunological aspects in the parasitized male host. The change in the expression of the studied genes in the thymus of the chronically infected male mice could be implicated in the maturation of specific thymic cells against parasite antigens, and this in turn, may affect the T-cell response, which is the main immune response involved in parasite elimination (Bojalil et al, 1993; Terrazas et al, 1994; Clarke et al, 1993).

## REFERENCES

- Alexander, J., and Stimson, W.H. (1988). Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitol. Today*, 4: 189-193.
- Bigsby RM and Li A. (1994). Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endo.* 134:1820-1826.
- Bojalil, R., Terrazas, L.I., Govezensky, T., Sciutto, E., and Larralde, C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 78:471-476.
- Caelles C, Helmberg A and Karin M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370: 220-223.
- Cicatiello L, Ambrosino C, Coletta B, Scalona M, Sica V, Bresciani F and Weisz A. (1992). Transcriptional activation of *jun* and *actin* genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 4: 523-526.
- Clark BF. 1971. The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *Journal of Endo.* 50:527-528.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML and Wylie AH. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362:849-852.
- Cubrath, K.L., G.W. Esch, and R.E. Kuhn. (1972). Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of C-leucine. *Exp. Parasitol.* 25:395-398.

- Dorais, F.J. and Gerald W. Esch. (1969). Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* 25:395-398.
- Edwards, D.A. and Burge. K.G. (1971). Estrogenic arousal of aggressive behavior and masculine sexual behavior in male and female mice. *Horm. Behav.* 2:239-245.
- Freeman, R.S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian J. Zool.* 40:969-990.
- Freeman, R.S. (1964). Studies on responses intermediate hosts to infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (Cestoda). *Canadian J. Zool.* 42:367-385.
- Ginsberg D, Mechts F, Yaniv M and Oren M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *PNAS, USA* 88:9979-9983.
- Grossman, C.J., Roselle, G.A., and Mandenhall, C.L.J. (1991). Sex steroids regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40: 619-637.
- Haendler B, Hofer-Warbinek R and Hofer E. (1987). Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO Journal* 6:947-950.
- Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S and Moudgil VK. (1995). Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 270:28507-28510.
- Hyder SM, Cram LF and Loose-Mitchell DS. (1991). Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine *c-fos* proto-oncogene which contains an estrogen-response element. *Gene* 105:281-282.

- Kaye AM, Sheratzky D and Linder HR. (1972). Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochem. Biophys. Acta.* 261:475-486.
- Larraide C., Morales J., Terrazas I., Govezensky T. and Romano M.C. (1995). Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52:575-580.
- Loose-Mitchell DS, Chiappetta C and Stancel GM. (1988). Estrogen regulation of *c-fos* messenger ribonucleic acid. *Mol. Endo.* 2:946-951.
- Mercus G.J. 1974. Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 10:447-452.
- Mc. Donell, T.J. Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKeern, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1989). *bcl-2* immunoglobulin transgenic mice demonstrate extend B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57: 79-88.
- Méndez-Rodríguez, C.A., Camecho-Arroyo, I., Domínguez, R., Pasapera, A.M., Cruz, M.E., Quintero, A., and Cerbón, M.A. (1997). *p53*, *c-fos* and *c-jun* gene regulation by oestradiol and during the oestrous cycle in the rat uterus. *Steroids*. Manuscript in revision.
- Morales J., Larraide C., Arteaga M., Govezensky T., Romano M.C and Morali G. (1995). Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82:689-693.
- Morales-Montor, J., Gamboa-Domínguez, A., Rodríguez-Dorantes, M., and M. A. Cerbón. (1997). Tissular damage and differential expression of P-450 SCC,

steroid 5 $\alpha$ -reductase type II and Aromatase in the male reproductive system during experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Parasitol.* Manuscript in revision.

Murphy LJ, Murphy LC and Friesen HG. (1987). Estrogen induction of *N-myc* and *c-myc* proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endo.* 120:1882-1888.

Nephew KP, Webb DK, Akcali KC, Moulton BC and Khan SA. (1993). Hormonal regulation and expression of the *jun-D* proto-oncogene in specific cell types of the rat uterus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46:281-287.

Preston G.A., Lyon T.T., and Ying Y. (1996). Induction of Apoptosis by c-fos protein *Mol. Cell Biol.* 16:211-218

Ransone LJ and Verma IM . (1990). Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Ann Rev Cell Biol* 6:539-557.

Rodbard, D., Bridson, W., and Rayford, P.L. (1969). Rapid calculation of radioimmunoassay results. *Lab. Clin. Med.* 74:770-772.

Savouret JF, Rauch M, Redeuilh G, Sar S, Chauchereau A, Woodruff K, Parker MG and Migrom E. (1994). Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J. Biol. Chem.* 269:28955-28962.

Sciutto E., Fragoso G., Díaz M.L., Váidez F., Lomelí C., Govezensky T., Montoya R.M. and Larralde C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77:243-246.



Smith, K.J., G.W. Etch, and R.E. Kuhn. (1972). Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestode) I. Aneuploidy in the anomalous ORF strains. *Int. J. Parasitol.* 2:261-263.

Terrazas, L.I., R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larraalde. (1994). A role for 17 $\beta$ -oestradiol in immunendocrine regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 80:563-568.

Terrazas, L.I., Bojalil, R., Morales, J., Govezensky, T., and Larraalde, C. (1997). Shift from an early protective TH1 immune response to a late permissive TH2 response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* In press.

Travers MT and Knowler JT (1987). Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus. *FEBS Letters* 211:27-30.

Truss M and Beato M (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endo. Rev.* 14:459-479.

Weisz A and Bresciani F. (1988). Estrogen induces expression of *c-fos* and *c-myc* protooncogenes in rat uterus. *Mol. Endo.* 2:816-824.

Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M and Bresciani F. (1990). Estrogen stimulates transcription of *c-jun* protooncogene. *Mol. Endo.* 4:1041-1050.

**FALTA PAGINA**

**No. 20 a la 22**

**Table 1.-** Nucleotide sequences of the primers used for cDNA probes synthesis.

The primers set flanked the rat *c-fos* cDNA (Curran et al, 1987) sequence from +258 to +505, the rat *p53* cDNA sequence from +718 to +1107 (Soussi et al, 1988), the human cyclophylin cDNA from +51 to +622 (Haendler et al, 1987), and mouse *bcl-2* cDNA from +8 to +230 considering the start site of transcription as nucleotide number 1 (Kitabayashi et al, 1990)..

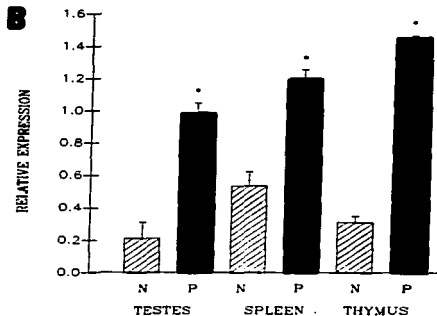
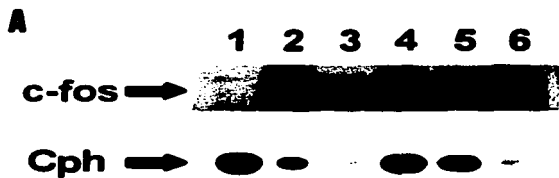
	<b>Sense Primer</b>	<b>Antisense primer</b>
<i>c-fos</i>	5'-CCCCTGTCAACACACAGGAC-3'	5'-CCGATGCTCTGCCGCTCTGC-3'
<i>c-jun</i>	5'-CAGATCCCGGTGCAGCACCCG-3'	5'-GTTGGCACCCACTGTTACGTGG-3'
<i>p53</i>	5'-GCATGGGGGGCATGAACCGCCG-3'	5'-GGTCTTCGGGTAGCTGGAGTGAGC-3'
<i>bcl-2</i>	5'-ACGACTTCTCCCGCCGCTACC-3'	5'-TCTCCCGTTGACGCTCTCCA-3'
cyclophylin	5'-CCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTT-3'	5'-ACCCAAGGGAAGTGCAGCGAGAG-3'

**Table II. Effect of chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci upon the levels of sex steroids and on testes, spleen and thymus weight. \***

	<b>Control mice (n=6)</b>	<b>Parasitized mice (n=6)</b>
<b>Serum estradiol (pg/ml)</b>	<b>9.87 ± 2.5</b>	<b>956.7 ± 172.8†</b>
<b>Serum Testosterone (pg /ml)</b>	<b>321.5 ± 95.8</b>	<b>50.5 ± 10.9†</b>
<b>Testes weight (mg)</b>	<b>348.9 ± 38.5</b>	<b>200.4 ± 14.1†</b>
<b>Spleen weight (mg)</b>	<b>359.8 ± 59.4</b>	<b>758.6 ± 65.4‡</b>
<b>Thymus weight (mg)</b>	<b>150.6 ± 42.1</b>	<b>450.9 ± 11.7†</b>

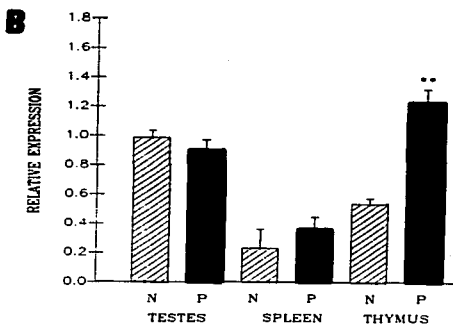
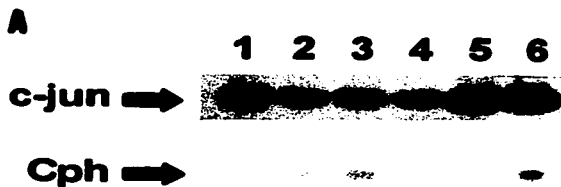
\*Data are presented as mean ± SD.

†P < 0.01; ‡P < 0.05 compared to the control group. Student's t-test.



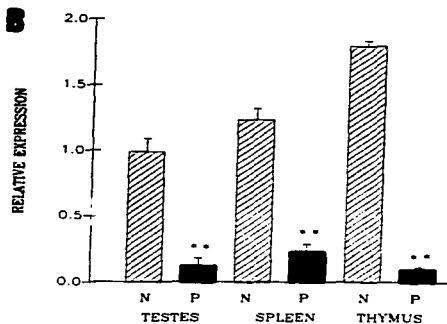
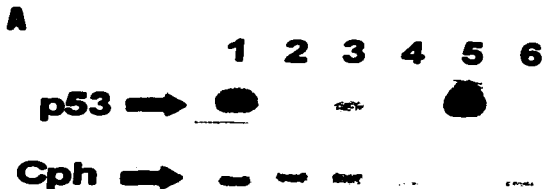
**Figure 1.-** *c-fos* mRNA content during experimental male murine *Taenia crassiceps* cysticercosis.

(a) A representative Northern blot as described in Materials and Methods from testes, spleen and thymus of control and parasitized male mice. Upper panel, *c-fos* gene expression, and lower panel, cyclophylin expression (Cph). Lane 1 Normal Testes, Lane 2 Parasitized Testes, Lane 3 Normal Spleen, Lane 4 Parasitized Spleen, Lane 5 Normal Thymus, Lane 6 Parasitized Thymus. Data represent pools of 5 mice, and each experiment was performed in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data of the autoradiographic signal. The relative expression was obtained by dividing the expression of the studied gene by that of cyclophylin (Cp), used as a constitutively expressed gene. Values are mean ± S.E.M. \*P < 0.01.



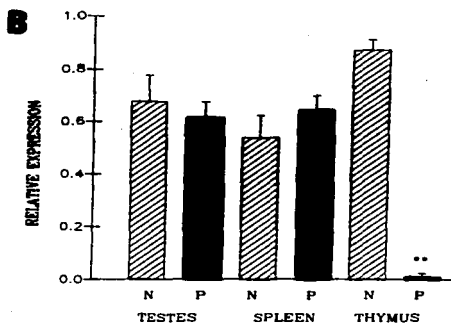
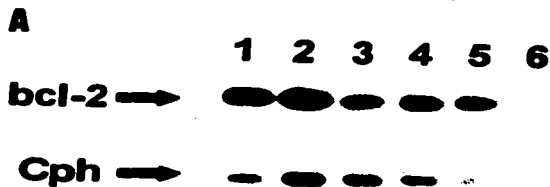
**Figure 2.- *c-jun* expression during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci.**

(a) A representative Northern blot prepared from total RNA from reproductive and lymphoid tissues as described in Materials and Methods. Upper panel, *c-jun* gene expression, and lower panel, cyclophilin expression (Cph). Lane 1 Normal Testes, Lane 2 Parasitized Testes, Lane 3 Normal Spleen, Lane 4 Parasitized Spleen, Lane 5 Normal Thymus, Lane 6 Parasitized Thymus. Data represent pools of 5 mice, and each experiment was made in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data of the autoradiographic signal. The relative expression was obtained as described in Figure 1. Values are mean ± S.E.M. \* $P < 0.01$ .



**Figure 3.** - *p53* gene expression during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci in the BALB/c male mice.

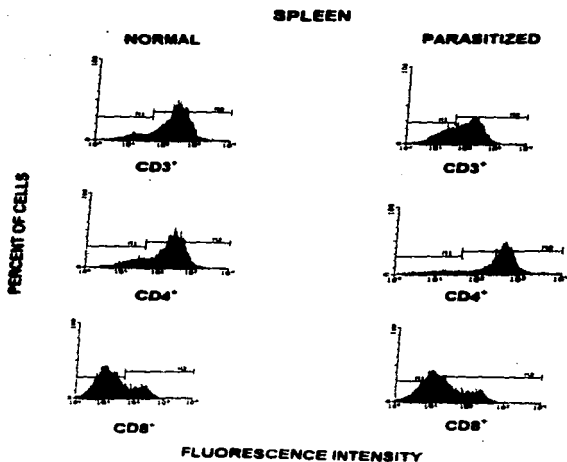
(a) A representative Northern blot prepared from total RNA from reproductive and lymphoid tissues as described in Materials and Methods. Upper panel, *p53* gene expression, and lower panel, cyclophilin expression (Cph). Lane 1 Normal Testes, Lane 2 Parasitized Testes, Lane 3 Normal Spleen, Lane 4 Parasitized Spleen, Lane 5 Normal Thymus, Lane 6 Parasitized Thymus. Data represent pools of 5 mice, and each experiment was made by triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data of the autoradiographic signal. The relative expression was obtained in the same way as for *c-fos* gene. Values are mean ± S.E.M. \* $P < 0.01$ .



**Figure 4.** *bcl-2* expression during experimental male murine *Taenia crassiceps* cisticercosis.

(a) A representative Northern blot prepared from total RNA as described in Materials and Methods from reproductive and lymphoid tissues. Upper panel, *bcl-2* gene expression, and lower panel, cyclophilin expression (Cph). Lane 1 Normal Testes, Lane 2 Parasitized Testes, Lane 3 Normal Spleen, Lane 4 Parasitized Spleen, Lane 5 Normal Thymus, Lane 6 Parasitized Thymus. Data represent pools of 5 mice, and each experiment was made in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data of the autoradiographic signal. The relative expression was obtained in the same way that for the other measured genes. Values are mean ± S.E.M. \* $P < 0.01$ .



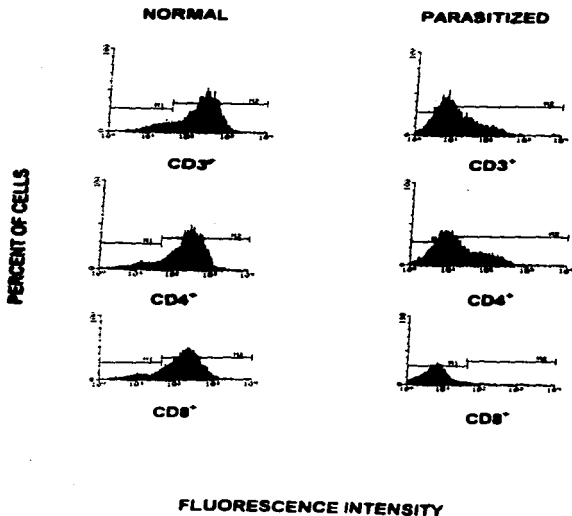


**Figure 5.-** Cellular subpopulations in the spleen of normal and 18-wk parasitized male mice.

Cells were stained by indirect immunofluorescence with anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 antibodies and analyzed by Fluow cytometry. In order to define the threshold level ( $M_1$ - $M_2$ ) cells were only incubated with the labeled secondary antibody. Profiles are representative of 15,000 collected events.

Figure is a representative plot of 5 experiments carried out in triplicate.

## THYMUS



**Figure 6.-** Cellular subpopulations in the thymus of normal and 16-wk-parasitized male mice.

Cells were stained by indirect immunofluorescence with anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 antibodies and analyzed by Fluow cytometry. In order to define the threshold level (M<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>) the cells were incubated with the labeled secondary antibody only. Profiles are representative of 15,000 collected events.

Figure is a representative plot of 5 experiments carried out in triplicate.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

Jorge Morales is recipient of a doctoral fellowship from CONACyT, México. This work was supported by grant IN207085 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M., México. We are grateful to Dr. Raymond T. Damian (Department of Cell Biology, University of Georgia), for revising and correcting the English version of the manuscript, and Tzipe Govezensky and Enrique Ortega (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M) for their help in the densitometric analysis.

**Role of P-450 aromatase during the feminization process of the male host during experimental murine *Toxona crassiceps* cysticercosis.**

**J. Morales-Montor<sup>1</sup>, C. Larralde<sup>1</sup>, M.A. Carbón<sup>2</sup> and M.C. Romano<sup>2\*</sup>.**

<sup>1</sup> *Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, AP 70229, México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510*

<sup>2</sup> *Departamento de Biología, Laboratorio de Endocrinología Molecular, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.*

<sup>3</sup> *Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, AP 14-740, México D.F., 07000, México.*

**RH: Role of aromatase during murine cysticercosis.**

**\*Correspondence to: M. C. Romano**

**Keywords:** Aromatase, feminization, cysticercosis, host, chronic infection, murine, *Taenia crassiceps*.

**ABSTRACT:** *In experimental chronic murine Taenia crassiceps cysticercosis exists a feminization process of the male host, characterized by an increase in serum estradiol levels, whilst those of testosterone are decreased. Aromatase is the key enzyme in the metabolism from testosterone to estradiol, and is regulated by many factors. Since the levels of estradiol rise as those of testosterone diminish, we suspected a direct participation of this enzyme in the change of sex steroids found in the parasitized male host. We have demonstrated the participation of this enzyme by two main approaches: in vivo, by administering an aromatase inhibitor, and by Northern blot. Administration of an inhibitor of aromatase during a 2 wk period in a group of 8 wk parasitized male mice inhibited the production of estradiol and the testosterone levels recovered to normal values; furthermore, in these animals, the weight of seminal vesicles and testes were not significantly changed compared with parasitized controls, which present the feminization process mentioned above. The number of parasites recovered from peritoneal cavity and the levels of serum anti-cysticerci antibodies were 50% reduced compared with parasitized controls, and there was a recovery in the cellular immune response in the group of animals in which antiaromatase was used. The mRNA content for aromatase in the testes of the parasitized male mice is as high as the ovary of a normal female mice. In contrast, 5 $\alpha$ -reductase expression is markedly diminished in all the tissues analyzed in the parasitized male mice. These results strongly suggest that testicular aromatase has a central role during the feminization process in the chronically parasitized male mice.*

## INTRODUCTION

In experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis exists a remarkable sex associated susceptibility, with female mice of various strains being more susceptible than mice to acute infection ( 1 ). However, during chronic infection (more than 4 weeks) parasite loads increase massively in both genders, reaching thousands of metacercariae per host (1,2). This change in the initial resistance of the male host to the infection is associated with an impressive feminization process: the serum estradiol levels are increased by 200 times their normal value, whilst those of testosterone are 50% reduced relative to non-parasitized mice. At the same time, the weight of seminal vesicles and testes are also significantly reduced ( 3 ). Furthermore, during infection process, male mice sequentially lose their normal sexual behavior pattern, by first losing ejaculation response, then the intromission response and finally, at 16wk of infection, the mount response is also abolished (4). This sexual behavior is completely restored after testosterone and dihydrotestosterone restitution of the parasitized mice. All disturbances observed in male animals have been related to the high estradiol and low testosterone levels detected in parasitized animals ( 3,4 ). On the other hand, immunological experiments have demonstrated that estradiol positively regulates parasite reproduction in hosts of both genders, presumably by interfering with the thymus-dependant cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth (TH1) and enhancing those that facilitating (TH2) this process (5). Thus the striking differences in susceptibility to cysticercosis between male and female mice may involve the joint action of the immune system and the gonads, both influenced by a parasite which changes the male hormonal milieu during chronic infection. On the other hand, gonads are required to induce higher estrogen synthesis, because male mice both gonadectomized and parasitized lack detectable estradiol levels ( 3 ).

Aromatase cytochrome P-450 (P450arom) is an enzyme required for the conversion of testosterone (T) to estradiol (E) in the ovary and testes of many mammals, and this activity has been extensively studied ( 6,7,8 ). Normally, in mammalian testes, this enzyme activity is very low, and the levels of estradiol in males are not detectable, presumably because there is a preferential metabolism from T to dihydrotestosterone (DHT) by a major activity of 5 $\alpha$ -reductase ( 9 ). Factors known to increase aromatase activity include gonadotropins such as follicle stimulating hormone (FSH) ( 10 ), forskolin ( 11 ), 8-bromo cAMP ( 12 ) and Interleukin-6 (IL-6) ( 13,14 ).

IL-6 is a multifunctional cytokine that regulates various aspects of the immune response, acute-phase reaction and hematopoiesis. Normally, IL-6

is involved in the regulation of humoral immune responses (TH<sub>2</sub>) in viral and bacterial infections, and is an important *in vivo* SOS signal which coordinates activities of liver cells, macrophages and lymphocytes ( 15 ). The endocrine effects of this cytokine have been extensively demonstrated. For instance, IL-6 has been shown to stimulate the secretion of LH and FSH in cultured pituitary cells *in vitro* ( 16 ), stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone through the stimulation of the production of hypothalamic corticotropin-releasing hormone in freely-moving rats ( 17 ), the release of prolactin from anterior pituitary gland ( 18 ) and the inhibition of FSH-stimulated progesterone production by granulosa rat cells *in vitro* (19). Furthermore, this pleiotropic cytokine is produced in many endocrine tissues, including anterior pituitary cells *in vitro* ( 20 ), medial basal hypothalamus ( 21 ) and by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures (22). In some reports, the IL-6 activity has been shown as an important factor that affects aromatase activity, principally in breast cancer estrogen-dependent ( 12,13 ). Furthermore, we have shown that the levels of this cytokine are augmented in chronically parasitized males by *Taenias crassiceps* cysticerci (3).

