



CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA, BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS

**“Efecto de reguladores de las enzimas esteroideogénicas
en ténidos y caracterización funcional de la
17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.”**

T E S I S

Que presenta

M.C. M.V.Z. ALEJANDRA ACEVES RAMOS

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
FISIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR**

Directora de la Tesis:

Dra. Marta C. Romano Pardo

México, D.F.

Diciembre, 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN.

A CONACYT por la beca otorgada durante mi formación en el Doctorado, con el número de becario 168289.

A mi directora de tesis: Dra. Marta C. Romano Pardo

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Dr. Raúl Bobes Ruiz

Dr. Arturo Ponce Balderas

A los miembros de mi Jurado:

Dr. Raúl Bobes Ruiz

Dr. Arturo Ponce Balderas

Dra. María del Refugio García Villegas

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Dra. Marta C. Romano Pardo

También agradezco a Paty de la Torre por su apoyo en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, no sé qué habría hecho sin ti, tu paciencia y conocimientos.

A los Ricardo Valdez, Jesús y Armando, gracias por toda su ayuda en el laboratorio.

A Lorena Hinojosa, aprendí mucho de ti.

A mis compañeros de laboratorio: Alba, Toño, Domingo

A mis compañeros del otro laboratorio: José, Bárbara, Yanis, Milka, Juliet, Adriana. Gracias por su amistad y por todo el apoyo durante mi estancia en IIB.

A la Dra. María del Refugio García Villegas, al Dr. Raúl Bobes Ruiz y al Dr. Juan Pedro Laclette, por permitirme trabajar en sus laboratorios, el material y equipo que me permitieron utilizar para la realización de mis experimentos.

A mi familia, por todo su apoyo incondicional y paciencia para concluir esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

A Leopoldo

Por estar en mi vida todo este tiempo a pesar de las adversidades.

Gracias amor por confiar en mí y alentarme a seguir adelante.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	IV
CONTENIDO	V
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
TAENIA SOLIUM	5
<i>Clasificación taxonómica</i>	6
<i>Ciclo de vida</i>	7
<i>Cisticercosis en humanos</i>	8
<i>Tratamiento de la cisticercosis humana</i>	10
MODELOS MURINOS DE CISTICERCOSIS	11
<i>Taenia crassiceps ORF</i>	11
<i>Taenia crassiceps WFU (Wake Forest University)</i>	12
OBTENCIÓN DE TENIAS EN HÁMSTER	12
MARCO TEÓRICO	13
1. BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES SEXUALES Y CORTICOSTEROIDES	13
2. SECRECIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE ESTEROIDES SEXUALES Y CORTICOSTEROIDES	15
ESTEROIDES SEXUALES	16
CORTICOSTEROIDES	17
<i>Glucocorticoides:</i>	17
<i>Mineralocorticoides</i>	19
3. EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS ESTEROIDES SEXUALES Y LOS CORTICOSTEROIDES	20
<i>Esteroides sexuales</i>	20
<i>Corticosteroides</i>	21
4. RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES Y MINERALOCORTICOIDES	21
5. RECEPTORES DE ESTEROIDES SEXUALES	23
6. EFFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES SOBRE EL DESARROLLO DE CISTICERCOS DE T. CRASSICEPS	23
7. SÍNTESIS DE ESTEROIDES POR CISTICERCOS Y TENIAS IN VITRO	24
8. ANTECEDENTES SOBRE LA SÍNTESIS DE GLUCOCORTICOIDES Y MINERALOCORTICOIDES EN PARÁSITOS	25
9. EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON PARÁSITOS SOBRE ASPECTOS REPRODUCTIVOS DEL HUÉSPED	26
10. FÁRMACOS INHIBIDORES DE ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS	27
<i>Danazol</i>	27
<i>Ketoconazol</i>	28
<i>Inhibidores de P450-aromatasa</i>	29
11. 17B HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (17B-HSD) UNA ENZIMA CLAVE EN LA BIOSÍNTESIS DE ANDRÓGENOS	30
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
HIPÓTESIS 1	35
HIPÓTESIS 2	35
OBJETIVO	36
OBJETIVO 1	36
OBJETIVOS 2	36
MATERIAL Y MÉTODOS:	37

OBTENCIÓN DE CISTICERCOS.....	37
SÍNTESIS DE ESTEROIDES	37
TRATAMIENTO CON LOS INHIBIDORES	38
EXTRACCIÓN DE LOS ESTEROIDES DEL MEDIO DE CULTIVO	38
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).....	39
OBTENCIÓN DE RNA Y RT-PCR DE 17 β -HSD DE CISTICERCOS DE T. SOLIUM	39
TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK293-T	40
ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
RESULTADOS	43
EFECTO DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES SEXUALES POR CISTICERCOS DE T. CRASSICEPS WFU	43
<i>Efecto del formestane sobre la síntesis de esteroides sexuales por el cisticerco.....</i>	<i>43</i>
<i>Efecto del danazol sobre la síntesis de esteroides sexuales por el cisticerco</i>	<i>46</i>
<i>Effecto del ketoconazol sobre la síntesis de esteroides sexuales sobre el cisticerco de T. crassiceps</i>	<i>48</i>
CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA 17 β -HSD DE CISTICERCOS DE T.SOLIUM	50
<i>El genoma de T.solium contiene el gen 17β-HSD que codifica para una proteína Tsol-17βHSD</i>	<i>50</i>
<i>Homología de la proteína Tsol17β-HSD</i>	<i>51</i>
<i>Análisis filogenético.....</i>	<i>52</i>
<i>Ensayo enzimático.....</i>	<i>55</i>
DISCUSION	57
EFECTO DE INHIBIDORES DE LA RUTA ESTEROIDOGENICA.....	57
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENZIMA 17 β -HSD	58
CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	62
BIBLIOGRAFIA.....	63
ANEXOS.....	78

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIG. 1. DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE TENIAS.....	6
FIG. 2. CICLO DE VIDA DE LA <i>T. SOLIUM</i>	9
FIG. 3. NÚCLEOS BÁSICOS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE HORMONAS ESTEROIDES.....	14
FIG. 4. BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES	15
FIG. 5. SÍNTESIS DE METABOLITOS EN DIFERENTES TEJIDOS	16
FIG. 6. INHIBICIÓN DE LA CRH HIPOTALÁMICA Y DE LA ACTH	19
TABLA 1. RELACIÓN ENTRE METABOLITOS Y HORMONAS	19
FIG. 6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES	22
FIG. 8. FORMAS ACTIVAS E INACTIVAS DE ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS	30
TABLA 2. DOSIS Y PERIODOS DE INCUBACIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LA ESTEROIDOGÉNESIS EMPLEADOS	38
FIG. 9. EFECTO DE 100 UM DE FORMESTANE SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES POR CISTICERCOS (200 ML) DE <i>T. CRASSICEPS</i> WFU INCUBADOS CON ANDROSTENEDIONA TRITIADA COMO PRECURSOR.....	44
FIG. 10. EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FORMESTANE SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTRADIOL POR CISTICERCOS DE <i>T. CRASSICEPS</i> WFU (200 ML) INCUBADAS EN PRESENCIA DE ANDROSTENEDIONA TRITIADA	45
FIG. 11. CURVA TEMPORAL DEL EFECTO DE 100 NM DE DANAZOL SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES SEXUALES DE CISTICERCOS DE <i>T. CRASSICEPS</i> WFU INCUBADOS CON DHEA TRITIADA COMO PRECURSOR.....	46
FIG. 12. EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DANAZOL SOBRE LA SÍNTESIS DE ³ H-17B-ESTRADIOL POR CISTICERCOS DE <i>T. CRASSICEPS</i> WFU INCUBADOS EN PRESENCIA DE DHEA TRITIADA POR 24 H	47
FIG 13. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KETOCONAZOL SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES SEXUALES POR CISTICERCOS DE <i>T. CRASSICEPS</i> WFU CULTIVADOS EN PRESENCIA DE ANDROSTENEDIONA TRITIADA.....	48
FIG. 14. EFECTO DOSIS-RESPUESTA Y TIEMPO DE RESPUESTA DEL KETOCONAZOL SOBRE LA SÍNTESIS DE DOC POR CISTICERCOS DE <i>T. CRASSICEPS</i> WFU INCUBADOS EN PRESENCIA DE PROGESTERONA TRITIADA.	49
FIG. 15. LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA HIPOTÉTICA TSOL-17BHS.....	50
FIG. 16. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL FRAGMENTO GENÓMICO QUE CONTIENE AL GEN TSOL- 17HSD.....	51
TABLA 3. HOMOLOGÍA DE LA PROTEÍNA TSOL-17BHS CON LA DE OTRAS ESPECIES CUYA FUNCIÓN SE HA REPORTADO	52
FIG. 18. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	54
FIG. 19. PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA POR CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS CON TSOL- 17BHS-PCDNA3.1(+).	55
FIG. 20. PRODUCCIÓN DE ESTRADIOL POR CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS CON TSOL-17BHS- PCDNA3.1(+).	56