Since in the male host chronically infected with *Taenias crassiceps* cysticerci there is a change in the production of sex steroids, and this change is mediated through the testis, we envisaged a higher activation of P-450arom in the testes of the infected male host. On the other hand we expected the expression of 5 $\alpha$ -reductase, which is the normal step for metabolism of testosterone, to be diminished. Thus, we expected to find a higher mRNA content for aromatase in the testes of the parasitized male mice, and by using an anti-aromatase *in vivo* treatment, we expected to be able to inhibit the feminization process in the chronically infected male mice. In contrast, the low estradiol levels produced in the mice treated this way, were expected to lead to a recovery in cellular immune responsiveness, which is the main mechanism for parasite elimination and the parasite loads will be diminished.



## MATERIALS AND METHODS

### *Mice*

Male Balb/c inbred mice were bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations, starting with original stock from Jackson Laboratories in 1982; they were fed Purina Diet 5015 and water ad libitum.

### *Parasites and experimental infections*

The fast growing ORF strain of *Taenia crassiceps*, isolated by R. Freeman in 1982 (23), was used for mice infection in all experiments and was supplied by Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg Germany) in 1986. Since then, the parasites have been maintained in female Balb/c mice by intraperitoneal sequential inoculation of metacystodes in their peritoneal cavity. Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 months before. Ten small (approx 2mm diameter) non budding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml PBS (0.15M NaCl, 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into each 42 day-old mouse using a 0.25 gauge needle. Mice were sacrificed by cervical dislocation previous ether anesthesia to 8 wk of infection and all the cysticerci found inside the peritoneal cavity were counted. A complete parasite count was performed visually in each mouse after sacrifice by collecting them after thorough rinsing it with PBS. Parasites never were found outside of peritoneal cavity.

### *Total RNA extraction*

Total RNA was isolated from the testes, seminal vesicles, epididymis and spleen of normal and 10 wk parasitized male mice, and ovary from normal females of the same age, with the single step method based on guanidine isothiocyanate / phenol / chloroform extraction using TRIZOL reagent (Gibco-BRL, NY, USA). In brief, each tissue was removed and immediately disrupted in TRIZOL reagent (1 ml/ 0.1g tissue). 0.2ml of chloroform were added per ml of TRIZOL. The aqueous phase was recovered after a 10 minute centrifugation at 14000 x g. RNA was precipitated with isopropyl alcohol, washed with 75% ethanol and redissolved in RNase-free water. RNA concentration was determined by absorbance at 280nm and its purity was verified after electrophoresis on 1.5% denaturing agarose gel in the presence of 2.2 M formaldehyde.

### **RT-PCR**

Total RNA from various tissues of normal male mice was reverse transcribed followed by specific PCR amplification of P-450aromataase and cyclophylin genes to synthesize double strand cDNA in order to obtain specific probes from mouse genes for Northern blot analysis.

Briefly, 2 µg of total RNA were incubated at 37°C for 1 h with 400 units of M-MLV reverse transcriptase in 20 µl of reaction volume containing 50mM of each dNTP and 0.05 µg oligo (dt) primers (Gibco-BRL, NY, USA). Ten µl of the cDNA reaction was subjected to PCR in order to amplify a specific fragment of the mouse P-450aromataase and cyclophylin genes. The sequences of the oligonucleotides primers used for each gene amplification are described in Table 1. The 50 µl PCR reaction included: 10 µl of previously synthesized cDNA, 25 µl of 10x PCR-buffer (Perkin-Elmer, USA), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.05µM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer, USA). The PCR conditions for P-450 aromataase were: 92°C 2 min, 55°C 15 seg. and 72°C 30 seg 1 cycle; 94°C 15 seg, 55°C 15 seg and 72°C 30 seg for 28 cycles and 1 final cycle to 94°C 15 seg, 55°C 15 seg and 72°C 10 min.

### **Specific cDNA's purification**

Twenty five µl of the total RT-PCR reaction products of each sample were electrophoresed on 2% agarose gel. The PCR products obtained were visualized by staining with ethidium bromide, and were detected by using a 100 bp ladder as a molecular weight marker (Gibco, BRL, NY). A single band was detected in all the cases, and the size of the product as expected for P-450aromataase was a fragment of 567 pb. The band was excised directly from the gel, and purified by electroelution. These specific cDNA were used to perform the Northern blot hybridization analysis of the male tissues.

### **Northern Blot Analysis**

Aliquots of total RNA containing 20 µg from each tissue were denatured and electrophoresed in a 1.8% of formaldehyde-agarose gel as previously described (24). The integrity of the RNA was ascertained by UV visualization of the ethidium bromide-stained gels. The RNA in the gel was blotted overnight to a nylon membranes (Gene Screen plus, DUPONT, Boston) and was subsequently hybridized with a specific cDNA fragments <sup>32</sup>P labeled for P-450aromataase, 5α-reductase or cyclophylin, prepared by a random-primer labeling system (Gibco BRL, NY) according to manufacturers

specifications. After hybridization, membranes were washed twice with 2X SSC at room temperature for 30 min, followed by 0.1X SSC-0.1% SDS at 50°C for 30 min. The membranes were then exposed to Kodak XAR-5 X-ray film (Eastman Kodak Co. Rochester) for 24-48 h at -70°C. The autoradiographs were analyzed by densitometry.

#### **Densitometric Analysis**

Hybridization signals were quantified by densitometric scanning of multiple autoradiograms of various exposures, and were represented as the ratio of the signal of each studied gene relative to the cyclophilin gene expression which is a constitutive gene used as an internal control.

All experiments were performed in triplicate, and the data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test of individual differences between means. The Epistat statistics program (Epistat Services) was used for calculating probability values.

#### **Hormone measurements**

Blood for steroids determinations was collected *in vivo* by retrocular venous puncture performed in mice under deep ether anesthesia. After incubation for 5 h to environment temp and 18 h to 4°C the blood clot was centrifuged and serum was obtained. Steroids were ether-extracted and solubilized in buffer used for radioimmunoassay (RIA) (25, 26). The concentrations of estradiol and testosterone were determined by RIA, each in duplicate. The antisera were all supplied by ICN Biomedical Inc. (Costa Mesa, CA). The estradiol antiserum cross-reacts 2.5% with estrone and 1.3% with 17 $\alpha$ -estradiol, and the testosterone antiserum cross-reacts with 18.8% with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) and 3% with 5 $\alpha$ -androsterone-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diol. Tritiated ligands 1,2,6, 7-<sup>3</sup>H testosterone and 1,2,4,6-<sup>3</sup>H-estradiol were supplied by New England Nuclear (Boston, MS). RIA data were analyzed by the logit/log regression analysis as described (24). The testes and seminal vesicles were dissected out and weighed wet in an analytical balance.

#### **Antibodies levels**

Levels of antibodies anticysticerci in serum were performed by Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). Briefly, the plates were sensitized with 100 $\mu$ g of a *Taenia crassiceps* cysticerci total extract in carbonate buffer. After overnight incubation to 4°C, the plates were washed three times with PBS-tween 0.3% and blocked with BSA 0.1% (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) for 1h to 37°C. The serum samples were added at a final

dilution of 1:1000 and the reaction was revealed using a goat-antimouse peroxidase antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis MO). The plate was read at 490nm after the reaction was stopped with 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Baker, Co.).

#### **Spleen Lymphocyte Proliferation Assays**

The spleen of mice was surgically extracted, after the mice were sacrificed the mice, in sterile conditions as previously described (27). The cells were extracted by perfusion of the organ with RPMI supplemented culture medium (10% FBS, essential amino acids 0.05%, L-glutamine 1%, and antibiotic (penicillin-streptomycin) 1% [Gibco, BRL, N.Y., U.S.A.]) using a 0.25 gauge needle. The lymphocytes were obtained after all the red blood cells were lysed by incubating 3 minutes to 4° C in a lysis buffer (NH<sub>4</sub>Cl 0.1M, Triz 2.05%). Lymphocytes were incubated in 96 well culture plates (Costar, C.A., U.S.A.), adjusted to 10<sup>5</sup> cells by ml. They were then stimulated by addition of Concanavalin-A (Con-A) to a final concentration of 10 µg/ml and incubated for 54 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37° C. After this time of incubation, a pulse of 1µCi of <sup>3</sup>H-Thymidine per well was added, and the cells were left for other 18 h. Then, the cells were harvested in an automatic cell harvester (Skatron Instruments, Mod. 11026) and counted in a Betaplate system (Wallac, Mod. 1205).

#### **Statistics**

All data were analyzed by ANOVA test or unpaired Student's test as is convenient. The data express the SEM ± the SD of two experiments carried by triplicate. A probability of P<0.01 was regarded as significant in every case.

## RESULTS

A representative autoradiography of the expression of P-450 aromatase assayed by Northern Blot is observed in Figure 1a. It is clear that the parasitized testes produce mRNA for aromatase as high as the normal ovary of mouse. The densitometric analysis shows that the testes of parasitized males (Lane 2) shows an increment in mRNA content for the enzyme of 25-folds ( $P < 0.01$ ) compared with the normal testes (Lane 3), and the expression of P-450arom in the testes of the parasitized male mice is equal ( $P < 0.01$ ) to that of the ovary of a normal female mice (Lane 1). In the other hand, there were no detectable expression of aromatase in the muscle of the male mice used as a negative control (Lane 4). With respect to the expression of a constitutive gene as is cyclophilin (Cf), its expression is constant in all the tissues examined (Figure 1b). In figure 1c there is the integrity of the RNA used for the Northern blot analysis, and it shows no degradation and the same amount for all the lanes.

In contrast, Northern blot analysis of  $5\alpha$ -reductase shows a clear diminution in the transcription of this enzyme in the reproductive tissues in the parasitized males (lanes 4, 6, 8 and 10) compared with the control non-parasitized males (lanes 3, 5, 7 and 9). In lane 1 is shown a control of mRNA from rat prostate, whilst in the Lane 2 is the negative control of expression as is the mouse ovary which do not present mRNA for this enzyme. In the epididymis of the parasitized male mice, there was no inhibition in the mRNA content of this enzyme relative to control normal male mice, and even there is an increase in  $5\alpha$ -reductase expression of 3.4-fold ( $P < 0.01$ ). The relative expression corrected against cyclophilin gene is plotted in Figure 2b, and, is clear a decrement of approximately 2.3-folds ( $P < 0.01$ ) in the testes of the parasitized male, compared against the control mice. The expression of  $5\alpha$ -reductase in the seminal vesicles is decreased in 3.1-folds ( $P < 0.01$ ) in the parasitized mice, whilst for prostate, the diminution in the mRNA content is 2.6-fold ( $P < 0.01$ ), compared with normal male mice. Finally, we were able to detect a great expression of the enzyme in the thymus of the male mice, and it is clear, that the mRNA content in the parasitized mice is decreased by 7.8-fold ( $P < 0.01$ ) compared with normal mice. In Figure 2c there is the integrity of the RNA used for the Northern blot analysis, which also were similar in content among all tissues analyzed.

The serum steroids levels measured from treated and control mice are shown in Figure 3. At the 10 wk of infection parasitized and vehicle injected mice augments the estradiol concentration in serum by 100 times, compared with normal controls, in which there are not detectable levels of

estradiol, whilst male mice parasitized and treated with anti-aromatase did not present the estrogenization process, compared with parasitized controls. With respect to testosterone, the administration of the anti-aromatase compound modified the serum levels seen in parasitized controls and vehicle mice. The normal and treated mice presents similar levels of testosterone, whilst controls parasitized and vehicle mice have a reduction of 50% in serum testosterone levels.

The target organ for androgens, prostate and seminal vesicles, were wet-weighed in all mice used in this study. In Figure 4 are plotted the values obtained from the weight of prostate and seminal vesicles. Both androgen target organs did not change in weight in control and treated parasitized mice, whilst parasitized controls and vehicle mice had a reduction in weight of 50% in seminal vesicles and 30% in prostate.

In Figure 5 are shown the parasite loads obtained from the different experimental groups. The number of parasites are 50% reduced in the anti-aromatase treated mice, compared to the control and vehicle parasitized mice, in which the number of parasites recovered from peritoneal cavity was  $560 \pm 140$ . This number of parasites is correlated with the anti-cysticerci antibodies against parasite produced by the different groups, and the cellular lymphocyte proliferation response. As is expected, the anti-aromatase treated parasitized mice had lower O.D. values compared to the control and vehicle parasitized mice, which don't have differences between them (Figure 5). Furthermore, the cellular immune response was evaluated. Our results, clearly shows a recovery in the splenocyte proliferation of the mice treated with anti-aromatase, in which splenocyte proliferation was almost recovered like the normal male mice, whilst parasitized controls mice and vehicle administrated mice had diminished this response by 35% compared to normal controls (Figure 5).

## DISCUSSION

Previously we have been shown that *Taenia crassiceps cysticerci* trigger a feminization process in the male host, characterized by an increase in serum estradiol levels of 200 times their normal values, whilst those of testosterone are 90% decreased (3), and that these changes in sexual steroids have important physiological repercussions for the host, with loss of sexual behavior during chronic infection (4). In this report, we were able again to reproduce this feminization process. But, the question is how are the cysticerci able to drive the hormonal environment of the host, metabolizing molecules that are restrictive for his establishment (testosterone) to something permissive (estradiol) for parasite growth?

A simple strategy for the cysticerci to achieve these sexual steroid changes would involve the stimulation of the aromatase pathway, the key enzyme responsible for the conversion of testosterone to estradiol. The results shown in this paper confirmed the participation of P-450arom in this feminization process, since we found a higher expression of the specific gene for aromatase in the testes of the 10 wk parasitized male mice. Since when we used 4-hydroxiandrostendione (an inhibitor of the aromatase) the levels of estradiol are inhibited, whilst those of testosterone are not altered, the participation of this enzyme was confirmed. All these results support the notion that the key in this feminization process is the P-450arom complex enzyme.

However, what factors are involved in the activation of the enzyme? One possibility to be explored, is the ability of the parasite itself to achieve this gonadal activation. More experimentation on this point is being extensively done by us actually, but previous results indicated that the parasite by itself is unable to alter the normal gonadal steroidogenic pathway, since in culture the parasite does not alter testosterone production. When the animals are gonadectomized, and estradiol levels are undetectable, the testes is necessary to produce the feminization process mentioned above (4). This was here confirmed, because only in the testes of the parasitized animals we were able to detect increased expression of aromatase, while in other tissues analyzed of the male mice we were unable to detect aromatase (data not shown).

In the other hand, it is known that other biological factors of the host, such as glucocorticoids may induce aromatase in some experimental systems (28, 29). Perhaps, due to the stress provoked by the infection, chronic parasitized mice have higher circulating levels of glucocorticoids, which in turn may provoke an hyperactivation in the transcription of the testicular aromatase. More experimentation is needed to clarify this point.

Another biological factor associated in the aromatase activation is the pleiotropic cytokine interleukin-6 (IL-6). IL-6 is a multifunctional cytokine involved in a multitude of endocrine effects, besides immunological regulation of parasitic infections. Therefore, IL-6 has been demonstrated to be produced by constitutive ovarian cancer cells and to influence aromatase activity in the breast (29, 30). For instance, IL-6 is a cytokine involved on the regulation of immune response type Th2 in response to parasitic infections (29). Because during chronic experimental infection there is hyperactivation of Th2, and for this reason there is a high production of antibodies, it may be this cytokine could importantly be augmented. Previously we have measured the production of this cytokine, and our results clearly show that serum IL-6 is elevated during chronic infection with *Toxaria crassiceps* cysticerci in male mice, and in culture, the lymphocytes of parasitized animals have higher production of IL-6, compared to normal controls (3).

These results are in agreement with those of Miller and Mullen in 1993 (30). In this report, the authors were able to show that IL-6 has stimulatory effects on aromatase and that concentrations of IL-6 are higher in type II (estrogen-dependent) compared with type I fluids of cancerous cysts. Perhaps the IL-6 is the key factor in this feminization process, activating the aromatase pathway, and producing a preferential metabolism from testosterone to estradiol. The low testosterone concentrations in the serum of the parasitized male mice, in turn, inhibit the production of 5 $\alpha$ -reductase mRNA, since this enzyme is downregulated in the reproductive system of the males. This enzyme is responsible for producing dihydrotestosterone (DHT), which is the normal pathway of metabolizing testosterone. Estradiol, in turn, favours parasite growth, and inhibits cellular immune responses (Th1). Furthermore, a shift from Th1 to Th2 occurs, and the cytokines produced by Th2 are inhibitory of Th1 immune responses, perhaps producing in this way the feminization process and promoting parasite reproduction (Figure 7).

Our present results are in agreement with the idea that androgens are restrictive for parasite growth, whilst estrogen promotes parasite reproduction (Fig 6). Although, it is well established that estrogens are inhibitory for cellular immune response, and stimulatory for humoral immune response (31,32), in this report, we have been shown that when the animal is chronically parasitized, the humoral response is enhanced and the cellular is diminished, whilst estradiol augments and testosterone diminishes. When anti-aromatase is administered, aromatase is inhibited, and high estradiol levels are not produced, maintaining those of testosterone in normal levels. At the same time there is a recovery in



cellular responses, which in turn diminishes parasite loads, pointing to a strong control of the immune response in this infection by steroids.

The cunning hormonally based strategy employed by *Toxoplasma gondii* to establish an uneasy mass of foreign tissue in an initially normal comparatively resistant male mouse may be of interest for consideration in other chronic massive host-parasite confrontations.

The feminization process presented in the male host may be more a consequence than the cause, provoked by hyperstimulation of Th2 cytokines, principally IL-6, of the host, which in turn alter other important physiological functions like reproduction (4).

This report is a clear example of how immune system and neuro-endocrine system are importantly connected, and when there is an hyperstimulation of one of them this produces consequences in all the organism. Finally, host feminization by parasitic disease illustrates the plasticity of sexual phenotype in response to infections, involving the immune system, and, by endangering the reproductive capacity of the host, offers novel forms of affecting the evolution of both host and parasite other than the prey/predator approach.

## REFERENCES

1. Dorais, F.J. and Gerald W. Esch. 1999. Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* 25 395-399.
2. Sciutto E., Fragoso G., Díaz M.L., Vázquez F., Lomeli C., Govezensky T., Moroyo R.M. and Larraide C.: Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res.* 77 (1991) 243-246.
3. Larraide C., Morales J., Terrazas I., Govezensky T. and Romano M.C.: Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52 (1995) 575-580.
4. Morales J., Larraide C., Arteaga M., Govezensky T., Romano M.C and Morali G.: Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* In press.
5. Fitzpatrick S. and Richards J.S.: Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 129 (1991) 1452-1461.
6. Voss A.K. and Fortune J.E.: Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology.* 132 ( 1993) 2239-2245.
7. Price M.T. and O'Brien S.N.: Determination of estrogen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and cytochrome P450 aromatase mRNA levels in adipocytes and adipose stromal cells by competitive polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Endo. Metabolism.* 77 ( 1993) 1041-1045.
8. Romerts F.F.G. and Van der Molen H.J.: Testicular Steroidogenesis. In *The Testis* ( Edited by H. Burger and D. de Kretser) Raven Press, NY (1989) pp 303-327.
9. Darrington J.F., Moon Y. S. and Armstrong D.T.: Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in culture granulosa cells from hypophysectomized immature

rate: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. **97** (1975) 1328-1331.

10. Richards J.S., Hickey G.J., Chan S., Shively J.E., Hall P.F., Gaddy-Kurten D. and Kurten R.: Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Steroids* **58** (1987) 393-400.

11. Richards J.S.: Maturation of ovarian follicles: action and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* **68** (1988) 51-89.

12. Reed M.J., Coldham N.G., Patel S.R., Ghilchik M.W. and James V.H.T.: Interleukin-1 and Interleukin-6 in breast cyst fluid: their role in regulating aromatase activity in breast cancer cells. *J. Endocrinol* **132** (1992) R5-R8.

13. Reed M.J., Topping L., Coldham N.G., Purohit A., Ghilchik M.W. and James V.H.T.: Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **44** (1993) 589-598.

14. Kopf M., Baumann H., Frey G., Freudenberg M., Leners M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H. and Kohler G.: Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. **388** (1994) 339-342.

15. Spangelo B.L., Judd A.M., Isakson P.C. and MacLeod R.: Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release *in vitro*. *Endocrinology*. **128** (1990) 575-577.

16. Nakai Y., Fukata J., Tomiyaga T., Nakai Y., Tamei S., Mori K. and Imura H.: Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186** (1992) 1459-1463.

17. Yamaguchi M., Matsuzaki N., Hirota K., Miyake A. and Tanizawa O.: Interleukin-6 possibly induced by interleukin-1 $\beta$  in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endo.* **122** (1990) 101-205.

18. Gorsage C.W., Hughes F.M. and Spangelo B.L.: Interleukin-6: Effects On and production by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*. **130** (1992) 1750-1762.
19. Spangelo B.L., MacLeod R.M. and Isakson P.C.: Production of Interleukin-6 by anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology*. **130** (1990) 582-586.
20. Spangelo B.L., Judd A.M., MacLeod R.M., Goodman D.W. and Isakson P.C.: Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus. *Endocrinology*. **127** (1990) 1779-1785.
21. Watson J.M., Sensintaffer J.L., Berek S.J. and Martinez-Meza O.: Constitutive production of interleukin-6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. *Cancer Res.* **50** (1990) 6959-6965.
22. Freeman R.S.: Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* **49** (1992) 989-990.
23. Aguilera G. and Romano M.: Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J. Endocr.* **3** (1989) 367-373.
24. Reyes-Esperza J. and Romano M.: An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *J. Steroid Biochem.* **34** (1989) 541-545.
25. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes (Molecular Cloning. A laboratory Manual, Volume 2) pp. 10.14-10.15, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
26. Simpson E.R., Cleland W.H. and Mendelson C.R.: Aromatization of androgens by human adipose tissue *in vitro*. *J. Steroid Biochem.* **19** (1983) 707-713.
27. Folkard E.J. and James V.H.T.: Aromatization of steroids in peripheral tissues. *J. Steroid Biochem.* **19** (1983) 687-690.
28. Sher, A. and R. L. Coffman: Regulation and immunity to parasites by T cells and T-cell derived cytokines. *Annual Review of Immunology* **10** (1992) 385-400.

29. Miller, W.R. and Mullen, P.: Factors influencing aromatase activity in the breast. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44 (1983) 597-604.

30. Ahmed, S.A., Penhale, W.J., and Talsi, N.: Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex action. *American Journal of Pathology*. 121 (1985) 531-551.

31. Alexander, J., and Stimson, W.H.: Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology today*. 4 (1988) 189-193.