RESUMEN

Los cisticercos y gusanos de *Taenia crassiceps* WFU, ORF y *Taenia solium* sintetizan hormonas esteroides *in vitro*. Los corticosteroides incrementan la síntesis de 17-estradiol en cisticercos de *T. crassiceps*. Los cisticercos de *T. crassiceps* WFU sintetizan corticosteroides, principalmente 11-deoxicorticosterona (DOC). Las 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (17 β -HSD) son enzimas clave involucradas en la formación (reducción) e inactivación (oxidación) de esteroides sexuales. Varios tipos de estas enzimas han sido halladas en vertebrados incluyendo a los peces, así como, en invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), *Ciona intestinalis* y *Haliotis diversicolor supertexta*. A la fecha la información disponible está limitada acerca de esta enzima en parásitos.

Este trabajo tiene dos motivos de estudio: a) investigar si los inhibidores esteroideogénicos clásicos modifican la capacidad de los cisticercos de *T. crassiceps* WFU para sintetizar corticosteroides y hormonas esteroides sexuales, y b) identificar una 17 β -HSD funcional en el cisticerco de *T. solium*.

En la primera parte de este trabajo, cisticercos de *T. crassiceps* WFU fueron obtenidos de la cavidad abdominal de ratones, preincubados por 24 h en DMEM más antibióticos/antimicóticos y cultivados en la presencia de progesterona, androstenediona o dehidroespiandrosterona tritiada ($^3\text{H-P}_4$, $^3\text{H-A}_4$, $^3\text{H-DHEA}$) más diferentes dosis de inhibidores correspondiente, por diferentes periodos de tiempo. Blancos con el medio de cultivo más precursores tritiados fueron incubados simultáneamente. Al término de los periodos de incubación, los parásitos fueron separados y el medio fue extraído con éter. Los esteroides resultantes fueron separados por cromatografía en capa delgada (TLC). Los resultados fueron expresados como porcentaje de transformación del precursor tritiado.

Para la segunda parte: La secuencia obtenida *in silico* de la base de datos del genoma de *T. solium* fue amplificada por RT-PCR y clonada en un vector de expresión pcDNA3.1(+). Se realizó una transfección transitoria en células HEK-293T con Tsol-17 β HSD, cultivado e incubado con ^3H -androstenediona

y ^3H -estrona, y se obtuvo el medio y se extrajeron con éter los esteroides, los cuales se separaron con TLC como se describió anteriormente.

Los resultados de estos estudios fueron los siguientes:

a) Se encontró que después de 2 h de exposición de los cisticercos a 100 μM de formestane, la síntesis de ^3H -17 β -estradiol a partir de androstenediona tritiada fue inhibida significativamente. La incubación de cisticercos en la presencia de ^3H -DHEA y danazol (100 nM) resultó en la acumulación de ^3H -androstenediol y una reducción significativa de la síntesis de 17 β -estradiol. La síntesis de ^3H -DOC en cisticercos fue significativamente inhibida cuando los parásitos fueron incubados en la presencia de diferentes dosis de ketoconazol.

b) El tamaño total del cDNA del Tsol-17 β HSD contiene 957 bp, corresponden a un marco de lectura abierto que codifica para 319 aa. La expresión inducida de Tsol-17 β HSD transforma ^3H -androstenediona en testosterona. En contraste, ^3H -estrona no fue significativamente transformada en estradiol. La mayor identidad (84%) a nivel de proteína fue encontrado con la 17 β HSD de *Echinococcus multilocularis*, aunque fueron encontradas similitudes significativas con otras secuencias de 17 β HSD de invertebrados y vertebrados. La Tsol-17 β HSD de *T. solium* corresponde a la superfamilia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR).

En conclusión, fue demostrado que la síntesis de corticosteroides y los esteroides sexuales del cisticerco de *T. crassiceps* pueden ser modificada por inhibidores de las enzimas esteroides. Por lo tanto, la inhibición de su síntesis es un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos, o el reemplazo de las terapias usadas en infecciones parasitarias resistentes a los fármacos. Además el cisticerco de *T. solium* expresa una 17 β -HSD que cataliza la reducción de andrógenos. La enzima pertenece a superfamilia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta y comparte motivos y actividad con la 17 β -HSD tipo 3 de otras especies de mamíferos.

Palabras clave: síntesis de esteroides; cisticerco de *Taenia solium*; cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU, formestane, danazol, ketoconazol, 17 β -HSD.

ABSTRACT

Cysticerci and tapeworms from *Taenia crassiceps* WFU, ORF and *Taenia solium* synthesize sex-steroid hormones *in vitro*. Corticosteroids increase the 17β -estradiol synthesis by *T. crassiceps* cysticerci. *T. crassiceps* WFU cysticerci synthesize corticosteroids, mainly 11-deoxy corticosterone (DOC). The 17β -hydroxysteroid dehydrogenases (17β -HSD) are key enzymes involved in the formation (reduction) and inactivation (oxidation) of sex steroids. Several types of these enzymes have been found in vertebrates including fish, as well as in invertebrates like *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), *Ciona intestinalis* and *Haliotis diversicolor supertexta*. To date limited information is available about this enzyme in parasites.

This work had two study reasons: a) to investigate whether classical steroidogenic inhibitors modify the capacity of *T. crassiceps* WFU cysticerci to synthesize corticosteroids and sex steroid hormones, and b) to identify a functional 17β -HSD in the *T. solium* cysticerci.

In the first part of this work, *T. crassiceps* WFU cysticerci were obtained from the abdominal cavity of mice, pre-incubated for 24 h in DMEM + antibiotics/antimycotics and cultured in the presence of tritiated progesterone ($^3\text{H-P}_4$), androstendione ($^3\text{H-A}_4$), or dehydroepiandrosterone ($^3\text{H-DHEA}$) plus different doses of the corresponding inhibitors, for different periods. Blanks with the culture media adding the tritiated precursors were simultaneously incubated. At the end of the incubation period, parasites were separated and media extracted with ether. The resulting steroids were separated by thin layer chromatography (TLC). Data were expressed as percent transformation of the tritiated precursors.