32. Terahima, M., Toda, K., Kawamoto, T., Kuribayashi, I., Ogawa, Y., Maeda, T. and Shizuta, Y.: Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288 (1991) 231-237.

## LEGENDS FOR FIGURES

**Figure 1.-** Increased mRNA content for P-450 gene in the testes of parasitized male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci.

(a) A representative Northern blot as described in Materials and Methods from various tissues. Data represents pools of 5 mice, and each experiment was made in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data of the autoradiographic analyzed signal. The relative expression was obtained by correcting the expression of the studied gene by that of cyclophilin (Cp), used as a constitutive expression gene. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$ .

(c) Integrity of the RNA used for P-450 aromatase Northern blot detection. RNA was stained and visualized as has been described in Methods. Lane 1 corresponds to the samples of Ovary from normal female mice, Lane 2 Testes of parasitized male mice, Lane 3 Testes of normal male mice, and Lane 4 Muscle of normal male mice.

**Figure 2.-** 5 $\alpha$ -reductase gene expression during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci is abolished in the male mice.

(a) A representative Northern blot prepared from total RNA as described in Materials and Methods from reproductive tissues. Data represents pools of 5 mice, and each experiment was made by triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data of the autoradiographic signal. The relative expression was obtained by correcting the expression of 5 $\alpha$ -reductase by that of cyclophilin (Cp), used as a constitutive expression gene. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$ .

(c) Integrity of the RNA used for Reductase Northern blot detection. RNA was stained and visualized as has been described in Methods. Lane 1 Rat Prostate, Lane 2 Mouse Ovary, Lanes 3 and 4 Normal and parasitized Epididymis, Lanes 5 and 6 corresponds to the samples of testes from normal and parasitized mice, Lanes 7 and 8 from Seminal vesicles of normal and parasitized males and Lanes 9 and 10 from Thymus of normal and parasitized male mice.

**Figure 3.-** Effect of chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci and antiaromatase upon the levels of sex steroids.

Estradiol in parasitized and vehicle controls augments by 150 times, whilst testosterone is diminished by 90%. Antiaromatase treatment inhibits the production of estradiol, and do not affect testosterone production. Data are plotted as mean  $\pm$  SD of two experiment carried by quintuplicate. Each

serum sample was analyzed by RIA in duplicated as is described in Methods.

**Figure 4.-** Impact of cysticercosis and Fedozole on the wet weight of the principal sex steroids target organs. The control and vehicle parasitized mice have a reduction of 40% on prostate weight, and of 50% on seminal vesicles. Fedozole treated mice don't have changes on this parameter. Data represents the mean  $\pm$  SD of 1 experiment carried by quintuplicated.

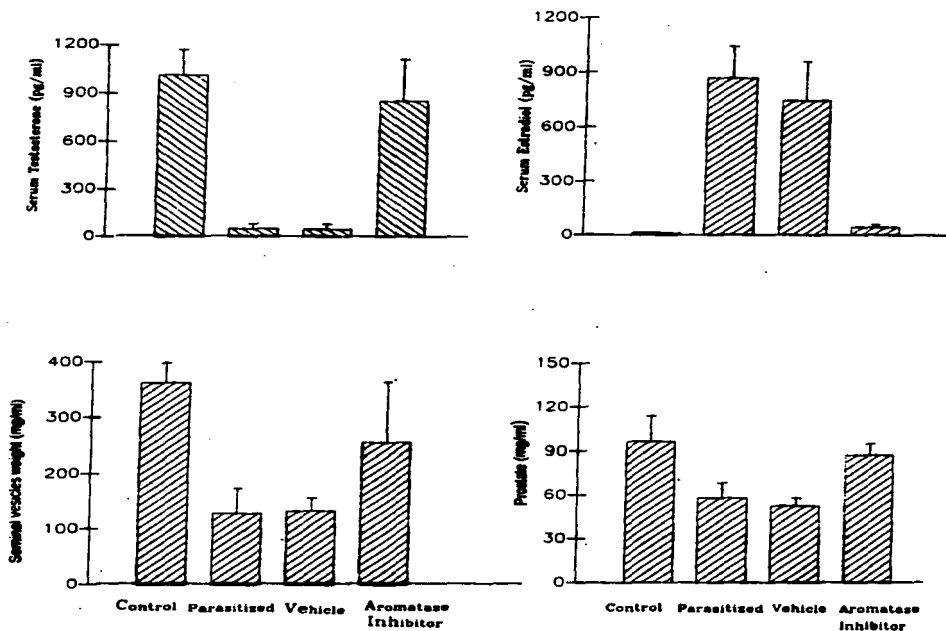
**Figure 5.-** Number of parasites recovered from peritoneal cavity of Balb/c male mice chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci and humoral and cellular immune responses. Levels of antibodies anti-cysticerci obtain by ELISA. Each serum sample was tested by triplicate and the plot was obtained by the average of the optical densities obtained to 490nm. With respect to cellular immune response of Balb/c mice chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci, the parasitized control and vehicle treated parasitized mice have diminished this response by 45%, whilst the antieromatase treated mice have recovered the same to 70% with respect to the control mice. Each cell culture was made two times by triplicate. All the data represents the mean  $\pm$  SD of two experiments by triplicate.

**Figure 6.-** Scheme proposing some immunoendocrinological interactions during chronic experimental male murine cysticercosis produced by *Taenia crassiceps*. The parasite actively produces an immune response which preferentially is TH<sub>2</sub>. This provokes that IL-6 actively acts on the testis stimulating the estradiol production by activating P-450 aromatase. This estradiol is a positive signal for parasite reproduction, which in turn inhibits cellular response that besides is inhibited too by TH<sub>2</sub>, which is a positive signal for parasite reproduction. Testosterone will be inhibitory for the parasite establishment, and from this manner, the parasite is able to drive the immune response of the host, using the endocrine system of the same, to change the microenvironment from one restrictive to one permissive for his growth.

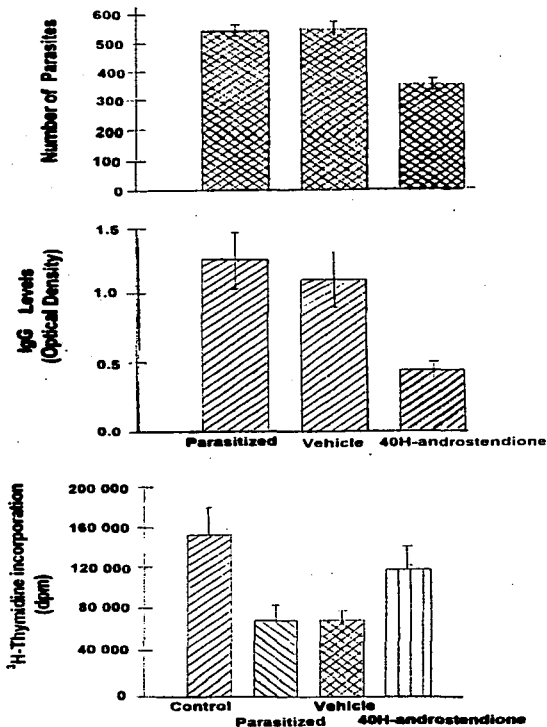
**Table 1.-** Nucleotide sequences of the primers used for cDNA probe synthesis. The primers set flanked the mouse P-450aromatase cDNA (Terushima et al, 1991) sequence from +258 to +505, the human cyclophilin cDNA from +51 to +622 (Haendler et al, 1987).

	Sense Primer	Antisense primer
<b>Aromatase</b>	5'-GAGAGTCTGGATCAGTGGAGAG-3'	5'-GAAGCACAGAGTGACCGACATG-3'
<b>Cp</b>	5'-CCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTT-3'	5'-ACCCAAAGGGAACGCAGCGAGA-3'



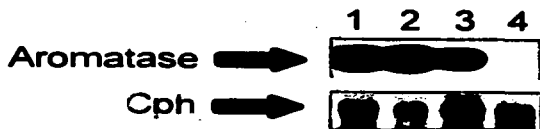
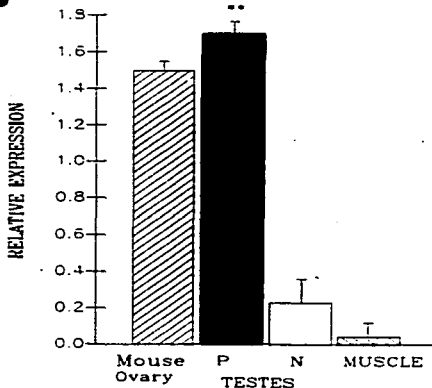


**Figure 1.-** Effect of chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci and antiaromatase administration upon endocrine parameters. In upper panel are plotted serum estradiol (right) and serum testosterone (left) levels. In down panel are plotted the wet weight of seminal vesicles (left) and prostate (right). Data represents the mean  $\pm$  SD of two experiments (n=5) for steroid hormones and seminal vesicles weight and 1 experiment (n=5) for prostate weight.



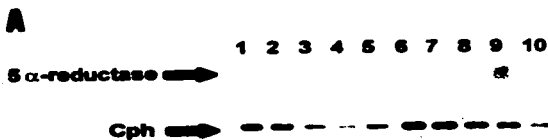
**Figure 2.-** Effect of 4OH-androstenedione administration on parasite load and immune response. In this plate are shown the number of parasites recovered from peritoneal cavity of 10 male BALB/c mice with 10 wk of infection. Also is shown the levels of antibodies (IgG) anti-cysticerci obtained by ELISA and the Con-A response from the splenocytes of the same animals.

Each serum sample and cell culture were tested two times by triplicate. For antibodies determination, the plot was obtained by the average of the optical densities obtained to 490nm. Splenocyte response represents <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (in cpm) of the cells after Concanavalin-A stimulation (10 $\mu$ g/ml). All data represents the mean  $\pm$  SD of two experiments performed by triplicate.

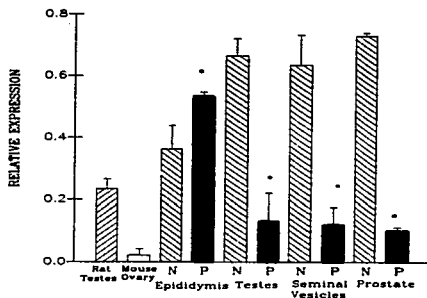
**A****B**

**Figure 3.- Increased mRNA content for P-450 aromatase gene in the testes of parasitized male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci.**

(a) A representative Northern blot as described in Materials and Methods from various tissues of normal and parasitized mice. Lane 1 Ovary from a normal female mouse, Lane 2 Parasitized testes, Lane 3 Normal testes and Lane 4 Muscle from a male normal mice, used as a negative expression control. Data represents pools of 5 mice, and each experiment was made in triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data obtained from the autoradiogram signal. The relative expression was obtained by dividing the expression of the studied gene by that of cyclophilin (Cph), used as a constitutively expressed gene, in order to obtain the relative expression. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$ .



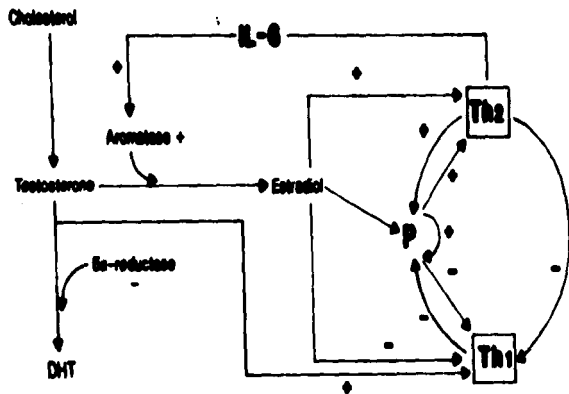
**B**



**Figure 4.-** Steroid 5 $\alpha$ -reductase type II gene expression is abolished in the male mice during chronic infection with *Taenia crassiceps* cysticerci.

(a) A representative Northern blot prepared from total RNA as described in Materials and Methods from reproductive tissues. Lane 1 Rat Prostate, Lane 2 Mouse Ovary, Lane 3 Normal Epididymis, Lane 4 Parasitized Epididymis, Lane 5 Normal Testes, Lane 6 Parasitized Testes, Lane 7 Normal Seminal vesicles, Lane 8 Parasitized Seminal vesicles, Lane 9 Normal Prostate, Lane 10 Parasitized Prostate. Data represents pools of 5 mice, and each experiment was made by triplicate. In (b) results of gene expression are reported as densitometric data obtained from the autoradiogram signal. The relative expression was obtained in the same way as for aromatase. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \*P < 0.01.

Endocrinological Network  $\longleftrightarrow$  Immunological Network



**Figure 5.-** Scheme proposing some immunoendocrinological interactions during chronic experimental male murine cysticercosis. The parasite actively produces an immune response which preferentially is TH<sub>2</sub>. This provokes that IL-6 actively acts on the testis stimulating the estradiol production by activating P-450 aromatase. Estradiol would be a positive signal for parasite reproduction. The decreased testosterone production and high estradiol levels, in turn inhibits the cellular response. In summary the parasite is able to drive the immune response of the host, using its endocrine system. The consequence will be a change in the microenvironmental from one restrictive to one permissive for the cysticercous growth.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

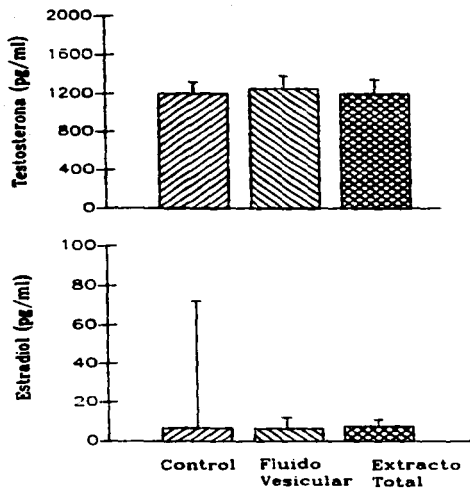
Jorge Morales is recipient of a doctoral fellowship from CONACyT, México. This work was supported in part by grant 208393 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M., by grants 1276-N9204, and 0825-PM of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. We are grateful to Dr. Raymond T. Damian (Department of Cellular Biology, University of Georgia) for revising and correcting the English version of the manuscript, and Tzipe Govezensky and Enrique Ortega by their help in the densitometric analysis.

## **X.- RESULTADOS ADICIONALES**

Para poder determinar si el efecto de feminización parasitaria observado, se debía a una acción directa del cisticerco sobre la gónada, se decidió hacer experimentos *in vitro* e *in vivo* para tratar de esclarecer este punto. Por un lado, se midió la capacidad del cisticerco (fluido vesicular y extracto total) para alterar en un bioensayo de células testiculares de ratón la esteroidogénesis gonadal y por otro se irradiaron ratones con las gónadas protegidas y se parasitaron, para medir después la producción sérica de esteroides gonadales.

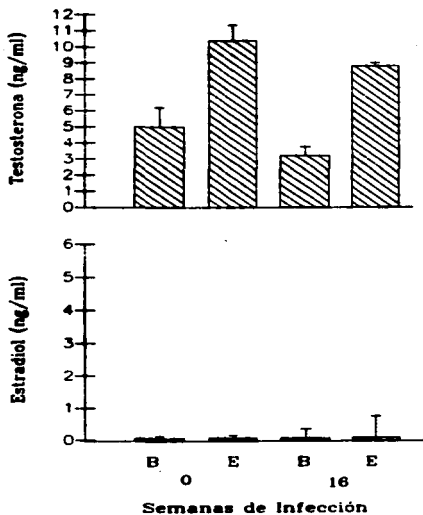
Nuestros resultados muestran que *in vitro*, al incubar células dispersas totales de testículo de ratón normal durante 5 horas en presencia del fluido vesicular o extracto total del cisticerco, no hubo un cambio en la producción de testosterona, y no hubo niveles detectables de estradiol por RIA en el medio de cultivo (Fig. 1). Por otra parte, se obtuvieron testículos de animales de 16 semanas de parasitados que tenían ya claramente desarrollado el fenómeno de feminización, y se incubaron en medio DNEM durante 5 horas para observar si existía una producción diferencial de testosterona y estradiol por el testículo. En la Fig. 2, se muestra que hubo muy poca producción de estradiol, tanto basal como estimulada con hCG, mientras que la de testosterona disminuyó en 10%, comparada contra la producción de testosterona de testículos de animales normales. Estos resultados sugieren que el testículo posiblemente necesita tener un estímulo constante por parte del huésped o del parásito para aumentar la producción de estradiol.

Para determinar si el efecto de estrogenización estaba mediado por el sistema inmune, o es producido *in vivo* por efecto directo del parásito, se hicieron experimentos de irradiación y timectomía neonatal. La irradiación se hizo en animales de 5 semanas de edad, con una dosis sub-lethal de 600 rads, que es conocida como suficiente para deprimir al sistema inmune. Las gónadas se protegieron con cinturones de plomo para no dañarlas con la radiación y se procedió a dividir en 2 grupos a los animales. Un grupo se parasitó y otro se utilizó como grupo control. Lo mismo se hizo con los animales timectomizados. Posteriormente, a todos los animales irradiados y timectomizados, se les midieron varios parámetros hematológicos para corroborar que efectivamente la irradiación y la timectomía, habían sido efectivas, comparándolos contra los parámetros de los animales controles. Estos resultados se muestran



**Figura 1.-** Efecto del fluido vesicular (20mg/ml) y del extracto total (20 mg/ml) del cisticerco de la *Taenia crassiceps* sobre la producción de testosterona y estradiol por células dispersas de testículo de ratón BALB/c. Las células se obtuvieron como previamente lo describieron Romano et al, 1988, y se incubaron durante 5 h en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire a 35° C. La gráfica muestra la media + la DS de los resultados obtenidos de 2 experimentos por triplicado.

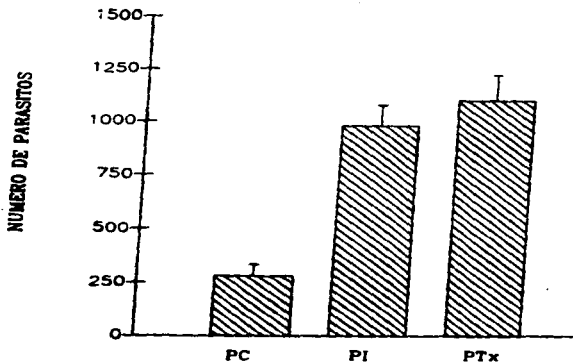




**Figura 2.-** Producción de testosterona y estradiol por testículos de ratones BALB/c normales y parasitados en bioensayo. Los testículos se obtuvieron quirúrgicamente en condiciones estériles, y se incubaron durante 5 h en medio DMEM suplementado, sin hCG (B) o 10 ng/ml de hCG (E) a 35°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Se grafica la media + la DS de 2 experimentos por triplicado.

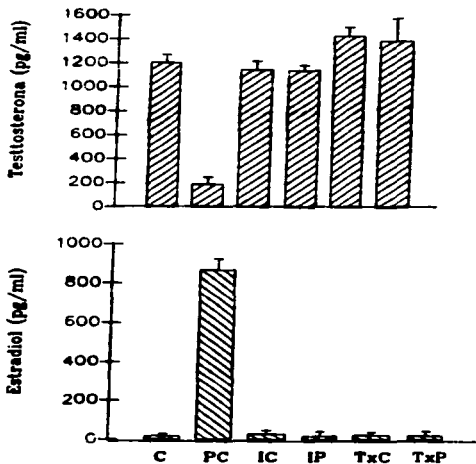
en la Tabla I. Como puede observarse ambos tratamientos fueron efectivos, ya que existe una disminución del 80% en los leucocitos totales, y las cuentas diferenciales de monocitos, bandas, linfocitos y segmentados están también disminuidas significativamente ( $P < 0.01$ ), comparadas contra los valores en los ratones controles. A estos animales así tratados, se les administró antibiótico en el agua *ad libitum*, para evitar otras infecciones durante las 8 semanas de parasitosis. Después de este período, el número de cisticercos encontrados en los animales irradiados o timectomizados fue 3 veces mayor ( $980 \pm 235$ ) que el encontrado en los animales controles del mismo tiempo de infección ( $265 \pm 87$ ) (Figura 3), lo que refuerza la proposición de que el sistema inmune, y en particular la inmunidad celular controlan el crecimiento parasitario. En los animales parasitados, tanto irradiados como timectomizados, no hay niveles séricos de estradiol detectables ( $< 6.26$  pg/ml), mientras que en los animales parasitados controles se presentó un aumento significativo ( $P < 0.01$ ) en los niveles de estradiol sérico que llegaron a estar en  $825 \pm 87$  pg/ml. En lo que respecta a los niveles de testosterona, no hubo cambio significativo en los valores encontrados entre los animales irradiados parasitados ( $1340 \pm 98$  pg/ml) y en los timectomizados parasitados ( $1260 \pm 250$  pg/ml), comparados contra los controles normales sin parasitar ( $1200 \pm 198$  pg/ml), mientras que en los controles parasitados está disminuida en 80% (Figura 4). En lo que respecta al peso de varios órganos blanco para testosterona, como son los testículos, vesículas seminales y epidídimo, es claro que la irradiación no los afecta, comparándolos con los controles normales. Sin embargo, en los controles parasitados sí se observa la disminución de peso en los órganos reproductivos previamente reportada. En lo que respecta a los animales irradiados y además parasitados, no se observa una disminución en el peso de los órganos, comparándolos contra los animales controles parasitados (Tabla II). Por otra parte, la timectomía neonatal por sí misma afecta al sistema reproductivo, ya que los controles timectomizados presentan una disminución en el peso de todos los órganos. Finalmente, el grupo timectomizado y parasitado no presenta el fenómeno de disminución del peso de los órganos encontrada en el grupo control parasitado, y tampoco hay diferencias entre el grupo control timectomizado y timectomizado parasitado.

Estos resultados refuerzan la noción de que el cisticerco directamente no afecta al testículo en la producción de esteroides, y sí sugieren, que algunos factores del sistema



**Figura 3.-** Cisticercos de la *Taenia crassiceps* recuperados de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c machos con 8 semanas de parasitosis y con diferentes tratamientos. Parasitados controles (PC), irradiados y parasitados (PI) y Trimetoprimizados y parasitados (PTx). Todos los animales recibieron agua con antibiótico *ad libitum*, y se mantuvieron bajo las mismas condiciones.

Se grafica el promedio  $\pm$  la DS de las cargas parasitarias de 10 animales para los controles parasitados, 8 animales para los controles parasitados irradiados, y 3 para los trimetoprimizados y parasitados.