And for the second part: The coding obtained through *in silico* blast searches in the *T. solium* genome database sequence was amplified by RT-PCR and cloned into the pcDNA 3.1(+) expression vector. HEK293T cells transiently transfected with *Tsol17 β -HSD*, cultured and incubated with ^3H -androstenedione and ^3H -estrone, and like above were obtained the media and extracted with ether, and the steroids were separated with TLC.

The results of these studies:

a) Results showed that after 2 h of exposure of the cysticerci to 100 μ M formestane, the ^3H -17 β -estradiol synthesis from tritiated androstendione was significantly inhibited. The incubation of cysticerci in the presence of ^3H -DHEA and danazol (100 nM) resulted in ^3H -androstendiol accumulation and a significant reduction of the 17 β -estradiol synthesis. The cysticerci ^3H -DOC synthesis was significantly inhibited when the parasites were cultured in the presence of different ketoconazol dosis.

b) The full length cDNA Tsol17 β -HSD contains 957 bp, corresponding to an open reading frame coding for 319 aa. The induced expression of Tsol17 β -HSD transformed ^3H -androstenedione into testosterone. In contrast, ^3H -estrone was not significantly transformed into estradiol. The highest identity (84%) at the protein level was found with the *Echinococcus multilocularis* 17 β -HSD although significant similarities were also found with other invertebrate and vertebrate 17 β -HSD sequences. The *T. solium* Tsol-17 β HSD belongs to the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) protein superfamily.

In conclusion, it was showed that corticosteroid and sex steroid synthesis in *T. crassiceps* WFU cysticerci can be modified by steroidogenic enzyme inhibitors. Therefore the inhibition of their synthesis is a good starting point for the development of new treatments, or replacement of the usual therapy in resistant parasite infections. Additionally the *T. solium* cysticerci express a 17 β -HSD that catalyzes the androgen reduction. The enzyme belongs to the short chain dehydrogenases/reductase family and shares motifs and activity with the type 3 enzyme of other mammal species.

Key words: Steroid synthesis; parasites; *Taenia solium* cysticerci; *Taenia crassiceps* cysticerci WFU; formestane; danazol; ketoconazole; 17 β -HSD; cloning; transfection.

Introducción

Taenia solium

El agente causal de la cisticercosis humana y porcina es el metacestodo o cisticerco de *Taenia solium*. El cisticerco es la forma larvaria en el desarrollo de este parásito, está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, con un pequeño escólex invaginado (Figura 1A), al igual que la tenia adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rostelo armado con dos hileras de ganchos. Esta fase larvaria se encuentra entre la de embrión hexacanto (con seis ganchos) (Figura 2B) y el gusano adulto o solitaria. Puesto que el humano es el único huésped definitivo natural de la *T. solium*, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo (principal huésped intermediario).

En condiciones naturales, la *T. solium* habita únicamente en el intestino delgado del ser humano. Su nombre común alude a que en la mayor parte de los casos se encuentra un solo gusano en cada portador; sin embargo, no es raro encontrar más de una tenia en el mismo paciente. Estos gusanos se adhieren a la pared intestinal del huésped definitivo por el escólex o cabeza. El escólex es seguido por el cuello, a continuación crecen los segmentos del cuerpo o proglótidos (Figura 3C). Los proglótidos juntos forman la estrobila, o cuerpo del gusano; el número de proglótidos en el gusano adulto depende de las especies. Los proglótidos tienen músculos longitudinales y transversos y son mótils. Cada proglótido tiene además órganos reproductivos masculinos y femeninos, pero el emparejamiento usualmente ocurre con segmentos adyacentes, más que por auto-fertilización (Figura 1D). Los proglótidos distales del escólex son los más viejos y contienen huevos maduros o inmaduros (Larralde y Aluja, 2006).

Los céstodos no tienen sistema digestivo o circulatorio y pueden absorber nutrientes del lumen del intestino delgado del huésped a través de las microvellosidades del tegumento. Estas cubren la superficie de cada proglótido y excretan desperdicios a través de un par de túbulos secretores.

Tienen un sistema nervioso rudimentario que consiste de un ganglio en el escólex y nervios en los proglótidos.

Aunque el cerdo es el principal huésped intermediario de la *T. solium*, algunas otras especies, incluyendo al hombre, también pueden alojar cisticercos.

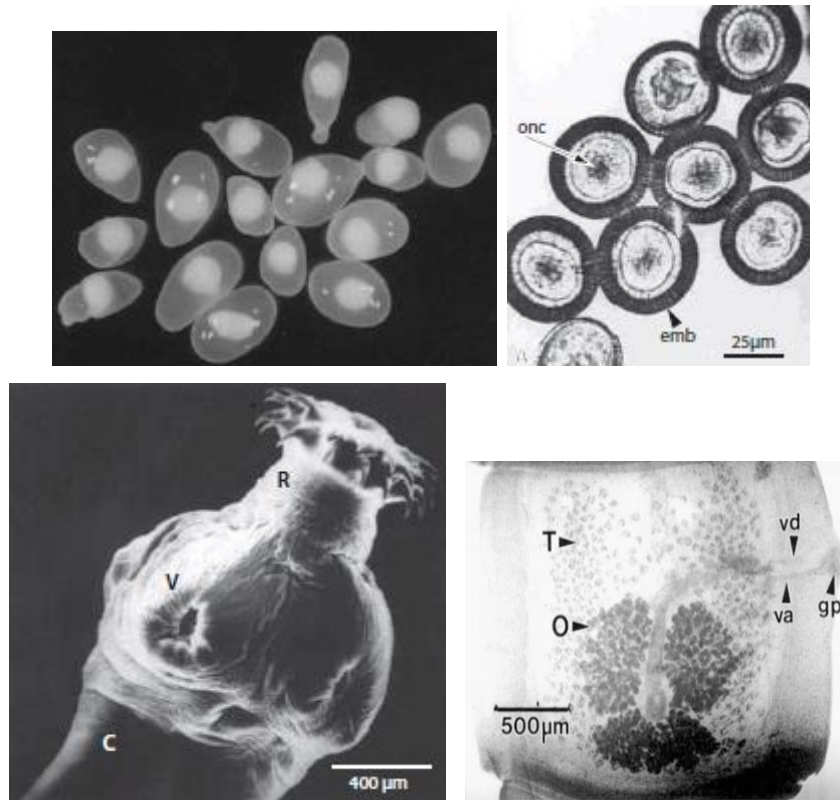


Fig. 1. Diferentes estadios de desarrollo de tenias. A. Cisticercos de *T. solium*. B. Huevecillos observados a microscopio de luz. C. Escólex de *T. solium*. D. Proglótido maduro de *T. crassiceps*, donde se observan testículos (T) y ovarios (O) (tomado de Larralde y Aluja, 2006)

Clasificación taxonómica

-Reino: Animal

-Phylum: Platyhelminthes, metazoos planos con cavidad general que está rellena de parénquima. El cuerpo está recubierto por el tegumento, en el que se distinguen pequeñas microvellosidades, llamadas microtriquias o “microvilli”. Incluye además de la clase Cestoidea, a la clase Trematoda con importantes parásitos en el hombre.

-Clase: Cestoidea, con cuerpo cintiforme y segmentado, carecen de tubo digestivo y su nutrición se realiza a través del tegumento. Se alimenta del

contenido intestinal del hospedero, carece de aparato digestivo propio y la captación y asimilación del alimento se lleva a cabo en el sincitio celular del tegumento, el cual absorbe moléculas orgánicas de bajo peso molecular por difusión o transporte activo, y probablemente también por endocitosis (Noble et al., 1989). Son hermafroditas, por lo tanto cada proglótide tiene sistema reproductor femenino (ovarios, útero, vagina) y masculino (testículos, tubo deferente, vesícula seminal).

-Subclase: *Eucestoda*, cuerpo dividido en proglótides, con uno o más pares de órganos reproductores por segmento, parasitismo entérico.

-Orden: *Cyclophyllidea*, tienen como órgano de fijación en la porción cefálica del parásito, o escólex, cuatro estructuras de naturaleza muscular denominadas ventosas y un rostelo muscular, generalmente armado con ganchos. Los huevos no contienen larvas ciliadas.

Familia: *Taeniidae*, son céstodos de tamaño mediano o grande; las proglótides poseen poros genitales irregularmente alternos.

Género: *Taenia*

Especies: *T. solium*, *T. asiática*, *T. saginata* (Eom, 2006; Kim et al., 2007).

Ciclo de vida

La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevos de *T. solium*, es propiciada por deficiente higiene personal, de alimentos y domiciliaria en el manejo de las excretas humanas y en particular por la convivencia con un portador del gusano adulto. Una vez en el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación de la oncósfera (embrión hexacanto) contenida en el huevecillo (Figura 1-3). Los embriones activados penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos, que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético y cardíaco, cerebro). Aunque se desconocen muchos eventos que ocurren después de la penetración de los embriones, lo que sí se sabe es que se requiere de cuando menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco (metacéstodo enquistado) y que éste puede sobrevivir por

varios años en los tejidos del huésped intermediario (Figura 1-4) (Larralde y Aluja, 2006).

El ciclo se completa cuando el ser humano ingiere cisticercos vesiculares presentes en la carne cruda o poco cocida proveniente de un cerdo cisticercoso (Figura 1-1). Nuevamente las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares del huésped, participan en la activación del cisticerco, induciendo la evaginación del escólex y su fijación en la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos (figura 1) (Larralde y Aluja, 2006).

Cisticercosis en humanos

Si bien, el cerdo es el principal huésped intermediario de la *T.solium*, el hombre también puede alojar cisticercos (Figura 1-5). El estado larvario o cisticerco se encuentra más frecuentemente en tejidos subcutáneos, musculares, en el ojo y en el cerebro. Los síntomas que produce varían de acuerdo con el número de parásitos y el tejido invadido (Fleury *et al.*, 2004)

La cisticercosis es una parasitosis endémica en la mayoría de los países de América Latina, África y Asia. La forma más sintomática de la enfermedad ocurre cuando los parásitos se localizan en el sistema nervioso central, causando la neurocisticercosis (NC). Una de las características de la NC es su gran heterogeneidad a nivel clínico, radiológico e inflamatorio (Fleury *et al.*, 2004). Las causas que determinan esta heterogeneidad no están totalmente dilucidadas por el momento, pero participan seguramente factores propios del parásito, localización del quiste y respuesta inmune del hospedero así como la intensidad de la exposición al parásito.

En relación con los factores del hospedero, diferentes observaciones sugieren la participación de la edad, del estado genético, del género así como del nivel de estrés. Se ha demostrado que la expresión clínica, radiológica e inflamatoria de la NC difiere significativamente entre niños y adultos (Fleury *et al.*, 2003). En los primeros, la forma más frecuente es un parásito único, en estado de degeneración (coloidal), localizado en el parénquima o en el espacio subaracnoideo de los surcos corticales. En los

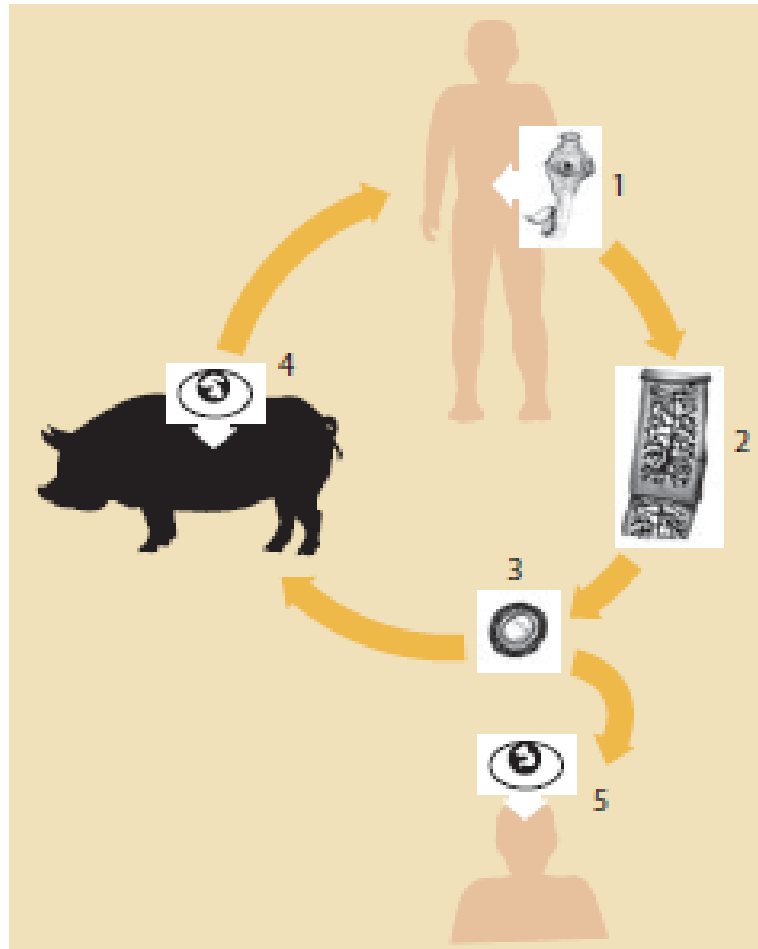


Fig. 2. Ciclo de vida de la *T. solium* (tomado de Larralde y Aluja, 2006)

adultos sintomáticos, la localización en el espacio subaracnoideo de la base o en el ventrículo, que causa las formas más severas, es muy frecuente.

Escobar en 1983 describió las fases por las que atraviesa el cisticerco desde que llega al sistema nervioso central hasta su calcificación.

- Fase vesicular: el parásito es viable, la membrana vesicular es delgada, el líquido vesicular es transparente, el escólex invaginado es de aspecto normal y no se observan cambios inflamatorios en el tejido cerebral que lo rodea.
- Fase coloidal: la pared del quiste se engrosa rodeándose de una densa capa de colágeno y el escólex muestra signos de degeneración hialina. El parénquima cerebral circundante se encuentra edematoso y muestra intenso infiltrado inflamatorio, compuesto por linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas.

- Fase granular: la reacción inflamatoria abarca al parásito propiamente dicho, el cual ya no es viable.
- Fase calcificada: finalmente el cisticerco llega a esta fase transformándose en un nódulo calcificado e inerte y los cambios inflamatorios perilesionales suelen ser intensos y persisten así durante años.