**Figura 4.- Niveles séricos de testosterona y estradiol en ratones BALB/c machos sometidos a diferentes tratamientos. Controles normales (C), Parasitados controles (PC), Irradiados controles (IC), Irradiados parasitados (IP), Timectomizados controles (TxC) y Timectomizados parasitados (TxP). Los niveles de los esteroides se midieron por RIA (Larraide et al, 1988).**

**Se grafica la media  $\pm$  la DS del promedio obtenido de 10 sueros de ratón por duplicado para los primeros 2 tratamientos, 8 sueros de ratón por duplicado para los siguientes 2, y 3 sueros por duplicado para los últimos 2 tratamientos.**

Tratamiento	Neutrófilos	Leucocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
Control Normal	3897.6	4884	298	134.2	48.4
Control Parasitado	4112	12548	688	354	98
Control Irradiado	12	55	20	12	10.9
Control Timocitonizado	188	110	110	10	15.3
Parasitado Irradiado	21	65	28	8	12.1
Parasitado Timocitonizado	198	121	98	5	8.6

**Tabla 1.- Femenio leucocitario diferencial absoluta.** Las células fueron teñidas con Giemsa y visualizadas en un microscopio óptico a un aumento de 100X. Después de ser timocitonizados (3 días de edad), los animales se parasitaron a las 8 semanas de edad, para ser sacrificados después de 8 semanas de infección. Los ratones irradiados a las 4 semanas de edad, fueron tratados 1 semana antes con tetraciclina (1mg/kg de peso) en el agua, y después se irradiaron en una fuente de rayos gamma, con una dosis de 600 rads. Después de 2 semanas de recuperación, los animales se parasitaron y se sacrificaron a las 8 semanas de infección. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de 1 experimento por quintuplicado para los animales irradiados, y 1 experimento por triplicado para los animales timocitonizados. Los ratones control normales (n=10) y control parasitados (n=10) se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los grupos experimentales, y se manejaron de la misma manera.

Organo	Control Normal (mg)	Control Parasitado (mg)	Control Irradiado (mg)	Parasitado Irradiado (mg)	Control Timectomizado (mg)	Parasitado Timectomizado (mg)
Testiculos	358 ± 37.9	201.6 ± 38.6	350.9 ± 29.7	348.08 ± 18.3	288.21 ± 23.21	285.88 ± 13.21
Vesiculas Seminales	359 ± 17.4	194.3 ± 17.23	357.34 ± 46	355.67 ± 11.2	285.32 ± 35.43	287.80 ± 14.43
Epididimo	160.38 ± 11	85.56 ± 10	158.76 ± 16	158.76 ± 0.9	130.08 ± 12.43	128.23 ± 21

**Tabla II.** - Efecto de la timectomía neonatal, de la irradiación, de la parasitación con cisticercos de la *Taenia crassiceps*, y de tratamientos combinados, sobre el peso de los testículos, vesículas seminales y el epididimo de ratones macho BALB/c. Después de ser timectomizados (a los 3 días de nacidos), los ratones se parasitaron a las 6 semanas de edad. Los ratones se irradiaron con una dosis de 600 rads a las 4 semanas de edad. Estos animales fueron tratados 1 semana antes con tetraciclina (1 mg/kg de peso) en el agua, y después se irradiaron con una fuente de rayos gamma, y se dejaron recuperar por 2 semanas, y luego se parasitaron. Los animales de ambos tratamientos se sacrificaron a las 8 semanas de infección.

Los datos representan la media ± la DS de 1 experimento por triplicado para los animales irradiados y 1 experimento por triplicado para los timectomizados. Los ratones controles normales (n=10) y controles parasitados (n=10) se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los grupos experimentales.

inmune del huésped son necesarios para llevar a cabo este fenómeno de feminización. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la noción de que éste fenómeno, no es un efecto directo del parásito, sino que se da como consecuencia de la propia respuesta inmune del huésped contra el parásito, que en cambio sí afecta la actividad endócrina del macho. De esta manera, además de la propia capacidad del cisticerco para evadir a la respuesta inmune del huésped, se suma el efecto potenciador del estradiol, y entonces el parásito puede crecer igual en los machos que en las hembras. Finalmente, para establecer si este fenómeno de feminización parasitaria se produce sólo en la cepa de ratón BALB/c, o se puede generalizar en varias cepas, decidimos probar los mismos parámetros en una cepa de ratón más resistente, como lo es la cepa BALB/k. Nuestros resultados (Tabla III) demuestran que también en esta cepa resistente se produce el mismo fenómeno que en la cepa susceptible, aunque no de manera tan dramática. Estos resultados sugieren que los factores genéticos e inmunitarios del huésped asociados a la infección controlan de manera importante los eventos mediados por el parásito para producir el fenómeno de feminización, y que los niveles de testosterona pueden ser un factor importante, ya que genéticamente, la cepa BALB/k presenta un nivel mayor de testosterona que la cepa BALB/c. De cualquier manera, es bien claro que este fenómeno tiene una etiología multifactorial, y que, al parecer, la interacción inmunoendócrina juega un papel principal.

Semanas de Infección	No. de Parásitos		Estradiol (pg/ml)		Testosterona (pg/ml)		Peso de Testículos (mg)		Peso de Vesículas Seminales (mg)	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
0	0 ± 0	0 ± 0	6.2 ± 2.3	6.2 ± 6	315 ± 58	305 ± 73	0.080 ± 0.05	0.089 ± 0.1	0.081 ± 0.01	0.072 ± 0.08
1	0 ± 0	0 ± 0	6.21 ± 3.1	6.2 ± 5	368 ± 42	350 ± 78	0.102 ± 0.02	0.098 ± 0.01	0.082 ± 0.01	0.076 ± 0.02
4	0 ± 0	10 ± 2.3	7.9 ± 5.2	8.21 ± 6	688 ± 87	689.6 ± 125	0.361 ± 0.1	0.357 ± 0.08	0.0376 ± 0.06	0.387 ± 0.04
16	0 ± 0	387 ± 87	7.87 ± 1.9	421.3 ± 76	1688 ± 86	1143.7 ± 186	0.378 ± 0.82	0.237 ± 0.87	0.0388 ± 0.04	0.388 ± 0.88

**Tabla III.-** Efecto de la infección con el cisticarco de la *Taenia crassiceps* sobre diferentes parámetros endocrinos del ratón

BALB/c macho. Los parásitos se contaron directamente de la cavidad peritoneal del ratón, y los niveles séricos de estradiol y testosterona se midieron por RIA como se describió previamente (Larralde et al, 1995). Los testículos y vesículas seminales se extrajeron quirúrgicamente y se obtuvo el peso húmedo de cada órgano.

Se muestra la media ± la DS de 1 experimento llevado a cabo por quintuplicado.



## **XI. PERSPECTIVAS Y DISCUSIÓN**

La "castración parasitaria" que se produce por la infección de un huésped inmunocompetente con algún patógeno no es un fenómeno nuevo. Es bien conocido, sobre todo en invertebrados, que los parásitos usan a las hormonas del huésped para promover su propio crecimiento, y aún más, incluso lograr su propia diferenciación sexual (Kavaliers, 1985). De esta manera, los parásitos cambian el ambiente hormonal en su huésped, para que el nuevo ambiente sea favorable para su establecimiento y reproducción (Beddage, 1980). Sin embargo, en vertebrados superiores como son los mamíferos, este fenómeno de castración parasitaria no ha sido muy estudiado. Se sabe que en ratas macho infectadas con *Taenia taeniformis* y hamsters macho infectados con *Schistosoma mansoni* existe una disminución en las concentraciones séricas de testosterona, que redundan en un mejor establecimiento del parásito (Isaerof, 1980; Lin, 1980). Sin embargo, todos estos estudios han apuntado a un efecto directo de las hormonas sobre el parásito, sin pensarse a considerar el efecto que se tiene sobre la fisiología general del huésped, y que estos cambios en el ambiente endocrino del huésped puedan afectar a su función inmune. Para nuestro conocimiento, esta es la primer infección en la que se trató de demostrar un efecto inmunoenocrino que afecta el establecimiento de un parásito en un huésped inmunocompetente, que originalmente es más resistente a la infección, pero el parásito logra vencer esta resistencia inicial, y termina por invadir masivamente al macho.

Nuestros resultados demuestran que en el ratón macho la carga parasitaria aumenta considerablemente después del paso de infección aguda a crónica, y que hay una clara correlación con el cambio de los niveles séricos de esteroides sexuales (Larraide et al, 1995), que a su vez puede promover la reproducción del parásito y su mejor establecimiento. Cual es la estrategia que utiliza el cisticarco para lograr este efecto?. Al estudiar la participación del sistema inmunitario, pudimos demostrar que el fenómeno de feminización no es debido a un efecto directo del parásito, sino que requiere la participación de componentes del sistema inmunitario.

Por otra parte, demostramos también, que el fenómeno de estrogenización involucra a la enzima P-450aromataasa, ya que al utilizar un inhibidor de la misma, no se producen los altos niveles de estradiol detectados en el macho crónicamente infectado. Además, los niveles

de mRNA para la enzima están aumentados en el testículo del macho parasitado 10 veces más, comparado contra un macho normal, y llegan a ser iguales a los niveles de expresión en el ovario de una hembra. Al mismo tiempo, los niveles de expresión de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa de esteroides tipo II, que es la encargada del metabolismo normal de la testosterona en el sistema reproductivo del macho, están marcadamente disminuidos en el ratón macho crónicamente parasitado. De manera tal, que el testículo empieza a metabolizar preferencialmente la testosterona a estradiol. Este aumento importante en los niveles de estradiol redundaría en una disminución de la respuesta inmune celular tipo TH1, que es la principal encargada de eliminar al parásito (ya que al timectomizar aumentan la carga parasitaria al triple, y al reconstituir con células T y luego parasitar, hay una disminución de la carga parasitaria al nivel de un parasitado control) una potenciación de la respuesta tipo TH2, que es inocua para la eliminación del parásito (por que al inyectar el suero de un animal previamente parasitado a un animal que después se parasita, las cargas parasitarias no se modifican, y a veces, aumentan). Al mismo tiempo se establece un ciclo, en el cual al haber altos niveles de citocinas del tipo TH2, como IL-10 e IL-6 se inhibe de manera natural la inmunidad tipo TH1, y así, el parásito logra establecerse y crecer tan rápidamente como en un ambiente de hembra.

¿Cómo es que se produce esta activación de la transcripción preferencial de una enzima (P-450arom) y se inhibe la expresión de la otra (reductasa)? En la literatura, está bien documentado el efecto que tienen las citocinas sobre la actividad esteroidogénica normal (ver apéndice I de esta tesis) en los mamíferos. Sin embargo, en un huésped que presenta altos niveles de citocinas de forma permanente debido a las cargas parasitarias, este sistema de control fisiológico normal pudiera alterarse, y genes que normalmente no están activados pudieran prenderse y viceversa.

Estudios previos han logrado demostrar el efecto endócrino de la IL-6, citocina involucrada en la secreción de varios tipos de hormonas, e inclusive, en la activación de la aromatasa. Se sabe que, por ejemplo, en algunos tipos de cáncer estrógeno dependientes, la IL-6 es utilizada como un marcador particular del mismo, ya que se ha demostrado que activa la transcripción y actividad de esta enzima. Ya que nosotros pudimos demostrar 1) que hay una mayor concentración de IL-6 en el suero de los animales crónicamente parasitados, 2)

que los linfocitos de estos ratones también producen *in vitro* mucho mayores concentraciones de esta molécula (Larrañaga et al, 1985). 3) que las gónadas de los animales parasitados están infiltradas con muchas células productoras de IL-6, y 4) que al detetar el sistema inmunitario por timectomía o irradiación no se produce el fenómeno de feminización, postulamos a esta interleucina como elemento clave en el fenómeno de feminización del huésped macho. En la literatura, está reportado que ratones machos con adenocarcinoma de bazo, y cuyas células producen IL-6 de manera constitutiva, hay atrofia del sistema reproductor y son estériles (Reed, et al, 1995). Por analogía entre este fenómeno y el nuestro, el elevado nivel de IL-6 sea una de las causas por las cuales hay también problemas de reproducción en los animales crónicamente parasitados (Morales et al, 1996).

¿Es necesario todo este manejo endócrino para que el cisticerco logre parasitar al macho?. Esta pregunta fue contestada haciendo experimentos muy simples: se gonadectomizaron ratones de ambos sexos y se parasitaron. Los resultados muestran que aún sin la ayuda del estradiol, el cisticerco logra establecerse de manera importante en ambos huéspedes. Sin embargo, en los machos la carga parasitaria aumenta al triple y en las hembras disminuye, igualándose las susceptibilidades (Huerta et al,1992). De esta manera, es claro que el cisticerco tiene 2 estrategias de evasión de la respuesta inmune que no son excluyentes, y si sumatorias entre ellas. Aunque no tenga estradiol circulante el huésped (por gonadectomía) el cisticerco es capaz de evadir a la respuesta inmune encargada de eliminarlo, para establecerse, aunque el crecimiento sea más lento. Sin embargo, la presencia de testosterona detiene su crecimiento, y por lo tanto, tiene que inducir la feminización para poder crecer y establecerse tan bien como en una hembra. Estos hallazgos clarifican un poco el panorama, ya que determinan que finalmente, no es que el estradiol sea necesario para que el parásito se reproduzca, sino que la testosterona detiene su crecimiento y entonces la elimina. De forma tal, que, con altas concentraciones de estradiol circulante, el parásito se reproduce más rápidamente que con la presencia de andrógenos, y llega a alcanzar cargas parasitarias exorbitantes a tiempos muy largos de la infección. Por otra parte, en presencia de testosterona, que restringe directa o indirectamente su crecimiento, el parásito tarda mucho más tiempo en establecerse en el huésped macho inmunocompetente.

Además, dado que este fenómeno también se observó en una segunda capa de ratón, nos lleva a postular a la feminización parasitaria como una novedosa estrategia del cisticerco de la *Taenia crassiceps* para vencer la resistencia inicial del macho a la infección, y terminar estableciéndose en un huésped inmunocompetente.

En resumen, nuestros resultados en conjunto nos llevan a postular el siguiente esquema: El cisticerco emite señales positivas que estimulan preferencialmente una respuesta inmune tipo TH2 y posiblemente una señal negativa que restringe la inmunidad celular (TH1), la cual es la encargada de eliminar al parásito. A su vez, la hiperestimulación de una respuesta tipo TH2 regula también negativamente a la respuesta inmune celular, por medio de la producción de citocinas específicas. El estradiol, es una señal negativa hacia la respuesta inmune celular, pero aumenta de manera importante la respuesta humoral, además de que es una señal positiva para el crecimiento parasitario, mientras que los andrógenos (testosterona y DHT) son una señal negativa para el crecimiento del parásito, y que además estimulan directamente una mejor respuesta celular en contra del cisticerco. A su vez, la producción excesiva de IL-6 puede activar a la P-450 aromatasa, que provoca un aumento en la producción de estradiol, mientras que se produce una disminución en la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, que provoca que no haya dihidrotestosterona. De esta manera, el cisticerco logra establecerse en el macho, el cual inicialmente era resistente a la infección, haciendo un manejo inmunoendócrino (Figura 5).

Finalmente, desde el punto de vista evolutivo, este fenómeno tiene una gran relevancia, ya que se podrían explicar algunos fenómenos de infertilidad en algunas especies, buscando no causas endócrinas, sino causas inmunoendócrinas, como consecuencia de una enfermedad parasitaria crónica, que no es visible en otros ámbitos de la fisiología del huésped.

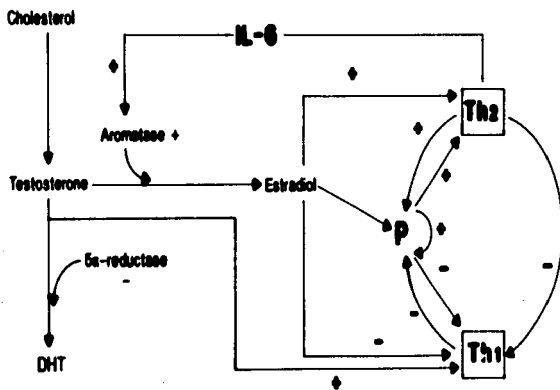
Las perspectivas son muchas: sería interesante estudiar a fondo el papel de la IL-6 en este fenómeno, determinar su efecto sobre la expresión de genes hormono-regulados, que pueden afectar fenómenos inmunitarios como la apoptosis normal del timo. Además, se puede pensar en perspectiva, y observar estos resultados como la confirmación, ya hace muchos años postulada, de que la respuesta inmune es regulada de forma multifactorial en un huésped inmunocompetente, esto es, intervienen importantemente factores no inmunitarios, como las

hormonas esteroides y proteicas, que ayudan a que una respuesta no se torne agresiva para el mismo huésped.

Se puede pensar además, que no solamente los esteroides sexuales pueden estar interviniendo en este fenómeno, si no que además los esteroides adrenales, y el estrés en general, también determinarían de manera importante este manejo del parásito en el sistema inmunitario del huésped. Dado que al gonadectomizar, no se ha quitado la fuente de esteroides adrenales, estos pudieran ser un punto clave por el cual el parásito aún sigue creciendo y reproduciéndose en ambos sexos igualmente. Así, es importante tratar de estudiar la participación de los glucocorticoides en esta infección ya que se conoce desde hace algún tiempo, que en otras infecciones (aunque no producidas por parásitos) como el SIDA, éstos provocan fenómenos de apoptosis, y transcripción de genes como *p-53*, *c-fos* y *c-jun*, los cuales sabemos están diferencialmente expresados en los animales crónicamente parasitados.

Por otra parte, el sistema inmune funciona como una extensión del sistema neuroendócrino sintiendo lo que éste no ve (como un antígeno) y avisando de la presencia extraña, respondiendo con la secreción de hormonas que regulen la magnitud de la respuesta. Entonces, al entender mejor estos mecanismos utilizando un modelo biológico *in vivo*, es posible tratar de entender mejor la manera en la cual actúan las vacunas, ya que se podría aumentar su eficacia si se considerarían estos factores del huésped. Posiblemente, una vacuna inmunomoduladora, en la cual el antígeno despierta una respuesta inmune y la hormona la dirige y regula, sea la solución a muchos problemas que tienen que ver con el control de varias parasitosis. Además, se podría especular el por qué de algunos tipos de infertilidad en individuos aparentemente sanos, los cuales no presentan los síntomas conocidos de esta enfermedad. Tal vez, en algunas especies de animales de forraje y en humanos, estos tipos de infertilidad aparentemente no explicables por causas conocidas, tengan su origen etiológico en alguna enfermedad parasitaria crónica, la cual no ha sido relacionada directamente con este fenómeno, y que provoca alteraciones inmunitarias, que a su vez, se pueden relacionar con fellos o cambios en el sistema neuroendócrino, y finalmente redundan en la disregulación de funciones tan importantes como la reproducción de los huéspedes.

Endocrinological Network  $\longleftrightarrow$  Immunological Network



**Figura 5.-** Esquema en el cual se muestran las principales interacciones inmunoendocrinas en el ratón macho durante la cisticercosis experimental murina producida por *Taenia crassiceps*.

Existe en el huésped una interacción bidireccional entre el sistema endócrino y el inmunológico. El parásito (P) produce señales negativas hacia la inmunidad celular (Th<sub>1</sub>), que es la principal encargada de su eliminación, y señales positivas a la inmunidad humoral (Th<sub>2</sub>), que es inocua, e incluso permisiva para su crecimiento. Ésta a su vez, produce citoquinas inhibitorias también para la inmunidad celular, como la IL-6, que además es una inólcueta que activa a la enzima P-450aromatasa, que provoca un metabolismo preferencial de testosterona a estradiol. El metabolismo normal de la testosterona hacia dihidrotestosterona (DHT) este inhibido, ya que la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea II se abate. Este alto nivel de estradiol en el huésped macho, a su vez es permisivo para el crecimiento del parásito, ya que actúa directamente sobre él, y además inhibe aún mas la inmunidad celular. Los andrógenos a su vez, no son capaces de actuar estimulando la inmunidad celular, y por lo tanto, el parásito logra vencer así la resistencia inicial del ratón macho a la infección, y borra entonces la diferencia en susceptibilidad asociada al sexo que se presenta en la infección aguda. De esta manera, el cicloco de la *Taenia crassiceps* logra cambiar un ambiente endócrino restrictivo (con andrógenos) hacia uno permisivo (con estradiol) para su establecimiento y mejor crecimiento (Morales-Montor et al. 1997).

## **XII. CONCLUSIONES**

- 1.- El cicloarco de la *Taenia crassiceps* es capaz de modular el ambiente hormonal sexual que lo rodea, de tal forma que quita lo que le es restrictivo para su crecimiento (andrógenos) y lo convierte a algo que le sea permisivo (estradiol).
- 2.- Los machos crónicamente parasitados pierden su comportamiento sexual normal, como consecuencia de la baja de testosterona. Este comportamiento sexual se restituye administrando andrógenos exógenamente (testosterona y dihidrotestosterona).
- 3.- Se necesita la presencia de la gónada del huésped para lograr este efecto de cambio en los esteroides sexuales.
- 4.- Este efecto se lleva a cabo por que durante la infección crónica, aumenta la expresión y actividad de la enzima P-450 aromataza testicular y se disminuye la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa de esteroides tipo II en varios tejidos del sistema reproductor del huésped macho.
- 5.- La esteroidogénesis testicular no está totalmente afectada, y el daño se produce específicamente en el metabolismo normal de la testosterona, ya que no existe cambio en la expresión de la enzima 20,22 desmolasa (que es el paso limitante en la entrada del colesterol a la esteroidogénesis) durante la infección crónica.
- 6.- La testosterona y dihidrotestosterona frenan el crecimiento parasitario, mientras que el estradiol lo favorece.
- 7.- Se necesita la participación del sistema inmunitario, para llevar a cabo este efecto de feminización durante la cicloarcoosis experimental murina producida por *Taenia crassiceps*.

- 8.- El timo es un elemento clave para producir este fenómeno, ya que al quitarlo no existe cambio en la producción de esteroides sexuales.
- 9.- Existe un fuerte daño al tejido reproductivo (testículos, vesículas seminales, epidídimo y próstata) provocado por una infiltración excesiva de células del sistema inmunitario.
- 10.- De los experimentos *in vivo* e *in vitro* concluimos que el cisticerco de la *Taenia crassiceps* no es capaz de sintetizar esteroides sexuales.
- 11.- El estradiol es suficiente, pero no necesario para lograr cargas parasitarias exorbitantes a largo plazo, ya que al gonadectomizar y quitar la mayor fuente de esteroides sexuales el cisticerco crece de cualquier manera.
- 12.- Como causa del cambio de esteroides sexuales, existe un cambio de inmunidad de tipo Th1 a Th2, ya que citocinas de este tipo de inmunidad humoral, como lo es la IL-6, son claves para una hiperactivación del P-450 aromatas.
- 13.- Durante la infección crónica hay un cambio en la expresión de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *bcf-2*, y del gen supresor de tumores *p53* que se puede producir como consecuencia de los altos niveles de estradiol circulantes.
- 14.- Como consecuencia de la expresión alterada de estos proto-oncogenes y anti-oncogenes, existe una disminución en las poblaciones de células tímicas CD3+, CD4+ y CD8+, que produce un posible perfil apoptótico del timo.
- 15.- Los resultados presentados aquí, nos introducen una nueva estrategia parasitaria original no reportada anteriormente de colonización del huésped por el parásito, ya que este fenómeno se presenta en 2 cepas distintas de ratones.