Relativo al género, aunque la mayoría de los estudios epidemiológicos generales encuentren una prevalencia similar en hombres y mujeres (Sotelo *et al.*, 1985), existen claras diferencias en otros aspectos. Una de las formas graves de la enfermedad, llamada encefalítica, caracterizada por la presencia de múltiples parásitos parenquimatosos que generan una reacción inflamatoria importante, es mucho más frecuente en las mujeres jóvenes (Rangel *et al.*, 1987). Asimismo, se ha demostrado que la reacción inflamatoria, independientemente de la localización del parásito, es más frecuente e intensa en mujeres que en hombres (Del Brutto *et al.*, 1988; Fleury *et al.*, 2004). Por último, mediante estudios serológicos se ha demostrado que las mujeres presentan mayores títulos de anticuerpos que los hombres (Larralde *et al.*, 1992).

Tratamiento de la cisticercosis humana

El tratamiento específico de la cisticercosis del parénquima cerebral con resultados satisfactorios comenzó en América Latina en 1980 con el uso de praziquantel y posteriormente con albendazol (antihelmíntico del grupo de los benzimidazoles). Durante la administración de estos fármacos los pacientes pueden presentar trastornos neurológicos, incluyendo cefalea, vómitos, vértigos, convulsiones, dificultad motora o hipertensión endocraneana. Son reacciones colaterales que se manifiestan en los primeros días del tratamiento y que están relacionadas con la intensa inflamación desarrollada por el hospedero en respuesta a la destrucción aguda de los cisticercos en el cerebro (Escobedo *et al.*, 1987; Takayanagui y Jardim, 1992).

Estudios realizados con albendazol (Escobedo *et al.*, 1987; Botero *et al.*, 1993) demostraron que los índices de curación de neurocisticercosis con albendazol superaban a los obtenidos con praziquantel, siendo además el albendazol de menor costo y de más fácil obtención. Los efectos secundarios también se presentan con albendazol y dependen de la inflamación cerebral originada en la destrucción de los quistes y no de un efecto directo de los antihelmínticos (Escobedo *et al.*, 1987). Es conveniente hospitalizar a los pacientes, al menos la primera semana del tratamiento, porque es cuando los efectos secundarios colaterales se presentan con mayor frecuencia. El uso de esteroides está indicado para contrarrestar dichos efectos (Botero *et al.*, 1993).

Modelos murinos de cisticercosis

Ante la dificultad de experimentar con cisticercos en el humano, y para conocer y definir diversos factores biológicos relacionados, se han utilizado modelos de cisticercosis experimental murina. Uno de ellos es la de cisticercos de *Taenia crassiceps*, el cual es un platelminto cuya forma adulta se encuentra usualmente en el intestino de zorros rojos norteamericanos o europeos (Delvalle, 1989). La etapa larvaria o el cisticerco se desarrolla en un roedor llamado ratón de las praderas, quien adquiere la infección por ingestión de los huevos provenientes de las heces de los zorros. En los roedores infestados de manera natural, los huevos se desarrollan a cisticercos que pueden multiplicarse asexualmente y se alojan en diversos tejidos y cavidades del cuerpo del roedor, el cual es por lo tanto, el hospedero intermediario natural del parásito (Toenjes *et al.*, 1999).

Al igual que en *T. solium*, la *T. crassiceps* está compuesta por varios proglótidos y cada uno de estos es una unidad reproductiva funcional con testículos y ovarios (Willms *et al.*, 2004).

Taenia crassiceps ORF

La cepa ORF (Larralde *et al.*, 1995) son cisticercos de *T. crassiceps* los cuales no presentan escólex, y se multiplican por gemación en la cavidad

peritoneal de ratones. En este modelo se han estudiado las interacciones inmunoendócrinas que ocurren entre el hospedero y el parásito entre otras (Fox *et al.*, 1971; Terrazas *et al.*, 1994). En este modelo ofrece diversas ventajas, que incluyen la posibilidad de realizar un número grande de experimentos, la facilidad operativa y las semejanzas en el ciclo biológico, estructura, antigenicidad. Experimentalmente puede inducirse la infección con la inyección intraperitoneal de los cisticercos. La reproducción del parásito por gemación, produce una gran población de parásitos homogéneos. Esta característica del cisticerco, que no comparte con *T. solium*, permite además cultivarlo, lo que facilita los estudios *in vitro* (Huerta *et al.*, 1992).

Taenia crassiceps WFU (Wake Forest University)

Asimismo se han utilizado cisticercos de otra cepa, llamada *T. crassiceps* WFU, que también se reproducen en la cavidad abdominal del ratón, tienen la ventaja de tener una larva capaz de evaginar, puede mantenerse en cultivo, y también comparte características antigénicas con el cisticerco de *T. solium*, por lo que es un modelo experimental más cercano a éste (Everhart *et al.*, 2004).

Obtención de tenias en hámster

Es posible obtener experimentalmente tenias de *T. solium* en hámsteres infectados con cisticercos por vía oral. La longitud del crecimiento de las tenias en el hámster puede variar, pero los proglótidos grávidos con huevos viables se encuentran en el proglótido 82, entre los días 24 a 37 post-inoculación. El escólex tiene cuatro ventosas y el rostelo tiene ganchos con forma de espinas. También pueden desarrollarse en hámsters las *T. crassiceps* WFU, que son más pequeños que los de *T. solium* (Willms y Zurabian, 2010).

Marco Teórico

1. Biosíntesis de esteroides sexuales y corticosteroides

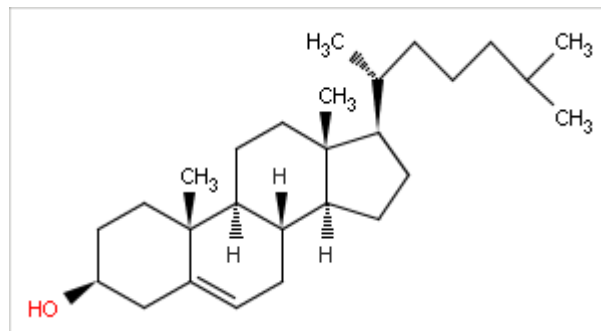
Las hormonas esteroides son derivadas del colesterol. La estructura química básica de los esteroides son cuatro anillos aromáticos (tres ciclohexanos y uno ciclopentano), conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 2). Sobre éste se agregan cadenas laterales que determinan las clases de esteroides, generando tres tipos básicos:

1. Esteroides de 21 átomos de carbono: son las hormonas responsables de las funciones endócrinas de la corteza suprarrenal. Se clasifican en: I)glucocorticoides (GC), que tienen acción básica sobre el metabolismo hidrocarbonado y proteínico (principalmente la cortisona y la hidrocortisona); además tienen acciones relacionadas con la función inflamatoria y con la función inmune. II)mineralocorticoides (MC), que participan en el equilibrio hidroelectrolítico (la aldosterona).
2. Esteroides de 19 átomos de carbono: los andrógenos son las hormonas sexuales masculinas, cuya principal función es estimular la aparición de caracteres masculinos.
3. Esteroides de 18 átomos de carbono: se conocen como estranos, hormonas sexuales femeninas, los cuales tienen diferentes efectos, como el desarrollo de características femeninas (figura 1).