## **XIII. APÉNDICES**

## REGULACION DE LA ESTEROIDOGENESIS GONADAL POR LINFOCINAS

Jorge Martínez Montor y Luis Ignacio Terraza. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. A P 70220 México, D F, 04510 México.

### RESUMEN

La regulación de la esteroidogénesis gonadal es regulada por medio de la comunicación directa y bidireccional entre los sistemas inmunológico y neuroendócrino. Las linfoquinas juegan un papel primordial en esta interacción y a su vez su producción es influenciada por acción directa de hormonas y neurohormonas sobre las células inmunológicas. En este artículo se discute la acción de algunas de las principales linfoquinas producidas por el sistema inmunológico sobre la regulación de la esteroidogénesis gonadal (ovario y testículo) y se resume lo que se conoce para cada una de ellas.

**PALABRAS CLAVE:** linfoquinas, interleucinas, esteroidogénesis, gonadal, interacción inmunoadócrina.

### ABSTRACT

Gonadal steroidogenesis regulation is achieved through the bidirectional communication between immunological and neuroendocrinological systems. Cytokines play a relevant role in this interaction, and in turn their production is influenced by a direct action of hormones and neurohormones on immunological cells. In this review, recent evidence is presented that indicates that gonadal steroidogenesis (ovary and testis) is influenced by cytokines.

**KEY WORDS:** cytokines, interleukins, gonadal steroidogenesis, immune-endocrine interaction.

### INTRODUCCION

En años recientes, la interacción de los sistemas de un organismo para regular su homeostasis ha sido un tema que ha cobrado mucho interés. En este punto,

no ha quedado excluida la interacción que existe entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico. Esta interacción, que se ha documentado adicionalmente en poco tiempo, es bidireccional y se conoce hasta la fecha diversas sustancias solubles que son producidas por los tres sistemas y que actúan a nivel de varias células blanco por medio de receptores específicos y muchas veces comunes para diversos tipos celulares (1).

Entre estas sustancias solubles, podemos mencionar por parte del sistema nervioso a los neurotransmisores clásicos (como histamina, dopamina, serotonina y acetilcolina), que actúan a nivel de diversas células inmunológicas estimulando o inhibiendo una función determinada. Por parte del sistema inmunológico, mencionamos a las linfoquinas e interleucinas, que son producidas solubles producidos por linfocitos y macrófagos ante un estímulo externo y que a su vez pueden modificar el funcionamiento del sistema nervioso y endócrino actuando sobre diversos tejidos blanco, de forma autócrina, parácrina y endócrina (1,2). Por parte del sistema neuroendócrino, existen dos diferentes tipos de hormonas que tienen diversos efectos sobre el sistema inmunológico: las hormonas peptídicas y los esteroides (2).

Estos dos tipos hormonales han sido ampliamente estudiados. Se sabe que son capaces de regular la secreción diferencial de interleucinas, promover la síntesis de anticuerpos, el cambio del isotipo de inmunoglobulinas, inhibir la expresión de antígenos del MHC, la expresión del receptor de células T, la maduración de linfocitos T, la expresión de moléculas de adhesión celular y por lo tanto la adhesión de las células para su comunicación, además de otras funciones que están por establecerse (2,3,4). Tal vez el más interesante avance conceptual que surge de

muchos de estos estudios de comunicación neuroinmunoendocrina en la idea de que una de las principales funciones del sistema inmunológico es la de ser un órgano sensor interno. Se ha propuesto, que el sistema inmune puede sentir estímulos que no son reconocidos por el sistema nervioso central y periférico. Estos estímulos se han denominado no cognoscitivos e incluyen aquellos fenómenos (como la presencia de bacterias, tumores, virus y antígenos en general), que podrían no ser sentidos por el organismo si no fuera por el sistema inmunológico. El reconocimiento de tales estímulos no cognoscitivos por inmunocitos es entonces convertido en información, en la forma de hormonas peptídicas, linfocinas e interleucinas que estimulan al sistema neuroendócrino, lo que lleva a cambios fisiológicos (2,3). En contraparte, el reconocimiento cognoscitivo de estímulos por parte del sistema nervioso central y periférico resulta en información neurohormonal que es reconocida por los receptores en inmunocitos y entonces ocurre un cambio inmunológico (3,4). Así, parece ser que la función sensora del sistema inmunológico estimula al sistema neuroendócrino en términos de que un estímulo dado, evoca una combinación particular de hormonas que resulta en cambios y respuestas fisiológicas (4). Si esto es el caso, entonces las patologías que se asocian a un agente infeccioso particular, antigeno o tumor, podrían en parte estar relacionadas con el juego particular de hormonas que son producidas por el sistema inmune.

De esta forma, si la homeostasis interna del organismo es está alterada, el sistema nervioso es notificado por medio de la comunicación química de interleucinas y linfocinas, estimulando a respuesta al sistema inmunológico y una vez controlada la falla, el sistema neuroendócrino responde produciendo hormonas y neurohormonas para regular esta respuesta inmunológica lo que evita se torne agresiva para el organismo. De esta manera, el sistema inmunológico no sólo regula la magnitud de su respuesta a un estímulo antigénico por medio de señales intrínsecas de sus propias células, como son la secreción de linfocinas e interleucinas y la red idiotipo-antidiotipo, sino que recibe señales extrínsecas por parte del sistema neuroendócrino para regular la magnitud de su respuesta (5,6). De forma análoga, se sabe que las sustancias del sistema

inmunológico como el TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, los interferones (en especial  $\alpha$ -IFN y  $\gamma$ -IFN) y hormonas tiroideas regulan la secreción de diversos productos de glándulas neuroendocrinas, como son la secreción de factores liberadores en hipotálamo (CRF, TRH, GnRH), la secreción de hormonas peptídicas en hipofisis (prolactina, melatonina, ACTH, gonadotropinas), la secreción de las glándulas suprarrenales (glucocorticoides) y la secreción de las hormonas reproductivas en las gónadas (estradiol, progesterona y testosterona) (1,2,3,4,5). También las células del sistema neuroendócrino son capaces de producir citocinas (la hipofisis produce IL-6, IL-1 e interferón (6)) y a su vez las células inmunológicas tienen capacidades de células endócrinas (los macrófagos tienen capacidad de metabolizar testosterona e dihidrotestosterona). Por otra parte, las hormonas sexuales juegan un papel regulatorio en las respuestas inmunológicas humorales y celulares, las cuales en cambio pueden afectar los niveles hormonales. La regulación de que las células germinales puedan jugar un papel importante en la respuesta inmune, está basada en varias bases: diferentes en el nivel de respuesta inmune entre machos y hembras, cambios en la respuesta inmune durante el embarazo, el cambio en la respuesta inmune observado después de la gemelización y el reemplazamiento con hormonas sexuales y la presencia de receptores para algunas hormonas germinales en órganos linfoides y células inmunes circulantes (3,4,5).

Las linfocinas son polipeptidas solubles liberadas de células del sistema inmunológico, principalmente macrófagos y células T activadas, las cuales son liberadas durante estados inflamatorios y da respuesta a un estímulo antigénico, actuando como coordinadores de respuesta local, además de ejercer su efecto sobre un número amplio de tejidos de una manera endócrina (2). Las linfocinas tradicionalmente se han dividido en varios factores específicos producidos por un tipo de linfocitos o alguna otra célula inmunológica con base en su acción en interleucina, y de acuerdo al orden en el cual han sido descubiertas se enumeran del 1 al 12 (que son las que se conocen hasta la fecha). En la tabla I se enlistan las linfocinas que tienen efecto endócrino conocido, su peso molecular aproximado con base en la secuencia de aminoácidos y las células que las producen.

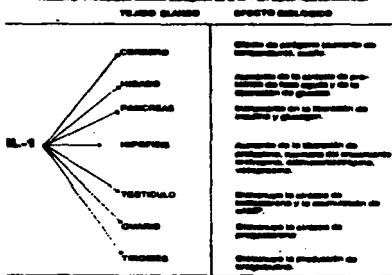
Tabla 1.- Principales efectos que tiene el IL-1 sobre el sistema reproductivo.

EFECTOS	P.M. (mg)	ESTRADIOL PRESENTADO	TIEMPO MEDIDO (DÍAS) DESPUÉS DE LA INYECCIÓN
IL-1	17,200	1000000	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-2	10,000	Leydig y Anastrolo	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-3	10,000	Leydig y LH	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-4	10,000	Leydig y LH	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-5	20-25,000	Leydig y LH	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-6	10-25,000	Leydig y LH	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-7	20-25,000	Leydig y LH	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100
IL-8	17,200	1000000	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100

### INTERLEUCINA 1 (IL-1)

La producción de IL-1 se incrementa durante la fase aguda de una infección en respuesta a un antígeno, a toxinas bacterianas y al daño a un tejido. La IL-1 media respuestas inmunes en la enfermedad, incluyendo fiebre, sueño, leucopenia neutrofila, efectos de protección de fase aguda y cambios endocrinos, como una liberación incrementada de insulina, glucagón, hormona de crecimiento, prolactina, ACTH, TSH, y vasopresina (Tabla II) (7). Esta linfocina inhibe en el ovario la producción de progesterona, por un efecto directo sobre la enzima 20 $\alpha$  y 22 $\beta$  esteroides hidroxilasa (P450 $\alpha$ ), que estimula la transformación del colesterol a pregnenolona siendo ésta la vía de entrada del colesterol a la esteroidogénesis. Este efecto de la IL-1 se debe a la disminución del RNAm que transcribe esta enzima, además de modificar la afinidad de la enzima por su sustrato (8,9). Sobre células de Leydig tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona, disminuyendo la acción enzimática de la 17 $\beta$ -hidroxisteroides deshidrogenasa, que cataliza la conversión reversible de androstendiona a testosterona, compitiendo por el sitio de unión de la enzima con su sustrato, ya que el exceso de precur-

Tabla 2.- Principales efectos fisiológicos de la IL-1 en el sistema reproductivo.



sor restaure la actividad (8). También se sabe que disminuye la producción de AMPc en respuesta a hCG en células de Leydig, inhibe la síntesis de testosterona estimulada por esta hormona (9).

### INTERLEUCINA-3 (IL-3)

La IL-2 es un factor producido por los linfocitos T activados, que actúa sobre el crecimiento y diferenciación de los células T en forma autorina y estimula a los macrófagos. Aumenta la actividad enzimática in vitro de las células macrófagos purificadas estrogénicas e induce la formación de células T citotóxicas (NK) y células eliminadoras activadas por linfocitos (LAK). Administrada a largo plazo a ratas, eleva los niveles de ACTH después de intervalos largos de tiempo. La IL-2 es un potente inhibidor tanto de la esteroidogénesis estimulada por hCG como de la formación de AMPc en células de Leydig. Dado que bloquea la producción de testosterona inducida por forskolina y 8-bromo-AMPc, la producción de pregnenolona, progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y no tiene efecto sobre la producción de dehidroepiandrosterona y androstendiona, la enzima específica que inhibe es la 17 $\alpha$ -hidroxilasa (10). Además, la adición de colesterol no revierte el efecto, por lo que también el P450 $\alpha$  puede estar afectado. Esto sugiere que el efecto de la IL-2 es

específico sobre el sistema enzimático esteroideogénico y no se debe a la toxicidad de la molécula sobre las células (11). La forma en la cual se da este efecto, podría ser impidiendo el reconocimiento estérico de las enzimas por su sustrato, ya que la IL-2 puede modificar el sitio de unión de manera no competitiva irreversible. Por otra parte, en los macrófagos, es capaz de estimular la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, aumentando la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (12).

### INTERLEUCINA-3 (IL-3)

Es una linfoquina que participa en la inmunidad celular, siendo secretada por las células T ayudadoras (Th1). Promueve la generación ante una invasión microbiana, de neutrófilos monocitos y macrófagos en el lugar de la infección. También estimula los mecanismos de descarga respiratoria y fagocitosis de estas células. Se sabe que directamente sobre los linfocitos T provoca una actividad enzimática exclusiva de las células esteroideas: aumenta la actividad de la 20 $\alpha$ -hidroxisteroide deshidrogenasa. En células ováricas en cultivo, provoca un aumento en la producción de progesterona, estimulando la 3 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa (12).

### INTERLEUCINA-6 (IL-6)

Esta linfoquina es un factor de diferenciación de las células B y es producida por células T, aunque se sabe que puede ser producida por una gran variedad de células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, monocitos, células hipofisarias e hipotalámicas. Se incrementa en la respuesta de fase aguda, es un factor de crecimiento de células hematopoyéticas e incrementa la proliferación de las células T (Th2). Es sinérgica con la IL-1 y puede ser mediadora indirecta de algunas de las acciones de esta última. Se conoce que existen receptores a la misma en tejido neuroendocrino y su unión modifica la respuesta de estas células. Sobre la esteroideogénesis, la IL-6 tiene un efecto estimulatorio en la producción de estradiol, ya que puede estimular la aromatización de la testosterona a estradiol, aumentando la actividad de la enzima P-450 aromatasa en células de cáncer mamario en cultivo. Por otra parte, en cultivo de células de la granulosa, la adición de IL-6 y testosterona provocan la aparición de altos niveles de estradiol en pocas horas, los

cuales no se producen con la sólo adición de testosterona en el mismo lapso de tiempo.

De esta forma los posibles blancos enzimáticos de la IL-6 son las siguientes enzimas: estimula a la P-450cc y la 3 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa estimulada por FSH, aumenta la capacidad de la P-450 aromatasa (P-450 arom) sin conocerse exactamente cual es su mecanismo de acción (13).

### INTERFERONES ( $\alpha$ -IFN y $\gamma$ -IFN)

En años recientes, ha quedado establecido que los interferones (IFNs) no sólo son un importante mecanismo de defensa del huésped en contra de infecciones virales y resistencia a tumores, sino que además regulan algunos procesos fisiológicos normales y tienen muchas otras acciones biológicas que son compartidas por los 3 tipos de IFN que existen (Figura 1). Los IFNs han sido detectados en el fluido

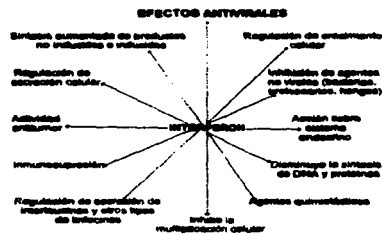


Figura 1. Diferentes efectos biológicos que producen los diversos tipos de interferón ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) conocidos. Como se puede observar, tienen efectos sobre una amplia gama de sistemas en mamíferos, por lo que se piensa son una molécula importante en la regulación de varias funciones fisiológicas. De esta manera, son un mediador principal de la comunicación inmunomoducina.

amniótico humano y la placenta de murino, o aún en la ausencia aparente de infección viral o de cualquier otro tipo. Se ha sugerido su participación en la regulación del desarrollo fetal, o bien en la inmunoregulación de la aceptación del producto por

la madre. Se conoce que sobre el sistema endócrino los IFNs tienen una amplia gama de funciones (Tabla III).

Los IFNs tienen acción directa sobre la esteroidogénesis gonadal, ya que se ha encontrado que el tratamiento con  $\alpha$ -IFN reduce las concentraciones séricas de progesterona y estradiol, sin un cambio aparente en los niveles de LH y FSH. El  $\alpha$ -IFN inhibe la conversión estimulada por FSH de testosterona a estradiol por las células de Sertoli en cultivo. El pretratamiento de las células de Leydig con  $\alpha$  y  $\gamma$  IFN suprime la subsecuente producción de testosterona estimulada por hCG en forma dosis-dependiente. En células de Leydig de porcino el tratamiento con  $\alpha$  o  $\gamma$  IFN disminuye la esteroidogénesis y si el tratamiento es combinado el efecto es sumatorio. En otros sistemas se ha demostrado que la inhibición gonadal se da porque los IFN son capaces de inhibir la acumulación de RNAm que codifica las enzimas que rompen el carbono lateral de la cadena de colesterol (P-450<sub>scc</sub>) y la que rompe en el carbono 17 (P-450<sub>c17</sub>). También se ha demostrado que impiden la fijación del sustrato (colesterol) por la enzima sin modificar su estructura. En ovarios disgregados en bioensayo, el  $\alpha$ -IFN inhibe en una forma dosis dependiente y temporal, la producción tanto basal como estimulada por hCG de testosterona y estradiol. El efecto de inhibición por el  $\alpha$ -IFN se debe a que impide la captación del sustrato (colesterol) por la enzima 17 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa y la acumulación del RNAm del P-450 aromatasa (P-450 arom) 1 y 2. Se ha demostrado que el  $\gamma$ -IFN puede estimular en testículo la esteroidogénesis, aumentando la actividad de la 17 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa y de la 5 $\alpha$ -reductasa (11, 12, 14).

#### FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (TNF- $\alpha$ )

El TNF- $\alpha$  es una molécula producida por los macrófagos en respuesta a una transformación tumorigénica en el organismo. Se parece en muchos de sus efectos a la IL-1, pero no son homólogos, ya que posee su propio receptor y no actúa directamente a los linfocitos. La inyección de la citocina causa fiebre, hipotensión, respuesta a proteínas de fase aguda, inhibición de lipasas y liberación de hormo-

Tabla III: Acción endocrina de los diferentes tipos de interferón. Cómo los IFNs actúan sobre el eje hipotálamo-hipofisiario y en presencia de otros factores como el sistema endocrino materno.

GLANDULA	EFFECTO ENDOCRINO	TIPO DE INTERFERÓN
Testículo	Inhibe la liberación de LH en células de Leydig Disminuye la conversión estimulada de T4 a E2 por células de Sertoli en cultivo Inhibe las esterificaciones séricas de T4 Inhibe la producción de mRNA que codifica para las enzimas P-450 aromatasa y P-450 scc	$\alpha$ -IFN $\gamma$ -IFN
Ovarios-ovocitos	Incrementa las concentraciones de estradiol Incrementa los niveles de ACTH	$\beta$ -IFN $\gamma$ -IFN
Testículo	Inhibe la producción de hormona luteal Baja las concentraciones séricas de T4 Inhibe la producción de mRNA de T3 por T4 en presencia de hormona de crecimiento	$\beta$ -IFN $\gamma$ -IFN
Ovarios	Incrementa la producción de progesterona e inhibe en parte la producción de estradiol	$\beta$ -IFN

T4 = Tetraesterona E2 = Estradiol ACTH = Hormona adrenocortical de T4 de Hormona secretada de la hipófisis T3 = Triesterona

nas de estrés. En el ovario, se ha encontrado que produce alteraciones complejas dosis-dependientes, en la síntesis de progesterona y de androstendiona, pero no de estrógenos. En células de Leydig promueve la conversión de testosterona a dihidrotestosterona. Es interesante hacer notar que el TNF- $\alpha$  inhibe la diferenciación dependiente de gonadotrofinas de células de granulosa murinas aisladas. Por lo anterior, los blancos enzimáticos de esta molécula son: a nivel de la P-450<sub>scc</sub> y P-450<sub>c17</sub> inhibe su actividad en ovario, mientras que en testículo aumenta la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa. (11,15).

En resumen, la regulación tanto ovárica como testicular de la producción de sus principales esteroides depende no sólo de la compleja regulación endócrina normal del eje hipotálamo-hipofisiario, sino que ahora se agregan otras células más: los linfocitos (B y T), los monocitos, macrófagos y varios representantes de la estirpe leucocitaria que son residentes normales del ovario y del testículo y que por medio de la secreción de interleucinas regulan la esteroidogénesis gonadal (Fig 2).

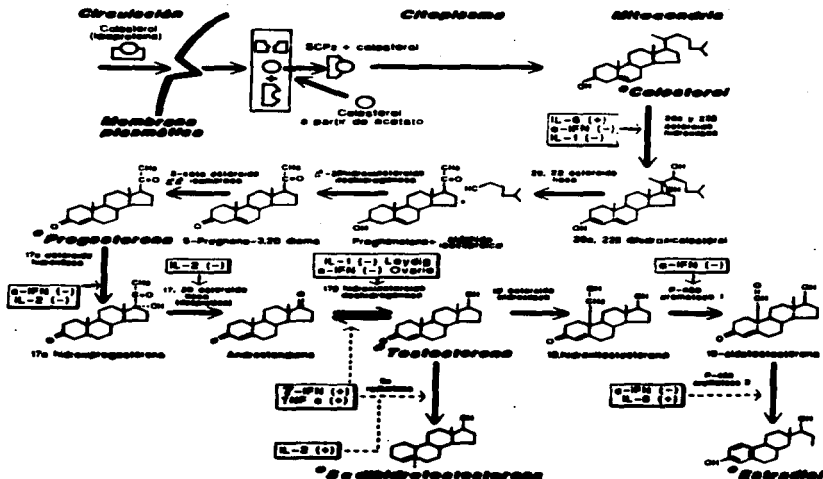


Figura 2. El colesterol puede ser tomado del medio extracelular de dos posibles fuentes: de la circulación como tal, en forma de lipoproteína, o ser sintetizado de nuevo a partir de acetato. Una vez en la célula, el colesterol es degradado en un grupo primario en el litonano y aceptado para ser transportado a una proteína transportadora (SCP) o hemisuccinato. Una vez ahí, mediante la acción en cascada de varios sistemas enzimáticos, se biosintetizan a las diferentes esteroideas muchas más activas: progesterona, androstenediona, dihidrotestosterona y testosterona. Se muestran los sitios de acción de las diversas esteroideas que se muestran tienen efectos sobre la biosíntesis general. Aquellas que tienen un efecto estimulador, se marcan con un signo (+), mientras que las inhibidoras se marcan con un signo negativo (-). Como se puede observar, la red de esteroideas reguladoras sobre la formación de esteroideas reactivas no se circunscribe sólo a hormonas y neurotransmisores, sino que se agregan un nuevo tipo de reguladores: citoquinas y reguladores del sistema inmunológico.