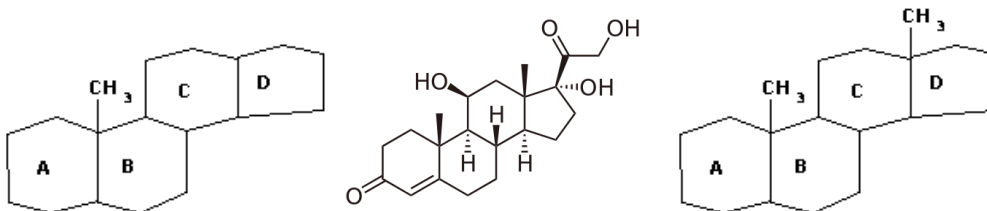
Así pues, existen tres tipos de hormonas esteroideas. Los esteroides sexuales, los mineralocorticoides y los glucocorticoides.

La biosíntesis de esteroides ocurre de dos formas: directamente del acetato, vía mevalonato, escualeno y colesterol o a partir del colesterol circulante en sangre procedente de la dieta. Dicha biosíntesis puede seguir posteriormente dos vías: la de la pregnenolona (vía $\Delta 5$), que es el pregnano del que derivan todos los demás esteroides; o la de la progesterona (vía $\Delta 4$), que ya muestra una estructura delta-4-3-ceto en su anillo A. Ambas progestinas sufren una hidroxilación en el carbono 17, antes de que ocurra una ruptura de ese mismo sitio y dé lugar a los andrógenos de 19 carbonos. La dehidroepiandrosterona (DHEA) se forma a partir de la 17 α -

hidroxipregnenolona, y puede ser reducida para formar androstenediol y posteriormente por la participación de la enzima deshidrogenasa esteroidea



Colesterol (C27)



Cortisol (C21)

Androstano (C19)

Estrano (C18)

Fig. 3. Núcleos básicos de los diferentes tipos de hormonas esteroides

se forma testosterona. La 17α -hidroxiprogesterona por su parte es convertida directamente en androstenediona (A4) y posteriormente en testosterona. Esta hormona puede ser posteriormente reducida a dihidrotestosterona (5α o 5β). La androstenediona puede ser directamente aromatizada a estrona o primero convertirse en testosterona y después aromatizarse a estradiol. Es decir que los estrógenos son derivados de la testosterona y la androstenediona, por la aromatización del anillo A de estos andrógenos. La aromatización incluye una serie de reacciones complejas que consiste, entre otros pasos, en una serie de hidroxilaciones del carbono 19 seguidas de oxidaciones, la segmentación del grupo metilo del carbono 19, la aromatización del anillo esteroide A y la formación de estrógenos. El estradiol, que es el estrógeno más potente, resulta directamente de la aromatización de la testosterona, mientras que la estrona se obtiene por la

aromatización de la androstenediona (Beber y González-Flores, 2000) (figura 3).

En la síntesis de corticosteroides a partir de progesterona actúa primero la enzima 17α hidroxilasa y después la 21-hidroxilasa, estas enzimas son dos citocromos P-450 microsomales. El 11-desoxicortisol debe volver al interior de la membrana mitocondrial para que tenga lugar el último paso en la vía de síntesis de cortisol, una 11β -hidroxilación catalizada por un típico P-450 microsomal. La 11-desoxicorticosterona (DOC) formada por la 21-hidroxilación de la progesterona, pasa a la mitocondria y tras una 11β -hidroxilación se convierte en corticosterona. Esta se somete a una 18-hidroxilación seguida de una reacción oxidativa para formar aldosterona (figura 2).

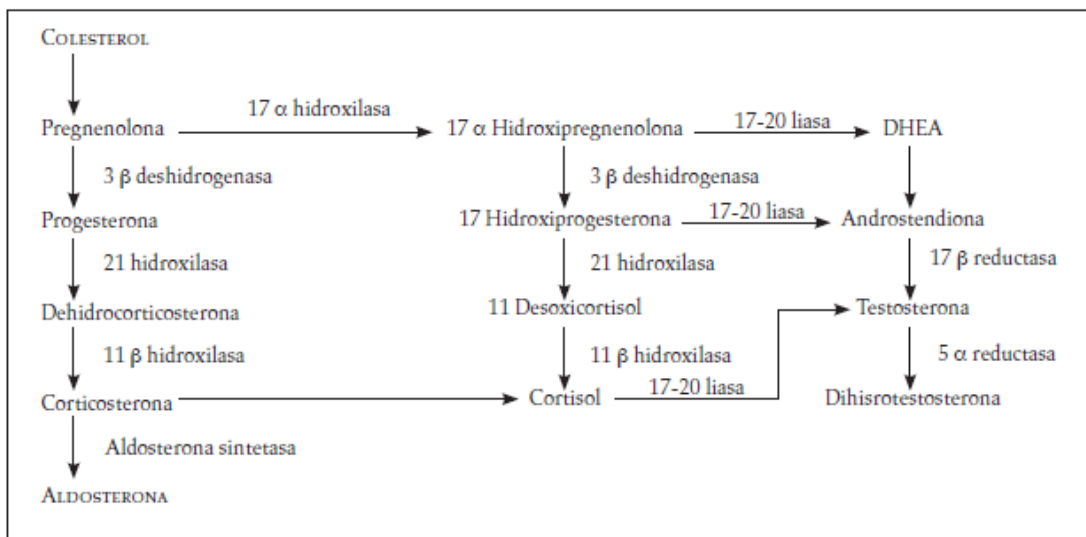


Fig. 4. Biosíntesis de esteroides (tomado de Gómez *et al.*, 2007)

2. Secreción, transporte y metabolismo de esteroides sexuales y corticosteroides

Los esteroides son sustancias hidrofóbicas. Las reacciones catabólicas, además de inactivar las hormonas activas fisiológicamente, sirven también para convertir las moléculas esteroides en productos más hidrofílicos. Las reacciones catabólicas en su mayoría son reductivas y ocurren sobre todo en el hígado. La solubilidad en agua de los metabolitos esteroides aumenta si se conjugan con ácido sulfúrico o glucurónico. La mayor parte de los

metabolitos esteroideos se eliminan en orina como sulfatos o conjugados glucuronados hidrosolubles formados principalmente en el hígado. La sulfoquinasa necesita sulfato activo, que es donado por la fosfoadenosinfosulfato (PAPS). La glucuronil transferasa utiliza ácido uridina difosfoglucurónico (UDPG) (Guillemette *et al.*, 2004)

Esteroides Sexuales

El colesterol, por la acción de distintas enzimas se transforma en diferentes esteroides sexuales, según el órgano donde tiene lugar su transformación: las adrenales, los ovarios o los testículos (fig. 4)

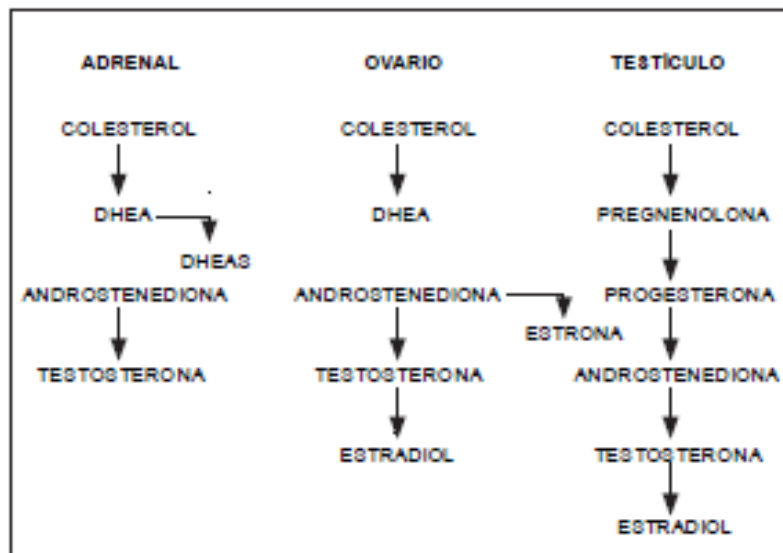


Fig. 5. Síntesis de metabolitos en diferentes tejidos (tomado de Becerro, 2008)

La acción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), estimula en la hipófisis anterior la producción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulante (FSH). En el macho, la LH actúa en las células de Leydig del testículo estimulando la síntesis de testosterona. En las células de Sertoli, ubicadas en el conducto seminífero, la testosterona se transforma en estradiol, por acción de la aromatasa. La testosterona, pasa a la circulación general y ejerce una acción negativa en forma retroactiva sobre la LH. En hembras, la acción de la LH sobre las células de la teca del ovario estimula

la síntesis de androstenediona, que en el interior de las células de la granulosa se transforma en 17β -estradiol por acción de la P450-aromatasa. Cualquiera de los esteroides sexuales mencionados es insoluble en agua, por lo que, para su transporte a través de la circulación necesita unirse a la albúmina (aproximadamente el 40% de la hormona) o a la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG). A la primera se une de forma débil y a la segunda se une con gran afinidad. Solo una pequeña cantidad de las hormonas, que no suele superar el 2% del total, circula no unida a una globulina, y se le denomina testosterona o estradiol libre. La hormona libre y la que va unida a la albúmina es conocida como biodisponible. La hormona penetra fácilmente en las células diana, donde ejerce su acción a través de unión al receptor específico (Guyton y Hall, 2011).

La testosterona se produce principalmente en el testículo, mientras que las glándulas adrenales son responsables de la producción de DHEA circulante. La forma más activa de la testosterona la constituye la dihidrotestosterona (DHT). Esta se origina por la acción de la enzima 5α reductasa sobre la testosterona. Su presencia es limitada en plasma, ya que la mayor parte se forma en los tejidos donde lleva a cabo su acción. Una buena parte de las acciones de la testosterona en tejidos periféricos se lleva a cabo en forma directa, tras convertirse en DHT y unirse con el receptor de andrógenos (RA).

Corticosteroides

Glucocorticoides: La producción de cortisol está regulada por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que se secreta por la hipófisis en picos irregulares a lo largo del día. Los picos de ACTH son más frecuentes en la madrugada y menos frecuentes por la tarde. Los traumatismos, la sobrecarga emocional y ciertos fármacos estimulan la secreción de hormona liberadora corticotropa (CRH) por terminaciones nerviosas en el hipotálamo posterior y eminencia media. La CRH se transmite por los vasos del sistema porta hipófisis-hipotálamo a la adenohipófisis y produce la liberación de ACTH (Guyton y Hall, 2011).

La hipoglucemia inducida por insulina, la vasopresina, los pirógenos bacterianos y el glucagón estimulan la secreción de ACTH y son la base de las pruebas de reserva hipofisiaria. La ACTH puede ejercer por sí misma una retroalimentación negativa de su propia liberación por la hipófisis, es lo que se denomina retroalimentación de asa corta. La tasa de secreción de ACTH es inversamente proporcional a la concentración de cortisol (retroalimentación negativa). El lugar de acción del cortisol en la supresión de la secreción de ACTH parece ser el hipotálamo, inhibiendo la liberación de CRH. La actividad frenadora hipofisiaria de los esteroides, es paralela a su potencia glucocorticoide. Sin embargo, la corticotropina se suprime de manera más eficaz por la medicación esteroide por la noche, cuando las concentraciones circulantes de cortisol son tan bajas como la tasa de liberación de ACTH (figura 5) (Guillemette *et al.*, 2004).

La mayor parte del cortisol circulante está unido a una α 2-globulina llamada transcortina o globulina transportadora de cortisol (CBG), ésta posee un único sitio de unión. El cortisol también se fija a la albumina, pero en menor grado que a la CBG. También se fijan a la CBG corticosterona, 11-desoxicortisol, 17α -hidroxiprogesterona, desoxicorticosterona, progesterona, cortisona y aldosterona, pero en menor grado que el cortisol. Los esteroides sintéticos dexametasona y 9α -fluorohidrocortisol se fijan solo débilmente a la CBG. La vida media del cortisol en la circulación es de 60-90 minutos. La CBG se sintetiza en el hígado y su producción aumenta por acción de los estrógenos (Becerro, 2004).

En la circulación, el cortisol y la cortisona pueden interconvertirse por acción de la oxidorreductasa 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que cataliza la conversión de los grupos 11β -hidroxilo y 11-oxo, para catabolizarse y eliminarse en orina como se indica en la siguiente tabla 1:

estimula por la angiotensina II, la ACTH y el potasio y se conoce como el primer paso. El segundo nivel o último paso en la conversión de corticosterona a aldosterona, se estimula por el potasio y por las altas concentraciones de angiotensina II. La depleción de sodio, aumenta la síntesis de aldosterona en la zona glomerular mediante el aumento en la tasa de escisión de la cadena lateral del colesterol y en la conversión de corticosterona a aldosterona. La primera fase se estimula por mecanismos dependientes de calcio; se desconoce el mecanismo de estimulación por potasio en la última fase. La aldosterona se cataboliza de manera similar al cortisol con formación de $3\alpha,5\beta$ -tetrahydroaldosterona (Dluhy y Lifton, 1999).

3. Efectos fisiológicos de los esteroides sexuales y los corticosteroides

Esteroides sexuales

Tanto machos como hembras producen andrógenos y estrógenos; aunque sus cometidos más importantes se relacionan con la reproducción, los tejidos diana sobre los que actúan las hormonas sexuales son numerosos y se hallan presentes en los individuos de ambos géneros, como por ejemplo: huesos, sistema vascular, sistema nervioso central, gastrointestinal, genitourinario, inmunitario, piel, pulmones, riñones y aparatos reproductores del macho y la hembra.

Los andrógenos son responsables del fenotipo masculino durante la embriogénesis, y de la adquisición de la maduración sexual en la pubertad. En la edad adulta son necesarios para el mantenimiento de la función reproductiva y la conducta sexual. Además, ejercen efectos metabólicos sobre las proteínas, carbohidratos y grasas, por lo que constituyen el mantenimiento de la masa y la fuerza de los músculos, e intervienen en la regulación del hueso y de la masa grasa (Guyton y Hall 2012).

Los estrógenos promueven características sexuales femeninas secundarias, estimulan el crecimiento del endometrio, del útero y del tejido mamario, regulan el ciclo menstrual, aceleran el crecimiento del cuerpo, disminuyen la masa muscular, aumentan el metabolismo de las grasas, intervienen en el mantenimiento de los vasos sanguíneos; en la piel favorecen el crecimiento

del vello y de las uñas, disminuyen la resorción del hueso y aumentan su formación. También elevan los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), los de antitrombina III y los del plasminógeno, mientras disminuyen los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), reducen la motilidad intestinal, incrementan la hormona corticotrópica y el cortisol, e intervienen en las funciones cerebrales (Guyton y Hall 2012).

Corticosteroides

Los glucocorticoides desempeñan un papel fundamental en la homeostasis de los organismos. El metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos y el balance de líquidos y electrolitos están influenciados por corticosteroides. En el tejido periférico, los glucocorticoides bloquean la utilización de glucosa y la captación de ésta por adipocitos, fibroblastos, timocitos y leucocitos; inducen lipólisis y proteólisis, lo que genera aminoácidos y glicerol para la gluconeogénesis hepática, y a este mismo nivel, el depósito de glucosa en forma de glucógeno (Gómez, *et al.*, 2007).