## REFERENCIAS

1. Bleekert J E (1989) A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 69: 1-32.
2. Kennedy RL y Jones TM (1991) Cytokines in endocrinology: their roles in health and in disease. *J Endocrinol* 129: 167-178.
3. Anar-Ahmed S, Pothole J y Tatal N (1985) Sex hormones, immune response and autoimmune disease. *Am J Pathol* 127: 551-551.
4. Greenman C J (1991) Sex steroid regulation of autoimmunity. *J Steroid Biochem Med Biol* 40: 649-659.

5. Shivers A H W M y Virelani A M (1988) Effects of gender and sex steroids on immune response. *J Steroid Biochem* 53: 157-172.
6. Buzzotti R, Mc Loughlin, L, Savoia, D y Reza, L M (1989). A critical assessment of the interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinol Rev* 10: 183-187.
7. Dunn, A J (1988) Interleukin-1 as a stimulator of hormone secretion. *Prog Neuro Endocrin Immunol* 3: 26-34.
8. Fukuzaki M, Mori T, Taki S, Yamada K (1988) Interleukin-1 inhibits luteinization of precursors granulosa cells in culture. *Endocrinol* 122: 367-369.
9. Khan S A, Schimdt K, Mollin P, Di Pauli R, De Geyer Ch y Muehling K (1988) Human testis cytotidal and ovarian follicular fluid contain high amounts of interleukin-1. *Life Science(s)*. *Int J Cell Endocrinol* 58: 221-230.
10. Hong Gon J, Harrington C, Siegel M y Lin T (1988). Interleukin-2 is a potent inhibitor of Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinol*. 127: 1233-1239.
11. Wayne A, Cardozo J, Danzato N, Bishop K y Szankowsky W E (1992). Direct and indirect effects of murine interleukin-2, gamma interferon, and tumor necrosis factor on testosterone synthesis in mouse Leydig cells. *J Androl* 13: 437-443.
12. Garago, C W y Kawan, B G (1986) Lymphokines from concanavalin-A-stimulated lymphocytes regulate rat granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *Endocrinol* 123: 2462-2471.
13. Garago C W, Hughes M F y Spangiol, B L (1992) Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinol* 130: 1750-1752.
14. Orava, M (1991) Tuusula Doctoral, Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia.
15. Ruby K F y Turunen P F (1988) Tumor necrosis factor alpha alters follicular steroidogenesis *in vitro*. *Endocrinol*. 123: 2952-2954.

## ELABORACION DE PROTOTIPOS PARA EL USO CREATIVO DE LA COMPUTADORA EN LA DOCENCIA DE LA BIOQUIMICA.\*

Luzmar Fernández Rivera Ríos. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM. Apdo Postal 70-159, CP 04518, México D.F. Teléfono 633 2170, FAX 616 3419.

### RESUMEN

La enseñanza de la Bioquímica es básica porque esta ciencia forma parte del currículum de muchas carreras en el área médico-biológica. En los últimos años, la Bioquímica se ha desarrollado enormemente y a paralizado el avance de otras disciplinas y tecnologías. La enseñanza de la Bioquímica es difícil porque es un conocimiento abstracto que se vale del uso de modelos para facilitar su comprensión y porque los alumnos tienen diferentes habilidades para manejar información. El uso de Instrucción Asistida por Computadora (IAC) podrá ayudar a los estudiantes en el aprendizaje de la Bioquímica por-

que permite la simulación y la representación gráfica de muchos fenómenos. En este trabajo se presentan los avances alcanzados en el diseño de «Los Aminocidos», que es un prototipo para la enseñanza de la Bioquímica asistida por computadora; este tema fue tomado del Plan de Objetivos del Curso de Bioquímica que se imparte durante el primer año de la Carrera de Médico Cirujano de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### PALABRAS CLAVE

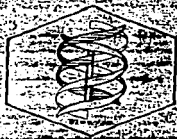
Enseñanza asistida por computadora, bioquímica, aminocidos, simulación.

\* Trabajo Presentado durante el II Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC.



# BM 95

BOLETIN DE LA ASOCIACION QUIMICA



Asociación Mexicana de Químicos  
DE LA ASOCIACION QUIMICA DE MEXICO  
ASOCIACION QUIMICA A.C.

Se publica en colaboración con el Centro de Información  
y Estudios Científicos de la Universidad Nacional  
Autónoma de México (CICEN-UNAM) PERIODICA  
de la Asociación Mexicana de Químicos en Ciencias

VOL. 21

MARZO 1995

## MECANISMOS DE EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE POR PARASITOS

Jorge M6rcos Monter. Departamento de Inmunologia, Instituto de Investigaciones Biom6dicas, Universidad Nacional Aut6noma de M6xico. A P 70326 M6xico, D F 04510 M6xico.

### RESUMEN

Durante su ciclo de vida, muchos parásitos intracelulares y extracelulares de vertebrados presentan diversos estadios, que culminan con la aparición de la fase infecciosa. Para poder sobrevivir en un ambiente inmunológicamente hostil dentro del huésped, éstos han desarrollado diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica del mismo, lo que culmina con el establecimiento definitivo y la reproducción del parásito. En esta revisión, se discuten algunos de los diversos mecanismos que utilizan los parásitos para evadir la respuesta inmunológica del huésped, diferenciando los mecanismos evasivos durante su fase extracelular, durante su entrada a la célula y durante su fase intracelular.

**PALABRAS CLAVE:** evasión parasitaria, estadios del desarrollo, respuesta inmune, huésped, mecanismos.

### ABSTRACT

During their life cycles, many intracellular and extracellular parasites in vertebrate hosts have different developmental stages, culminating with the establishment of the infective phase. In order to survive in an hostile immunological environment inside the host, the parasites have developed many mechanisms to evade the immunological response and culminate with their definitive establishment and reproduction. In this review, some of the mechanisms used by parasites to evade the initial resistance of the host to the infection, and how they are able to mask the initial immunological response of the host establishing their reproductive stage and producing the disease, are discussed.

Here, a differentiation is made of the mechanisms used by parasites to evade immunological responses during their extracellular stage, during their entrance to the cell, and during their intracellular phase.

**KEY WORDS:** parasitic evasion, developmental stages, immune response, host, mechanisms.

### INTRODUCCION

La responsabilidad de la defensa del huésped durante un periodo largo de infección recae sobre una serie de reacciones en cascada, tanto locales como sistémicas que son moduladas por factores humorales y coordinadas por los fagocitos. La piedra angular de estos procesos no específicos es la respuesta inflamatoria y los mecanismos efectores de los macrófagos y los linfocitos T citotóxicos y auxiliares (TH1 y TH2), apoyados por la respuesta de proteínas de fase aguda y la cascada del complemento (1).

En el sitio de la infección hay una reactividad local incrementada que al menos cumple 3 funciones: 1) limita la migración del parásito hacia otros tejidos 2) facilita el acceso de células inflamatorias a los tejidos infectados y 3) desata una serie de reacciones sistémicas interconectadas, que resultan en un aceramiento en el metabolismo del huésped. Estas reacciones sistémicas incluyen fiebre, leucocitosis, la estimulación de la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y la activación de los mecanismos microbicidas por los leucocitos, como la descarga respiratoria y la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos (2).

Los determinantes de la virulencia que permiten la evasión de tales mecanismos están a menudo regulados en los parásitos en una forma que depende de su estado de desarrollo, que representa una adaptación para sobrevivir en un medio inmunológicamente hostil dentro del huésped. Tal vez, la característica más distintiva de las infecciones parasitarias es su cronicidad, que refleja la adaptación inusual que estos organismos han llevado a cabo y que les permite vivir dentro de los hospederos vertebrados y evadir sus respuestas inmunológicas. La

estimulación antigénica constante que resulta de la infección crónica a menudo lleva a la polarización de subpoblaciones diferentes de células T y a estados inmunorregulatorios prominentes. Se piensa que estos estados inmunorregulatorios (a menudo inmunosupresores) son inducidos "deliberadamente" por los parásitos para promover su propia sobrevivencia. Una segunda característica importante es la diversidad biológica de los diferentes parásitos y sus huéspedes, los cuales en cambio, llevan a distintas formas de presentación antigénica y de activación de células T. El número de especies diferentes de presentación antigénica es extenso y abarca desde protozoistas intracelulares que disuven tejidos, como *Toxoplasma gondii* que induce respuestas potentes de células CD4<sup>+</sup> TH1 y CD8<sup>+</sup>, hasta los helmintos multicelulares del tracto digestivo que provocan respuestas fuertes CD4<sup>+</sup> TH2 (1). Los parásitos intracelulares en su fase extracelular evaden el complemento y se ha encontrado que muchos de ellos usan factores derivados del huésped para facilitar su unión y entrada en las células permissivas del huésped. En general, parece que la naturaleza selectiva de la unión de algunos componentes ácidos a la superficie del parásito influencia el mecanismo de entrada a la célula y puede determinar si el microorganismo sobrevive o no después de dicha entrada (1 y 2).

Así pues, los mecanismos empleados por los parásitos para evadir la respuesta inmunológica del huésped o contrarrestar sus defensas son variados. El más sencillo es la exclusión aséptica, que simplemente se da cuando se alojan en alguna región aséptica en donde la respuesta inmune sea muy débil. Otro medio, más efectivo que el anterior, es el esquematisamiento, practicado por *Trichinella spiralis*, *Entamoeba histolytica* y algunos odocodos. Sin embargo, más que esconderse del sistema inmune, los parásitos han desarrollado verdaderos mecanismos moleculares más complejos de evasión de la respuesta inmunológica, que se detallarán a continuación.

#### MODIFICACION DE LA ANTIGENICIDAD

Uno de los mecanismos evasivos más estudiados que emplean los parásitos es el de modificación constitutiva de su superficie que evita las respuestas potentes que pudiesen eliminarnos en corto tiempo. Los parásitos han desarrollado de esta forma tres mecanismos:

- A) El enmascaramiento antigénico
- B) La variación antigénica
- C) El cambio antigénico

El enmascaramiento antigénico consiste en la adquisición y presentación de antígenos del hospedero por parte del parásito. Un ejemplo es *Schistosoma mansoni* que llega incluso a presentar en su superficie moléculas análogas a las del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) del hospedero. Dado que en el genoma del esquistosoma no hay genes análogos a los del MHC del hospedero, es forzoso que adquiera estas moléculas del animal que parasita.

Otra variación del enmascaramiento antigénico es el mimetismo molecular. Dada la fuerte presión selectiva que ejerce el sistema inmune del hospedero sobre el parásito, es razonable suponer que algunos antígenos superficiales mutantes del mismo hayan sido seleccionados por parecerse a diversos componentes del hospedero (3). La relevancia de este mecanismo no ha sido dilucidada completamente, pero se supone que está relacionado con algunos tipos de autoinmunidad. Parte de la controversia que despierta este mecanismo se basa en afirmaciones de que las moléculas del parásito, similares a las del hospedero, son muy inmunógenas, lo que podría representar un alto costo para su mantenimiento. Alternativamente se explica lo anterior diciendo que estas moléculas se conservan, pues cumplen una función vital. Incluso se postula que el parásito emplea este mecanismo no sólo como medio de defensa, sino como medio para modificar la respuesta inmune de su hospedero.

La variación antigénica, es sin duda, el mecanismo de evasión inmune mejor estudiado. Se notan diferencias estructurales en los principales epítopos superficiales en distintos niveles biológicos. Primeramente, entre distintas cepas de parásitos (sobre todo protozoistas) se observan variaciones importantes en su antigenicidad. Esta variación entre cepas, se piensa que promueve la supervivencia de distintas especies de parásitos, al permitir infecciones múltiples o prevenir el desarrollo de una inmunidad específica. Se ha estudiado la variabilidad antigénica de los cisticercos de *Taenia crassiceps* y se encontró una alta variación en los epítopos compartidos por los mismos. La variación antigénica es más notoria aún durante el desarrollo ontogénico de

los parásitos. En varios casos se ha documentado la expresión de antígenos específica de estadio. Por ejemplo, los estadios infectivos de los protozoos *Plasmodium vivax* y *Trypanosoma cruzi* presentan antígenos superficiales diferentes a los que muestran en etapas posteriores de su desarrollo (4). En los tripanosomas africanos la variación antigénica ha adquirido una complejidad y efectividad asombrosa, pues sus antígenos superficiales principales presentan una variación continua y de esta forma no sucumben nunca a los anticuerpos que inducen.

El recambio antigénico se refiere a la capacidad que tienen algunos parásitos para renovar constantemente sus antígenos superficiales, evitando de esta forma ser un blanco lo suficientemente visible por un tiempo para ser detectado como invasor dentro del hospedero. Esto se ha demostrado en experimentos en los cuales el suero de animales con diferente tiempo de infección con *Trypanosoma cruzi*, no son capaces de reconocer las mismas bandas de un lisado de parásitos obtenido durante un solo periodo de infección. Este mecanismo se ha visto favorecido en parásitos extracelulares que están en constante confrontación inmunológica con las células del hospedero. El cisticerco de la *Taenia crassiceps* y de la *Taenia solium* son ejemplos de este tipo de mecanismo evasivo de la respuesta inmune.

#### COMPONENTES DEL SUERO QUE AYUDAN A LA ENTRADA DEL PARASITO A LA CELULA

##### El sistema del complemento

El complemento (C) es un sistema biológico complejo, presente en todos los mamíferos y constituido por 30 integrantes diferentes. Todos ellos son glicoproteínas; 20 se encuentran como moléculas solubles en varios líquidos biológicos, principalmente en el plasma, los 10 restantes son receptores que forman parte integral de la membrana de diversas células de la sangre.

El C es un amplificador de la respuesta inmunológica y su activación, que es autorregulada, se inicia de dos maneras: en la vía clásica se requieren los complejos antígeno-anticuerpo y, en la vía alterna, los activadores de origen y naturaleza química diversos no requieren anticuerpos específicos. Ambas vías tienen características propias y comunes, por ello algunas de sus funciones son idénticas.

Las actividades del C son múltiples: es el mediador humoral más importante de la inflamación y de la resistencia no específica contra infecciones microbianas; puede neutralizar a ciertos virus; actúa como opsonina, provoca la lisis de un gran número de células, microorganismos y parásitos.

La distribución de componentes específicos del complemento sobre la superficie parasitaria puede promover la inserción de alta afinidad con los receptores de la superficie de la célula del hospedero. Se conoce que los receptores para C1q, C4b/C3b (CR1 o CD35), C3bi y C3d son mediadores de la unión de varios sustratos opsonizados con un ligando, que incluyen microorganismos, lo que facilita su internalización celular.

La fibronectina (Fn) es una opsonina no relacionada con el complemento, que aumenta la internalización de tripanomastigotos de *Trypanosoma cruzi*, tanto en células fagocíticas como en no fagocíticas y estimula la unión de *Leishmania* spp a los monocitos de humanos. Pero, sobre todo, la unión de Fn a su receptor puede alterar el potencial fagocítico de otras receptores de la superficie celular. Por lo tanto, la unión del parásito a la Fn puede estimular su entrada a las células, por medio de la interacción con otras proteínas del suero o constituyentes de la matriz extracelular (a los cuales se une la Fn). También puede alterar funciones de los receptores de la célula hospedera.

##### Evasión de la lisis mediada por complemento (extracelular)

En general, los mecanismos de evasión de la lisis por complemento pueden ser agrupados en 3 categorías:

1. Fallas en la activación del sistema.
2. Fallas en la opsonización del patógeno.
3. Fallas en la lisis del patógeno.

La resistencia de *Leishmania* al complemento está regulada por sus diversos estadios de desarrollo; mientras que los promastigotos avirulentos son susceptibles a la lisis mediada por el complemento, los infectivos no lo son. Debido a estas diferencias en susceptibilidad, todos los estadios del desarrollo de *Leishmania* activan el complemento eficientemente y unen a C3, pero la forma y el destino de la unión depende de la especie de que se trate (3).

En *Leishmania major*, el lipofosfoglicano de superficie (LPG) activa eficientemente al complemento y genera C3b sobre la superficie del parásito, con la polimerización del C9. Sin embargo, la cantidad de LPG es regulada según el estadio de desarrollo y además inhibe la inserción de C5b-9 en la membrana del parásito que impide la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y por lo tanto, previene la lisis del patógeno (4).

*Trypanosoma cruzi* tiene un estadio extracelular avirulento, el tripomastigoto, que es refractario a la lisis mediada por complemento. El mecanismo de resistencia al complemento en los tripomastigotos de *T. cruzi* puede ser multifactorial y cuatro laboratorios diferentes han descrito moléculas reguladoras producidas por los tripomastigotos. Estas moléculas reguladoras son de diferente masa molecular (MM), pero exhiben considerable igualdad en la función; todas y cada una inhiben la formación de C3 convertasa o aceleran el decaimiento intrínseco de la misma; por lo tanto, bloquean la activación del complemento sobre la superficie del parásito (5 y 6).

La glicoproteína de 87 a 93 KDa de las cepas M-88 y Y de los tripomastigotos, exhiben una función análoga a la de la proteína reguladora del complemento de los mamíferos llamada factor que acelera el decaimiento (DAF) y tiene de 40 a 50% de semejanza en la secuencia de nucleótidos con el DAF del humano. Resulta interesante que una clona de  $\lambda$ gt11 expresa una molécula reguladora del complemento derivada de *T. cruzi* que híbrida con una sonda de DNA complementario para el DAF del humano. Una secuencia parcial de esta clona ha revelado dos regiones con similitud al consenso repetido, compartido por las proteínas de unión a C3b/C4b de mamífero (6 y 7).

Se ha reportado recientemente que el estadio duplicativo de *T. cruzi*, el amastigoto, puede sobrevivir extracelularmente e iniciar la infección *in vitro*. En contraste con los tripomastigotos, los amastigotos que son resistentes a la lisis activan al complemento eficientemente, al unir grandes cantidades de C3 y C5b-9 estable, pero impiden su inserción en su membrana y por tanto la formación del MAC (7).

El taquizoito (estadio extracelular infeccioso de *Toxoplasma gondii*), exhibe en su superficie

extracelular pocas proteínas yodables, está glicosilado pobremente y por lo tanto es ineficiente para activar el complemento en sueros inmunes. Los taquizoitos evaden las consecuencias de la activación del complemento, al limitar la acumulación de C3 y convertirlo rápidamente en C3bi hemofícticamente inactivo, así inhiben la cascada del complemento desde su inicio (8).

Al no poder un animal montar una respuesta humoral bien determinada contra un parásito, no existe la formación de células productoras de anticuerpos o bien los anticuerpos formados no encuentran el mismo blanco, por los mecanismos explicados párrafos atrás. De esta forma, los parásitos evitan la opsonización y por tanto, no activan al complemento por su vía clásica, además de no ser inmovilizados y fagocitados por los macrófagos residentes.

Algunos parásitos extracelulares han desarrollado moléculas que impiden la inserción estable de los componentes terminales del complemento (C7 a C9) en su membrana, de esta manera evitan que se forme un complejo lítico de ataque a la membrana y por lo tanto su eliminación por esta vía inmunológica.

**Evasión de la lisis durante la entrada a la célula.** La entrada de los microorganismos a los fagocitos está frecuentemente asociada a la generación de derivados tóxicos del oxígeno. Los mecanismos para ganar el acceso hacia el medio intracelular, por lo tanto, son: usar un receptor que no está asociado con la descarga respiratoria, tener un "basurero" donde acumule metabolitos oxidativos tóxicos, o invadir células incapaces de montar una descarga respiratoria. *Leishmania* spp no sólo evita la lisis mediada por el complemento, sino que también utiliza los receptores del mismo para su entrada a la célula. La unión de los receptores al complemento por medio de C3b no induce una descarga respiratoria, lo que le permite evadir este mecanismo importante de defensa del hospedero (9). Tanto el LPG, como la glicoproteína gp63 se han identificado como ligandos del parásito que directamente median la asociación a los macrófagos y su entrada a los mismos.

Además de la entrada a las células, vía la inactivación de los receptores, la *Leishmania* spp exhibe otros mecanismos para evitar la descarga respirato-

ria. Cuando se adiciona LPG a los monocitos periféricos purificados de humanos se observa que inhibe a la proteína-cinasas C y evita la iniciación de la decaeraga respiratoria. La Fc durante la infección por *Trypanosoma cruzi* funciona como puente molecular que facilita la unión del parásito a sus células blanco, por medio de su unión a la familia de proteínas de las integrinas. El *Toxoplasma gondii* utiliza a la laminina con el mismo fin, pero su unión es a la  $\beta$ -integrina, lo que facilita su entrada a la célula hospedera.

**Evasión de las defensas después de la entrada a la célula**

Uno de los mecanismos en *Leishmania* es la formación de vacuolas parasitóforas; aunque estas vacuolas son morfológicamente distintas en diversas especies, son esencialmente fagolisosomas ácidos, que contienen hidrolasas ácidas y glicoproteínas de membranas lisosomales. Los amastigotos bajo condiciones ácidas exhiben metabolismo aumentado que refleja su adaptación al medio intracelular (10). *Leishmania donovani* posee una superóxido-dismutasa y una fosfatasa ácida que pueden inhibir la acción de los metabolitos tóxicos del oxígeno producidos durante la decaeraga respiratoria; la proteína gp63 actúa como proteasa capaz de degradar enzimas lisosomales y tiene su actividad óptima bajo las condiciones ácidas prevalentes en el fagolisosoma (11).

*Trypanosoma cruzi* entra a la célula por medio de vacuolas unidas a la membrana de la célula a infectar. Para que *T. cruzi* salga de la vacuola al citoplasma, el medio debe estar acidificado. Este hecho está asociado con la síntesis de una proteína formadora de poro putativa del parásito, que es antigénicamente similar al componente del complemento membranopático C9. Este parásito utiliza a los receptores Fc para formar la vacuola parasitófora ácida, que se llena con anticuerpos que permiten su internación a la célula a infectar (12).

*Entamoeba histolytica* produce proteasas que son capaces de degradar la lámina basal del intestino, así evade la respuesta inmune local y evita que se monte una respuesta sistémica potente que la elimine. Además, se sabe que la amiba no actúa eficientemente al complemento, posiblemente porque degrada los receptores a Fc de los anticuerpos, e impide así ser opsonizada (14).

*Trichomonas vaginalis* posee proteasas específicas que degradan a varios componentes del complemento, además de tener en su superficie cuatro adhesinas específicas que la ayudan a su fijación a la membrana vaginal, de esta forma evita su eliminación. Además, el lugar anatómico donde *Trichomonas* se aloja impide su opsonización y fagocitosis por los macrófagos, ya que en la vagina no hay migración de células productoras de anticuerpos (14).

El cisticerco de *Taenia crassiceps* posee genes del complejo principal de histocompatibilidad endógeno a los del hospedero, lo que representa un emparejamiento molecular con las células del mismo, ya que al expresar antígenos similares evita su posible eliminación por la inmunidad celular dependiente del MHC y el hospedero lo acepta como propio (15). Además, la respuesta inmune humoral no tiene efecto sobre el parásito, ya que durante la infección, tanto aguda como crónica, la cantidad de anticuerpos anticisticercos aumenta notablemente conforme transcurre el tiempo de infección, sin notarse cambios en la carga parasitaria, lo que indica que los anticuerpos son irrelevantes en esta parasitosis. Por otra parte, el cisticerco es capaz de provocar fuertes cambios en el microambiente hormonal del hospedero, de tal forma que éste le sea favorable para su crecimiento y restrictivo para la inmunidad celular. El metacercario es capaz de aumentar los niveles séricos de estradiol y disminuir los de testosterona en ratones de ambos sexos durante periodos de infección prolongados, lo que provoca una deandrogenización y estrogenización del macho, lo que reduce en la disminución de la respuesta a la concanavalina A, la producción de interleucina-2 (IL-2) y de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) así disminuye la respuesta celular (TH1) del hospedero sin alterar la respuesta humoral y los niveles de cargas parasitarias axorbitantes, que pueden llegar a ser equivalentes al peso del ratón. La reconstitución con andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona), de animales castrados y parasitados, provoca una disminución notable en la carga parasitaria (50%) y una recuperación de la capacidad proliferativa de los linfocitos de estos animales en respuesta a la concanavalina A. Estos datos apoyan una regulación endocrina de la respuesta inmunológica del ratón a esta parasitosis y agregan un elemento notable más a los mecanismos de evasión parasitaria: la regulación neuroendocrina del hospedero por el parásito que modifi-

en el sistema inmunológico a su favor y evita ser eliminado.

Otros mecanismos que existen son: *Leishmania* puede regular negativamente la expresión del MHC sobre la superficie de los macrófagos parasitados. Las filarias y equisistomas generan proteínas que rompen los anticuerpos. *Fasciola hepática* y *Nelumbo guineensis* secretan proteínas específicas que parten la porción Fc de los anticuerpos, lo que impide su unión a los receptores celulares y la activación del complemento. *T. cruzi*, secreta una proteína que bloquea la expresión del receptor de IL-2 y previene así la proliferación de las células T.

*Ancylostoma duodenale* se aleja del lugar de la respuesta y migra sin dar lugar a una respuesta sistémica local lo suficientemente efectiva para eliminarla.

Una lista (adaptada de 14) de los mecanismos de evasión inmune usados por los parásitos se presenta en la Tabla I. Aunque es probable que muchos mecanismos más sean descubiertos en el futuro como resultado de la investigación creciente, de los datos disponibles se puede observar un patrón unificado de la forma en que los parásitos evaden la respuesta inmune una vez que entran a su hospedero definitivo.

Finalmente, una meta principal de la investigación actual sobre enfermedades parasitarias es el desarrollo de vacunas. El cumplimiento de tal meta se

complica debido a todos los mecanismos evasivos mencionados y a que los parásitos presentan estados de su desarrollo en diversos vectores, lo que dificulta montar una respuesta inmunológica adecuada para su eliminación.

TABLA I

PRINCIPALES MECANISMOS DE EVASION  
INMUNOLOGICA EMPLEADOS POR LOS  
PARASITOS

- |   |
|---|
| <b>A. Mecanismos específicos que previenen el daño a la superficie del parásito.</b>            |
| 1. Modificaciones específicas del estado del desarrollo.  |
| 2. Variación antigénica.  |
| 3. Cambio rápido y reemplazamiento de cubiertas antigénicas.                                    |
| 4. Resistencia intrínseca de la membrana al daño inmune.  |
| <b>B. Mecanismos que podrían actuar en otros sitios en adición a la superficie parasitaria.</b> |
| 1. Degradación de los anticuerpos (inhibición).   |
| 2. Inactivación del complemento.  |
| 3. Inactivación de la función celular efectora.   |
| 4. Proteínas inmunosupresoras.  |
| 5. Secuestro anatómico.   |
| <b>C. Mecanismos que previenen la lista dentro de las células</b>                               |
| 1. Enzimas específicas que inactivan radicales libres.  |
| 2. Formación de vacuolas parasitóforas.   |
| 3. Optimización del metabolismo en ambientes ácidos.  |

REFERENCIAS

1. Sher A y Colley D G (1989) Immunoparasitology. En Fundamental Immunology, Editor: Paul W E, Raven Press, New York, pp 937-983.
2. Mitchell G F (1991) Co-evolution of parasites and adaptive immune responses. En Immunoparasitology Today, Editores: Ash C y Gallagher R B, Elsevier, Trónto, Cambridge, pp A2-A6.
3. Sher A (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Annu Rev Immunol 10: 383-409.
4. Cox F R G y Lyew F Y (1992) T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. Immunol today 13: 445-449.
5. Sher A (1988) Vaccination against parasites: Special problems imposed by the adaptation of parasitic organisms to the host immune response. En: The biology of parasitism, Editor: Alan R, Raven Press, New York pp 169-182.
6. Miangris P, Ichihara S, Hensler C, Tsonggawa S y Coutinho A (1989) Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCR1 T cells. Immunol. Rev. 112: 183-207.
7. Tarleton R L (1990) Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 144: 717-724.

8. Szuby Y, Coffano M A, Scholler R D y Bonington J B (1989) Interferon gamma: The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 249: 516-519.
9. Law F Y, Hala C y Howard J G (1992) Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. *J Immunol* 128: 1917-1922.
10. Blackwell J M, Roberts B y Alexander J (1985) Response of Balb/c mice to leishmanial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 122: 97-106.
11. Scott P, Nasovits P, Coffano R L, Pearce y Sher A (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cells from the transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 168: 1675-1684.
12. Floyd J H (1980) Non-specific killing mechanisms effective against blood stage malarial parasites. *Immunity Lett* 23: 173.
13. Tarebin R L (1988) *Trypanosoma cruzi* induced expression of IL-2 production. II Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol* 140: 3769-3773.
14. Cohen S (1982) Survival of parasites in the immunocompetent host. In *Immunology of parasite infection* Editors: Cohen S y Warren K S, Blackwell, Oxford, pp 431-474.
15. Sachse K, Fregene G, Diaz M L, Valdez F, Hinshaw B M, Opevinsky T, Lemoli C y Larralde C (1991) Interleukin 2 (IL-2) regulates cutaneous leishmaniasis and influences on susceptibility. *Parasitol Res* 77: 343-346.



## INTERACCIONES NEUROINMUNOENDÓCRINAS

Jorge Morales Montor\*

### Introducción

La interacción entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunitario se reconoce actualmente como uno de los elementos clave que intervienen para mantener la homeostasis de los vertebrados en general, y de los mamíferos en particular. La capacidad del sistema inmunitario para discriminar entre lo propio y lo no propio tiene sus bases en un amplio rango de especificidades expresadas por las células inmunitarias, una alta proporción de las cuales está dirigida hacia las moléculas o células propias alteradas. Esta característica del sistema inmunitario implica que puede percibir una imagen interna de los componentes del organismo y reacciona a distorsiones particulares de esta imagen (Besedovsky y cols., 1989). La respuesta inmunitaria como una respuesta homeostática esta, por lo tanto, bajo control fisiológico y contribuye al mantenimiento de la integridad de las células corporales y tejidos. Las hormonas y neurotransmisores que están presentes en el micro ambiente de las células inmunitarias pueden restringir su autonomía, probablemente por su acción sobre receptores para estos agentes neuroendócrinos (Berczi, 1986).

La comunicación eficiente de estos tres sistemas implica la existencia de vías aferentes y eferentes que constituyen un sistema complejo de retroalimentación.

Cuando se producen alteraciones en esta red, se desencadenan patologías que involucran a los diferentes componentes de la misma.

Por otra parte se ha avanzado en forma notable en el conocimiento de las funciones múltiples del sistema inmunitario, las que también participan del proceso de adaptación biológica, a través de la eliminación de patógenos y células extrañas del organismo. Estas funciones requieren, a su vez, sistemas de control delicados que permitan una adecuación a las diferentes situaciones fisiológicas y patológicas por las que atraviesa todo ser biológico durante su vida, y se hace entonces imprescindible la interacción con otros sistemas del organismo. Esta interacción constante hace posible el funcionamiento armónico de estos tres sistemas, e implica la existencia de mensajeros y receptores comunes que participan al mismo tiempo en sistemas complejos de retroalimentación. La alteración de la delicada comunicación entre estos sistemas conduce al desarrollo de patologías diferentes. Tal es el caso de algunas alteraciones psíquicas que causan inmunosupresión, los trastornos inmunitarios que causan problemas endócrinos (como la tiroiditis de Hashimoto y la diabetes mellitus tipo I) que componen un círculo que ejemplifica la interacción funcional entre el sistema inmunitario y el neuroendócrino (Grossman, 1992).

\*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. AP 70220, México, D.F., 66510.

Muchos datos experimentales demuestran que, como muchas otras células corporales, las células inmunitarias con sus capacidades extremadamente versátiles y complejas, no escapan a influencias neuroendócrinas, ya que existen obvios niveles de control por hormonas y neurotransmisores del metabolismo y división celulares. En efecto, la respuesta inmunitaria, es tal vez la única respuesta fisiológica en la cual la amplificación está basada en la proliferación celular y la transformación. Este proceso requiere cambios metabólicos y factores de crecimiento que hacen a esta respuesta particularmente dependiente del control neuroendócrino. De cualquier forma, creo que el control del metabolismo y la proliferación no son la única influencia que las hormonas y neurotransmisores ejercen sobre las células inmunitarias. Es suficiente mencionar que se sabe que la producción de varias linfocinas y monocinas es afectada por ciertas hormonas y neurotransmisores ( Gillis, et al. 1979; Snyder, et al. 1982; Keiso, et al. 1984).

Las primeras interacciones entre estos sistemas fueron identificadas para los glucocorticoides (Fauci, 1979) (cuya principal acción es inhibir la respuesta inmunitaria) y para el timo (órgano clave en el desarrollo del sistema inmunitario), en la regulación de los niveles de hormonas sexuales y de la reproducción (Rebar y cols., 1981; Grossman, 1985).

#### Comunicación neuroinmunológica.

Se ha observado que los órganos linfoides están innervados simpáticamente y la deservación de los órganos resulta en respuestas inmunitarias exacerbadas.

La contraparte de estos estudios, demuestra que el estudio de la respuesta inmunitaria siguiendo la administración *in vivo* e *in vitro* de  $\alpha$ -agonistas (por ejemplo metoxamina), la cual no tiene efectos sobre el sistema nervioso central, produce la inhibición de la miama. La conclusión lógica es que la inervación simpática media un mecanismo de restricción sobre la actividad de las células inmunitarias (Besedovsky y cols., 1979; Miles y cols., 1981). En otros estudios en los cuales se mide la actividad simpática por los cambios de noradrenalina (NA) durante la respuesta inmunológica en el microambiente de los órganos linfoides, demuestran que estos niveles están disminuidos en órganos linfoides de ratas inmunizadas (Besedovsky y cols., 1983). Estos datos, tomados junto con los de deservación y el efecto de los  $\alpha$ -agonistas, constituyen dos evidencias definitivas, de que un cambio significativo en el sistema simpático produce un efecto sobre la función inmunitaria.

Los péptidos opioides endógenos también tienen influencia sobre esta respuesta. La  $\beta$ -endorfina, met-enkefalina y leu-enkefalina son potentes supresores de la producción de anticuerpos; tal supresión puede bloquearse por el antagonista opiáceo naloxona. Por otro lado, la respuesta celular parece ser aumentada por las endorfinas, ya que la  $\beta$ -endorfina incrementa la respuesta proliferativa de las células T a la concanavalina A y fitohemaglutinina, aumenta la generación de linfocitos T citotóxicos (Carr y Klimpel, 1986), incrementa la aparición de células asesinas naturales (NK) y la producción de interferón- $\gamma$  (Mandler y cols., 1986).

## Comunicación endócrino-inmune Mélex

La glándula pituitaria controla directa o indirectamente la actividad de casi todas las glándulas endócrinas, y a su vez, ésta está controlada a nivel del sistema nervioso central por el hipotálamo. La hipófisis es directamente influenciada por la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6), principalmente sobre la secreción de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), la cual suprime la respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes (eritrocitos de camero) e independientes (dinitrofenol, DNP) de células T (Johnson y cols., 1982; Blalock, 1989). Las funciones de linfocitos T y macrófagos también son moduladas por ACTH inhibiendo la producción de interferón- $\gamma$  por linfocitos T en cultivo (Johnson y cols., 1984) además de bloquear la capacidad tumoricida de los macrófagos (Koff y Dunagan, 1986). Además de ACTH, la hipófisis tiene otros diversos tipos celulares encargados de producir otras hormonas. Las principales hormonas producidas por hipófisis que tienen efecto sobre el sistema inmunitario son: hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH). Blalock en 1989, descubrió que en una cepa de ratones "enanos" deficientes en GH, la respuesta inmunológica de tipo celular dependiente del timo estaba deprimida. Snow en 1985, demostró que la GH es necesaria en cultivos *in vitro* para la obtención de células T citotóxicas funcionales. Además, la tasa de división de linfocitos T medida como la incorporación de timidina tritiada ante el estímulo de un mitógeno general para células T (concanavalina A) se estimula

con GH; por lo tanto la GH tiene influencia sobre la proliferación, así como sobre la diferenciación terminal de células T efectoras.

La LH es una hormona que tiene un efecto dicotómico sobre las células del sistema inmunitario. Por un lado estimula la proliferación por concanavalina A de linfocitos de bazo (Roushbia y cols., 1988a) y por otro, disminuye la actividad citotóxica de células NK (Roushbia y cols., 1988b). Estos resultados implican un distinto modo de acción de la misma hormona dependiendo de la célula receptora. Se piensa que este efecto puede darse a nivel del sistema de señalización al cual el receptor esté acoplado en diversos tipos celulares.

La prolactina es otro de los inmunomoduladores hipofisarios. Se sabe que altos niveles de prolactina en un organismo llevan a respuestas de tipo humoral exacerbadas, y que la producción de anticuerpos inespecíficos es mayor en un organismo con prolactinemia. Además en cultivo mixto de linfocitos, la prolactina también aumenta la producción de anticuerpos (Cross y cols., 1989). Así mismo, el tratamiento de ratas con un inhibidor de la producción de prolactina (como lo es la bromocriptina) inhibe la producción de anticuerpos (Nagy y cols., 1983). El efecto de prolactina se sabe se da a nivel del sistema T, específicamente el TH<sub>2</sub>, ya que es capaz de modular la producción de interleucina 4 y 6. A nivel de enfermedades autoinmunes dependientes de anticuerpos, en modelos animales se ha determinado que la prolactina acelera la mortalidad, y que los niveles de interleucina-2 están bajos en pacientes con altos niveles de prolactina

en comparación a los pacientes normales (Mc. Murray y cols., 1991).

Como se mencionó anteriormente, la comunicación entre los sistemas neuroendócrino e inmunitario es bidireccional, y a su vez sustancias del sistema inmunitario afectan el funcionamiento del sistema endócrino. Además de los conocidos efectos que las linfocinas tienen sobre la esteroidogénesis (revisados en el apéndice I), las interleucinas y monocinas también actúan sobre otra variedad de células endócrinas conocidas.

#### Dimorfismo sexual de la respuesta inmunológica

De entre los diversos aspectos involucrados en la relación huésped-parásito, la asociación entre la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y el sexo del huésped, es un tópico documentado ampliamente en la actualidad, y abarca desde infecciones por hongos, bacterias, protozoarios y virus hasta parásitos metazoarios. En la actualidad, se reconoce que los machos y las hembras presentan fuertes diferencias en cuanto a su respuesta inmunitaria, y que generalmente, las hembras son más susceptibles que los machos a las infecciones por diversos agentes (Schuur y Verheul, 1989).

Por ejemplo, estudios clínicos han demostrado que la distribución por sexos de las llamadas enfermedades autoinmunitarias, presenta predominio franco en la mujer. El lupus eritematoso diseminado (LED) es nueve veces más frecuente en mujeres que en hombres; la artritis reumatoide presenta cifras parecidas, y en el caso de la tiroiditis de Hashimoto, la susceptibilidad del sexo

femenino es 50 veces mayor que la del masculino. Experimentos realizados utilizando ratones NZB/WV, que desarrollan una patología muy similar al LED humano, permitieron dilucidar la función de las hormonas sexuales en la evolución de la enfermedad. En este modelo experimental, se comprobó que la orquidectomía realizada en la etapa prepúbere, aumenta la incidencia del LED en los machos; en cambio la ovariectomía no afecta la evolución de la enfermedad.

Una de las diferencias principales entre machos y hembras es a nivel del sistema reproductivo: mientras que las hembras presentan ovarios, los machos presentan testículos. Esta diferencia en gónadas, determina también la cantidad y tipo de hormonas sexuales producidas.

Existen numerosos datos que corroboran la influencia de los esteroides sexuales en la evolución de un gran número de enfermedades en animales de laboratorio, aunque también existen evidencias bien sustentadas que en el transcurso de algunas enfermedades autoinmunitarias la evolución de la enfermedad se ve afectada por los niveles de esteroides sexuales. Dado que las hormonas sexuales tienen una amplia gama de efectos que modifican la constitución fisiológica y bioquímica de tejidos muy diversos, la explicación de las causas del dimorfismo sexual en la susceptibilidad a infecciones parasitarias puede ser compleja. Actualmente, este fenómeno se ha encontrado relacionado con diferencias en la respuesta inmunológica, que son determinadas por la influencia de hormonas sexuales sobre el aparato inmunocompetente del huésped. Los estudios respecto al efecto de las hormonas sexuales sobre el sistema inmunitario, conforman un

cuadro general que aún es complejo e incompleto, pero las evidencias disponibles indican que los estrógenos inhiben a la inmunidad celular ( $Th_1$ ) y aumentan la humoral ( $Th_2$ ) (Grossman, 1992), mientras que los andrógenos no tienen un efecto característico: algunos reportes aportan datos demostrando que inhiben la respuesta celular y humoral, mientras que otros demuestran lo contrario. De tal forma que los andrógenos (en particular testosterona y DHT) podrían tener efectos característicos de acuerdo al tipo de confrontación inmunológica que se este llevando a cabo.

El timo es un blanco primario de las hormonas sexuales. Este órgano es mas pesado en hembras que en machos y se atrofia progresivamente durante el proceso de envejecimiento después de la pubertad. Durante el embarazo, el timo se reduce y después de la lactancia vuelve a aumentar de peso (Ito y Hoshino, 1982). Se han encontrado fluctuaciones estacionales en el peso del timo en una especie de roedor silvestre (Twigg, 1988); el órgano pierde peso durante la estación de apareamiento cuando las concentraciones de testosterona en el plasma son altas, recuperándose al final de dicha estación. Greenstein y cols. (1985) han demostrado que la orquidectomía puede restaurar en gran medida el timo de ratones "viejos"; esta regeneración se inhibe por tratamiento de los ratones con testosterona. Pero el efecto de los esteroides sexuales no se observa sólo al nivel del timo. Si se administra dietilbisterol a ratones neonatalmente timoectomizados se reduce el número de células T en el bazo y la reacción de hipersensibilidad retardada se encuentra disminuida (Kellard, 1990).

Por otra parte, se conoce que los estrógenos actúan sobre el sistema macrófago-monocito, aunque existe discrepancia en cuanto a la naturaleza de este efecto (Ahmed, 1985). La actividad de las células NK también es sensible a estrógenos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Ferguson y Mc. Donald, 1985). Con respecto a la respuesta inmune humoral, muchos estudios demuestran que la producción de inmunoglobulinas en hembras es mucho mayor que en machos. Pasvonen y col. (1981) demostraron que dosis fisiológicas de  $17\beta$ -estradiol, estimulan la acumulación de inmunoglobulinas y de células secretoras de anticuerpos inducida por mitógenos en cultivos de linfocitos de sangre periférica, tanto de hombres como de mujeres. Cuando se fraccionaron las células, se demostró que el estradiol no afecta directamente a las células B, sino que inhibe el efecto de un población de linfocitos T supresores. Más tarde se demostró la existencia de receptores a estrógenos en células T periféricas CD8+ (supresoras/citotóxicas). Por otra parte, los esteroides sexuales no son la única clase de hormonas que afectan al sistema inmunitario. La relación de los sistemas neuroendócrino e inmunitario conforman una red compleja de interacciones cuya organización funcional aún no ha sido aclarada.

Si la influencia de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmunológica es una hipótesis bien fundamentada sobre la gran cantidad de información referente a la interacción entre los sistemas inmunitario y endócrino, también es cierto que el curso de un proceso infeccioso particular está potencialmente sujeto a la influencia de otros factores, como son los siguientes:

la naturaleza y fisiología de los tejidos u órganos ocupados por el parásito en el huésped (Kiyota et al., 1984), el estado fisiológico del huésped (nutricional o de estrés) (Kaush y Farthing, 1986), el tipo de respuesta inmunitaria desarrollada (Mitchell 1979), el tamaño del inoculo del parásito (Mitchel et al., 1980), la susceptibilidad genética del huésped (Wakelin, 1985, Scutto et al., 1991), la edad del huésped (Greenfield, 1942; Burney, 1977) y los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitario por el parásito (Apéndice II de esta tesis). Todos estos factores deben de tomarse en cuenta al hablar del dimorfismo sexual de la respuesta inmunológica, especialmente en aquellos casos en los que halla una susceptibilidad asociada al sexo del huésped.

#### Regulación de la inmunidad por esteroides

Desde hace algún tiempo es bien sabido, que las hormonas esteroides son un importante inmunomodulador, que pueda suprimir o potenciar una respuesta inmunológica determinada. Las hormonas esteroides están clasificadas por el lugar donde se producen en dos grandes categorías: los esteroides sexuales y los esteroides adrenales. Dentro de los esteroides sexuales que se conocen sus efectos sobre el sistema inmunitario están los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona), los estrógenos (estradiol) y las progestinas (progesterona). De los esteroides adrenales con efecto más ampliamente caracterizado sobre el sistema inmunitario tenemos a los glucocorticoides (cortisol). En este apartado mencionaremos algunos de los

efectos que tienen estos dos tipos de esteroides sobre el sistema inmunitario.

La propiedad inhibitoria de los glucocorticoides sobre la respuesta inflamatoria ha sido ampliamente aprovechada en la clínica para el control de una respuesta exacerbada. Es bien conocido, que el cortisol tiene propiedades antiinflamatorias por que interrumpe la liberación de los mediadores preformados en leucocitos que intervienen en esta respuesta. Así, son capaces de inhibir la síntesis de histamina y leucotrienos. Además, se conoce que mediante un mecanismo neuroendócrino-inmunológico regulan naturalmente la magnitud de una respuesta, y evitan se torne agresiva para el organismo. Uno de los puntos experimentales y fisiológicos que más apoyan esta regulación es el estrés.

El estrés se define como un estado fisiológico en el cual se ha presentado una perturbación de la homeostasis del organismo por factores físicos, bioquímicos ó psicológicos. La influencia de situaciones de estrés por causas psicológicas, como la depresión y la tensión nerviosa aguda se correlacionan con alteraciones en la respuesta inmunológica y se revierten cuando estas causas desaparecen. Los glucocorticoides secretados por la corteza suprarrenal se incrementan rápidamente en respuesta al estrés agudo; y su función es la de inhibir en muchos casos la secreción de mediadores celulares como las citocinas. Por ejemplo, durante una infección viral se echa a andar un proceso complejo tendiente a controlar la infección y a modular la respuesta inmunitaria del huésped, el organismo infectado se encuentra en un estado de estrés permanente, lo que directamente

provoca que se regule la respuesta inmunitaria y el huésped no se autodafne. La infección bacteriana o viral inducen la producción de IL-1, que actúa sobre las neuronas hipotalámicas productoras de CRF, esto aumenta la secreción de ACTH hipofisaria, y por último esto provoca una alta liberación de glucocorticoides (GC) suprarrenales. Los GC modulan la respuesta inmunológica cerrando así un círculo de retroalimentación que involucra al sistema nervioso que endócrino e inmunitario. La interacción de estos tres sistemas conducirá a un balance adecuado de la respuesta inmunológica y a mantener la homeostasis del organismo.

Evidencias clínicas y experimentales sostienen la hipótesis de que los esteroides gonadales pueden regular la función inmunitaria. Esto se ha reforzado por que se conoce un dimorfismo sexual de la respuesta inmunitaria (apartado anterior). Esta respuesta se altera por la gonadectomía y reconstitución hormonal (Terrazas et al, 1984), durante el embarazo, y quizá la más importante evidencia, es que los principales órganos linfoides y muchas células inmunitarias circulantes poseen receptores a hormonas sexuales. Los principales esteroides sexuales (progesterona, testosterona y estradiol), han sido bien caracterizados en sus diferentes formas de modular la respuesta inmunitaria (Grossman, 1985; Ahmed y cols., 1985). La testosterona ha sido considerada por algunos autores como inmunosupresora, pero hasta ahora no se han detectado receptores para esta hormona en células linfoides (Cohen y cols, 1988), sólo han sido detectados receptores para estrógenos en diferentes células linfoides (T, B, NK

(Cohen y cols, 1988) así como en macrófagos (Hu y cols., 1988; Gulshern y cols., 1980), en donde pueden modular la respuesta inmunológica. La acción directa de los estrógenos sobre los linfocitos B resulta en un aumento de la respuesta de anticuerpos antígeno-específicos por lo que se piensa que actúa sobre el cambio de isotipo de inmunoglobulina en las células plasmáticas. Por otra parte, inhiben la capacidad citotóxica de células asesinas naturales, y en células T citotóxicas inhiben la producción de interleucinas (Ahmed y cols, 1985). Su acción sobre macrófagos es principalmente, inducir una mayor secreción de IL-1 (Gulshern, y cols., 1980). Se ha demostrado además, que el estradiol y la progesterona, alteran el potencial de membrana de los linfocitos, lo que altera la fluidez de su membrana. Así, en estudios *in vivo* se ha demostrado que los linfocitos de hombres tienen un potencial de reposo en mV más alto que el de las mujeres. Sobre las células presentadoras de antígenos se ha demostrado que los esteroides inhiben la síntesis de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (M-2), lo que dificulta el reconocimiento y eliminación de antígenos T-dependientes (Clerici y cols., 1991). La progesterona, se parece en la mayoría de sus efectos al estradiol, ya que estimula inmunidad humoral e inhibe la inmunidad celular. La testosterona se ha reportado, tiene efectos dicotómicos, y muchos de los efectos reportados no se deben directamente a ella, sino a su metabolito 5 $\alpha$ -reducido, la dihidrotestosterona. Es por esto que se piensa que no se han encontrado receptores específicos para la testosterona, y si un receptor común a andrógenos (AR).

En conclusión, la interacción neuroinmunoendócrina es un fenómeno que actualmente es ampliamente reconocido como clave en un gran número de procesos fisiológicos, incluyendo, la regulación del establecimiento y crecimiento parasitarios en un huésped inmunocompetente. Estas interacciones, tienen que ser consideradas a la hora de estudiar los factores genéticos y físicos que determinan el establecimiento específico de los parásitos sobre

determinado huésped. Por otra parte, se deben considerar de manera importante a la hora de desarrollar tratamientos para prevenir ó eliminar el crecimiento de determinados parásitos (vacunas) en sus huéspedes, ya que esta interacción del parásito y su huésped es muy compleja, e involucra la acción coordinada y muy fina de los tres sistemas principales de los mamíferos: el sistema inmunitario, el sistema nervioso y el sistema endócrino.



#### **XIV. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Aguilera, G., and Romano, M. (1989): Influence of the thymus on the steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *Journal of Endocrinology*. 3: 367-373.
- 2.- Ahmed, S.A., Penhale, W.J., and Tatal, N. (1985) :Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex action. *American Journal of Pathology*. 121: 531-551.
- 3.- Alexander, J., and Stimson, W.H. (1988) : Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology today*. 4: 189-193.
- 4.- Barker G. C., Mercers, S.G., Rees, H.H., and Howells, R.E. (1991): The effect of ecdysteroids on the microfilarial production of *Brugia pahangi* and the control of meiotic reinitiation in the oocytes of *Dirofilaria immitis*. *Parasitology Research*. 77: 65-71.
- 5.- Beckage N. E. (1991): Host parasite hormonal relationships: a common theme?. *Experimental Parasitology*. 72: 332-338.
- 6.- Beyer, C., Morali, G., Naftolin, F., Larsson, K., and Pérez-Palacios, G. (1976): Effects of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behavior in castrated male rats. *Hormones and Behavior*. 7: 353-363.
- 7.- Bigsby RM and Li A. (1994). Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinology*. 134: 1820-1826.
- 8.- Bojalil R, Terrazas, L.I., Govezensky, T., Sciuotto, E. and Larralde, C. (1983): Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cryptosporidiosis (*Teenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. 78: 471-476.

- 9.- Bundy D. A. P. (1988): Gender-dependent patterns of infection and disease. *Parasitology today*. 4: 186-193.
- 10.- Casltes C, Heimberg, A., and Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 370 220-223.
- 11.- Carraro, A. A., Lopes, R.A., Ribeiro, R.D., and Lamano-Carvalho, T.L. (1992). The male reproductive organs in the chronic phase of experimental Chagas' disease. *Angew Parasitology*. 33: 3-9.
- 12.- Carvalho, T.L., Ribeiro, R.D., and Lopes, R.A. (1991). The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. *Experimental Pathology*. 41: 203-214.
- 13.- Carvalho, T.L., Carraro, A.A., Lopes, R.A., and Ribeiro, R.D. (1992). The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. II. Morphometric study of the vas deferens in the chronic phase of the disease. *Experimental Toxicology and Pathology*. 44: 147-149.
- 14.- Champlin A. K., Blight, W.C., and Mc Gill, E. (1983): The effects of varying levels of testosterone on the sexual behavior of the male mouse. *Animal Behavior*. 11: 244-245.
- 15.- Charniga L., Stewart, G.L., Kramer, W.I., and Stanfield, J.A.. (1981): The effects of host sex on enteric response to infection with *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology* 67: 917-922.
- 16.- Cicatiello, L., Ambrosino, C., Coletta, B., Scalona, M., Sica, V., Bresciani, F., and Weisz, A. (1992). Transcriptional activation of *jun* and *actin* genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 523-528.

- 17.- Clark, B.F. (1971). The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *Journal of Endocrinology*. **69**: 527-528.
- 18.- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., and Wylie, A.H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. **362**: 849-852.
- 19.- Culbreth, K.L., Esch, G.W., and Kuhn, R.E. (1972): Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of C-Leucine. *Experimental Parasitology*. **32**, 272-281.
- 20.- Deterio, S., Bartke, A., and Butler, K. (1979): A single injection of 17 $\beta$ -estradiol facilitates sexual behavior in castrated male mice. *Hormones and Behavior*. **13**: 314-327.
- 21.- DiAugustine, R.P., Petrusz, P., Bell, G.I., Brown, C.F., Korach, K.S., McLachlan, J.A. and Teng, C.T. (1988). Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*. **122**: 2355-2363.
- 22.- Dobeon C., and Owen, M.E. (1978): Effect of host sex on passive immunity in mice infected with *Nematospiroides dubius*. *International Journal for Parasitology*. **8**: 359-364.
- 23.- Dorais F. J., and Esch, G.W. (1969): Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology*. **25**: 395-398.
- 24.- Dorrington J.F., Moon Y. S. and Armstrong D.T. (1975): Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in culture granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. **97**: 1328-1331.

- 25.- Fitzpatrick S. and Richards J.S. (1991): Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology*. **129**: 1452-14
- 26.- Folkard E.J. and James V.H.T. (1993): Aromatization of steroids in peripheral tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **19**: 687-690.
- 27.- Freeman, R. S. (1984): Studies on responses of intermediate hosts to infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*. **42**: 367-385.
- 28.- Freeman, R.S. (1982): Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*. **49**: 989-990.
- 29.- Ginsberg, D., Mechts, F., Yaniv, M., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**: 9979-9983.
- 30.- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Reviews*. **15**: 391-403.
- 31.- Gorospe C.W., Hughes F.M. and Spangelo B.L. (1992): Interleukin-6: Effects On and production by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*. **130**: 1750-1752.
- 32.- Gottstein, B.V., Tsang, V.C., and Schantz, P.M. (1986): Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestodes antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **36**: 308-313.
- 33.- Green, E. (1981): Breeding systems. In "The mouse in biomedical research" ( H. Foster, D. Small, and J. Fox, Eds.) pp 91-107. Academic Press, New York.

- 34.- Grossman, C. (1991): Sex steroid regulation of autoimmunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 49: 649-659.
- 35.- Heandler, B., Hofer-Warbinek, R., and Hofer, E. (1987). Complementary DNA for human T-cell cyclophitin. *EMBO Journal*. 6: 947-950.
- 36.- Hart B.L. (1994): Behavioral defense against parasites: interaction with parasite invasiveness. *Parasitology*. 109: S139-S151.
- 37.- Homo-Delarche, F., Fitzpatrick, F., Christoff, N., Nufiez, E.A., Bach, J.F., and Dardenne, M. (1991): Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 49: 619-637.
- 38.- Huerta, L., Terrazas, L.I., Sciutto, E., Govezaneti, T., and Larraide, C. (1982): Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacystodes. *Journal of Parasitology*. 78: 471-476.
- 39.- Huet-Hudson, Y.M., Chakraborty, C., De S.K., Suzuki, Y., Andrews, G.K., and Dey, S.K. (1980). Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Molecular Endocrinology*. 4: 510-523.
- 40.- Hurd, C., Khattree, N., Alban, P., Nag, K., Jhanwar, S.C., Dinda, S., and Moudgil, V.K. (1986). Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 28507-28510.
- 41.- Hyder, S.M., Cram, L.F., and Looee-Mitchell, D.S. (1991). Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine *c-fos* proto-oncogene which contains an estrogen-response element. *Gene* 106: 281-282.

- 42.- Isseroff, H., Sylvester, P.W., Beesette, C.L., Jones, P.L., Fisher, W.G., Rynkowski, T., and Gregor, K.T. (1989): Schistosomiasis: role of endogenous opioids in supression of gonadal steroid secretion. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 94A: 41-45.
- 43.- Kays, A.M., Shatzky, D. and Linder, H.R. (1972). Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochemistry and Biophysical Acta*. 301: 475-486.
- 44.- Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H. and Koller G. (1994): Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 368: 339-342.
- 45.- Kraus, W.L., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*. 132 2371-2379.
- 46.- Larralde C., Morales J., Terrazas I., Govezensky T. and Romano M.C. (1995) : Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 53: 575-580.
- 47.- Lin Y. C. , Kikuhisa, Y., Kono, H., and Gu, Y. (1990): Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniiformis*) on reproductive functions in male and female host rats. *Experimental Parasitology*. 70: 344-352.
- 48.- Lingham RB, Stancel GM and Loose-Mitchell DS. (1968). Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology*. 2: 230-236.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 49.- Loose-Mitchell DS, Chiappetta C and Stancel GM. (1986). Estrogen regulation of *c-fos* messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology*. 2: 948-951.
- 50.- Lutjgs, W.G. and Hall N. R. (1973): Differential effectiveness of testosterone and its metabolites in the induction of male sexual behavior in two strains of albino mice. *Hormones and Behavior*. 4: 31-43.
- 51.- Lutjgs, W.G. (1979): Endocrine control of mammalian sexual behavior: An analysis of the potential role of testosterone metabolites. In *Endocrine control of sexual behavior*, C. Beyer (ed.), Raven Press, New York, U.S.A., p. 341-363.
- 52.- Marcus G.J. 1974. Mitosis in the rat uterus during the oestrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biology of Reproduction*. 10: 447-452.
- 53.- Mc Gill T.E. (1982): Sexual behavior in three inbred strains of mice. *Behavior* 19: 341-360.
- 54.- Mc Gill T.E., and Manning, A. (1976): Genotype and retention of the ejaculatory reflex in castrated male mice. *Animal Behavior* 24: 507-518.
- 55.- Mc. Donell, T.J. Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Koremeyer, S.J. (1989). *bcl-2* immunoglobulin transgenic mice demonstrate extend B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 67: 79-86.
- 56.- Méndez-Rodríguez, C.A., Camacho-Arroyo, I., Domínguez, R., Pasapera, A.M., Cruz, M.E., Quintero, A., and Carbón, M.A. (1997). *p53*, *c-fos* and *c-jun* gene regulation by oestradiol and during the oestrous cycle in the rat uterus. *Steroids*. Manuscript in revision.
- 57.- Miller, W.R. and Mullen, P. (1993): Factors influencing aromatase activity in the breast. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 44: 597-604.

- 58.- Morales J., Larraide C., Arteaga M., Govezensky T., Romano M.C and Morali G. (1986): Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *Journal of Parasitology*. 82: (5) 688-693.
- 59.- Morali, G. , Larsson, K., and Beyer, C. (1977): Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Hormones and Behavior* 9: 203-213.
- 60.- Murphy LJ and Ghehry A. (1990). Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocrine Reviews*. 11: 443-453.
- 61.- Murphy LJ, Murphy LC and Friesen HG. (1987). Estrogen induction of *N-myc* and *c-myc* proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology*. 120: 1892-1898.
- 62.- Nakai Y., Fukutsu J., Tominaga T., Nakai Y., Tamai S., Mori K. and Imura H. (1988): Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 155: 1456-1463.
- 63.- Nephew KP, Webb DK, Akcall KC, Moulton BC and Khan SA. (1983). Hormonal regulation and expression of the *jun-D* protooncogene in specific cell types of the rat uterus. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 46: 281-287.
- 64.- Orava, M., R. Voutilainen, AND R. Viikko. 1969. Interferon-gamma inhibits steroidogenesis and accumulation of mRNA of the steroidogenetic enzymes P450<sub>17</sub> and 17 hydroxylase
- 65.- Perez P, Schonthal A and Aranda A. (1993). Repression of *c-fos* gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 23538-23543.



- 66.- Phillips W. J., and Cannon, L.R.G. (1978): Ecological observations on the commercial sand crab *Portunus pelagicus* (L), and its parasite, *Sacculina granitars* Boehme, 1973 (Ciliopoda: Rhizocephala). *Journal of Fish Diseases*. 1: 137-149.
- 67.- Preston G.A., Lyon T.T., and Ying Y. (1986). Induction of Apoptosis by c-fos protein. *Molecular Cell Biology*. 10: 211-218
- 68.- Price M.T. and O'Brien S.N. (1993): Determination of estrogen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and cytochrome P450 aromatase mRNA levels in adipocytes and adipose stromal cells by competitive polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 77: 1041-1045.
- 69.- Reed M.J., Coldham N.G., Patel S.R., Ghilchik M.W. and James V.H.T. (1992): Interleukin-1 and Interleukin-6 in breast cyst fluid: their role in regulating aromatase activity in breast cancer cells. *Journal of Endocrinology*. 133: R5-R8.
- 70.- Reed M.J., Topping L., Coldham N.G., Purohit A., Ghilchik M.W. and James V.H.T.(1993): Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 44: 589-598.
- 71.- Reyes-Esperza, J., and Romano, M. (1989): An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *Journal of Steroid Biochemistry*. 34: 541-545.
- 72.- Rice, D.A., Sue Kirkman, M., Aitkens, L.D., Mouw, A.R., Schimers, S.P., and Parker, K.L. (1990). Analysis of the promoter region of the gene encoding mouse cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 11713-11720.

- 73.- Raneone LJ and Verma IM (1990). Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annual Review of Cell Biology*. 6: 539-557.
- 74.- Richards J.S.(1980): Maturation of ovarian follicles: action and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*. 60: 51-89.
- 75.- Richards J.S., Hickey G.J., Chen S., Shivety J.E., Hell P.F., Gaddy-Kurten D. and Kurten R. (1987): Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Steroids*. 66: 393-400.
- 76.- Rodbard. D., Bridson, W., and Rayford. P.L.(1989): Rapid calculation of radioimmunoassay results. *Laboratory of Clinical Medicine*. 74: 770-772.
- 77.- Roberts F.F.G. and Van der Molen H.J. (1989): Testicular Steroidogenesis. In *The Testis* (Edited by H. Burger and D. de Kretser) Raven Press, NY pp 303-327.
- 78.- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989): Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes (Molecular Cloning. A laboratory Manual, Volume 2) pp. 10.14-10.15, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 79.- Savouret JF, Rauch M, Redeuth G, Sar S, Chachereau A, Woodruff K, Parker MG and Migrom E. (1994). Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 28955-28962.
- 80.- Schantz. P.M., Tsang, V.M.W., and Maddison, S.E. (1988): Serodiagnosis of neurocysticercosis. *Review of Infectious diseases*. 10: 1231-1240.

- 81.- Sciutto, E., Fragoso, G., Díaz, M.L., Valdez, F., Lomeli, C., Govezensky, T., Montoya, R.M., and Larraide, C. (1991): Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research*. **77**: 243-246.
- 82.- Sher, A. and Coffman, R.L.. (1992): Regulation and immunity to parasites by T cells and T-cell derived cytokines. *Annual Review of Immunology*. **10**: 385-400.
- 83.- Simpson E.R., Cleland W.H. and Mendelson C.R.(1963): Aromatization of androgens by human adipose tissue *in vitro*. *Journal of Steroid Biochemistry*. **19**: 707-713.
- 84.- Smith K. J., Esch, G.W., and Kuhn, R.E. (1972): Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda) I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology*. **2**: 261-263.
- 85.- Sodersten, P. (1979): Role of estrogen in the display and development of sexual behavior in male rats. *In* Endocrine control of sexual behavior. C. Beyer (ed.). Raven Press, New York, New York, p. 305-315.
- 86.- Solomon, G.B. (1969): Host hormones and parasitic infection. *International Review on Tropical Medicine*. **3**: 101-158.
- 87.- Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L. and Sciutto, E. (1990): Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. **114**: 926-928.
- 88.- Spengelo B.L., Judd A.M., Isakson P.C. and MacLeod R. (1969): Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormones release *in vitro*. *Endocrinology*. **125**: 575-577.

- 88.- Spengelo B.L., Judd A.M., MacLeod R.M., Goodman D.W. and Isakson P.C. (1990): Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus. *Endocrinology*. **127**: 1779-1785.
- 89.- Spengelo B.L., MacLeod R.M. and Isakson P.C. (1990): Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology*. **126**: 582-586.
- 91.- Tavares, M.C., Carraro, A.A., Favaretto, A.L., Petrusci, S.O., Lopes, R.A., Ribeiro, R.D., and Carvalho, T.L. (1994). The male organs in experimental Chagas' disease. III. Plasma testosterone and accessory sex glands in the acute phase of the disease. *Experimental Toxicology and Pathology*. **46**: 243-246.
- 92.- Terahima, M., Toda, K., Kawamoto, T., Kuribayashi, I., Ogawa, Y., Maeda, T., and Shizuta, Y. 1991. Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **288**: 231-237.
- 93.- Terrazas, L.I., Morales, J., Bojalil, R., Govezensky, T., and Larraide, C. (1997). Shift from a TH1 protective immune response to a TH2 late permissive response during murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. Manuscript in revision.
- 94.- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., and Larraide, C. (1994): A role for 17 $\beta$ -estradiol in immunoenocrine regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. **89**: 563-568.
- 95.- Thompson AM, Steel CM, Foster ME, Kerr D, Paterson D, Deane D, Hawkins RA, Carter DC and Evan HJ. (1990). Gene expression in oestrogen-dependent human breast cancer xenograft tumours. *British Journal of Cancer*. **62**: 78-84.
- 95.- Travers MT and Knowler JT. (1987). Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus. *FEBS Letters*. **211**: 27-30.

- 97.- Truss M and Beato M (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Reviews*. 14: 459-479.
- 98.- Valdez, F., Hernández, M., Govezensky, T., Fragoso, G., and Sciuotto, E. (1994): Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of Parasitology*. 80: 931-936.
- 99.- Vaux L. David. (1993). Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 786-789.
- 100.- Voss A.K. and Fortune J.E (1993) : Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17(-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 132: 2239-2245.
- 101.- Wallis, C.J., and Lutge W.G (1975): Maintenance of male sexual behavior by combined treatment with oestrogen and dihydrotestosterone in CD-1 mice. *Journal of Endocrinology* 68: 257-262.
- 102.- Watson J.M., Sensintaffar J.L., Berek S.J. and Martinez-Maza O. (1990) : Constitutive production of interleukin-6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. *Cancer Research*. 50, 6959-6965
- 103.- Webb DK, Moulton BC and Khan SA. (1993). Estrogen induces expression of *c-jun* and *jun-B* protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology*. 133: 20-28
- 104.- Weisz A and Bresciani F. (1988). Estrogen induces expression of *c-fos* and *c-myc* protooncogenes in rat uterus. *Molecular Endocrinology*. 2: 816-824.

105.- Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M and Bresciani F. (1990). Estrogen stimulates transcription of *c-jun* protooncogene. *Molecular Endocrinology*. 4: 1041-1050.

106.- Yamaguchi M., Matsuzaki N., Hirota K., Miyake A. and Tanizawa O. (1993): Interleukin-6 possibly induced by interleukin-1 in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinologica*. 122: 101-205.