El sistema nervioso central es afectado indirectamente por la acción del cortisol, el cual ayuda a mantener un apropiado estado de ánimo y vigilia. En sistema hematopoyético induce la producción de leucocitos y eritrocitos por medio de la estimulación indirecta de la eritropoyetina. En el sistema inmunológico los corticosteroides también actúan reduciendo la concentración, distribución y función de linfocitos T, la adherencia, capacidad fagocitaria y citotoxicidad de los monocitos macrófagos y la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Guyton y Hall 2012).

4. Receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides

Las hormonas esteroides son lipofílicas y pueden atravesar las membranas y el citoplasma celular para llegar al núcleo, donde interaccionan con los receptores nucleares. La teoría básica de acción de las hormonas esteroideas establece que los receptores esteroides, son proteínas nucleares que se unen a componentes del núcleo mediante interacciones de baja afinidad, que son miembros de una superfamilia de receptores

nucleares (a la que pertenecen los receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas tiroideas, de los esteroides sexuales, del ácido retinoico y de la vitamina D). Estos receptores tienen una estructura modular que incluye un dominio de activación funcional, un dominio de unión al DNA y un dominio de unión al ligando. Como resultado de la interacción del ligando con el receptor, tienen lugar cambios rápidos en la configuración de la proteína del receptor, que adquiere nuevas propiedades físicas. El esteroide unido al receptor actúa como un factor transcripcional al unirse a un sitio específico del DNA llamado elemento regulador, estimulando así la transcripción de ciertos genes (Osslor *et al.*, 1998; Yudt y Cidlowski, 2002). La síntesis de ciertos RNAM origina la síntesis de proteínas que alteran la función celular.

En ausencia del ligando, el receptor se mantiene usualmente en el citoplasma como un complejo multiproteico inactivo, responsable de enmascarar la señal de localización nuclear, necesaria para la subsecuente migración al núcleo. La figura 6 ilustra cómo las hormonas esteroides provocan la respuesta de las células receptoras (Gómez, *et al.*, 2007).

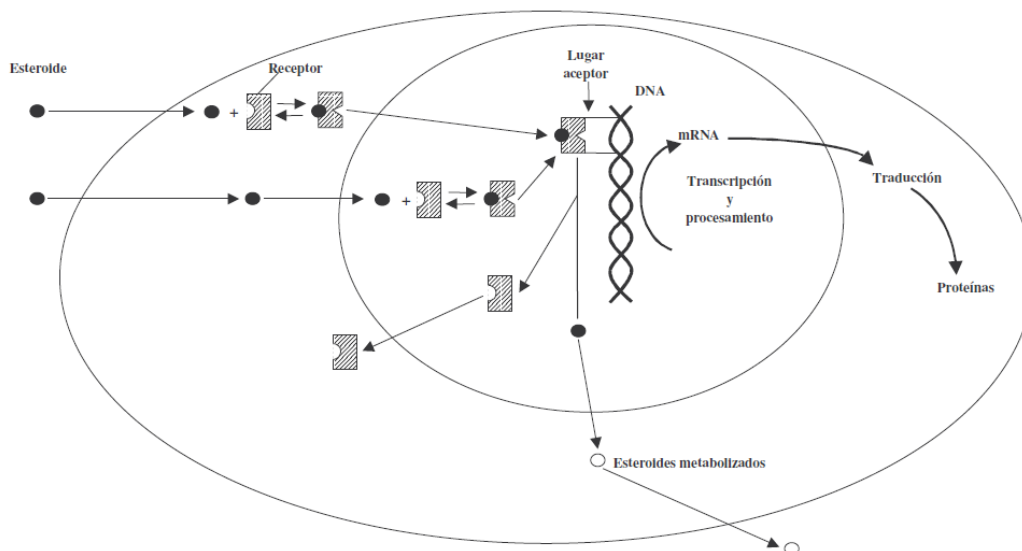


Fig. 6. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides (tomado de Gómez *et al.*, 2007)

5. Receptores de esteroides sexuales

Los receptores de esteroides sexuales al igual que los de glucocorticoides, son de tipo nuclear y se comportan como factores de transcripción al unirse con el esteroide. La mayoría de los receptores esteroides se unen como homodímeros a palíndromos hexámeros AGAACA separadas por tres bases, y el receptor de estrógenos homodímero reconoce AGGTCA de la misma manera (Brosens *et al.*, 2004; Becerro, 2008).

El receptor de andrógenos, es una copia simple de un gen que se localiza en el cromosoma X, es muy similar al receptor de glucocorticoides y de progesterona (Brosens *et al.*, 2004; Becerro, 2008).

Se han descrito dos tipos de receptores de estrógenos ER α y ER β , que son codificados en diferentes genes. Son altamente homólogos en el dominio de unión al DNA, pero difieren en el dominio de unión al ligando del C-terminal y en el dominio de transactivación del N-terminal. Aunque ambos subtipos pueden unirse a 17 β -estradiol con gran afinidad, se expresan en forma diferente en varios tejidos y tienen distintas propiedades de transactivación (Brosens *et al.*, 2004; Becerro, 2008).

En el caso de los receptores a progesterona existen dos isoformas, PR-A y PR-B, que resultan de la utilización de diferentes promotores usados en un mismo gen. Los PR-B difieren de los PR-A en que contienen 164 aminoácidos adicionales en el N-terminal. Se ha encontrado que estas isoformas tienen diferentes actividades transcripcionales (Brosens *et al.*, 2004; Becerro, 2008).

6. Efecto de hormonas esteroides sobre el desarrollo de cisticercos de *T. crassiceps*

Se han estudiado los roles de los esteroides sexuales sobre la reproducción *in vitro* de los cisticercos de *T. crassiceps* ORF y según algunos autores que usaron dosis farmacológicas de estos esteroides, los estrógenos favorecen y los andrógenos inhiben la reproducción asexual *in vitro* del parásito (Morales-Montor, 2005). En nuestro laboratorio se encontró que dosis cercanas a los niveles fisiológicos estimulan en ambos casos la

incorporación de timidina tritiada, indicando proliferación celular de los parásitos (Romano *et al.*, 2008).

No sólo las hormonas del hospedero pueden afectar la respuesta a la infección, sino que los parásitos pueden alterar el perfil hormonal del huésped. Se observó que los ratones Balbc/AnN machos infectados con cisticercos de *T. crassiceps* ORF tenían un incremento en el estradiol sérico y un decremento en la testosterona, conforme la infección progresaba (entre las 4 y 8 semanas de infección); provocando además cambios significativos en la conducta sexual y estos machos se volvían estériles (Bojalil *et al.*, 1993; Terrazas *et al.*, 1994; Larralde *et al.*, 1995). Los autores sugieren que el macho hospedero despliega un fenotipo protector contra la infección por cisticercos y sólo se vuelve permisivo a la reproducción larvaria cuando, a causa de la infección, se alteran las concentraciones séricas de los esteroides sexuales (Terrazas *et al.*, 1994; Larralde *et al.*, 1995).

7. Síntesis de esteroides por cisticercos y tenias *in vitro*.

Utilizando precursores esteroideos tritiados agregados al medio de cultivo (que se encuentran normalmente en diferentes especies de mamíferos), se ha demostrado que los cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps* son capaces de sintetizar *in vitro* andrógenos y estrógenos (Romano *et al.*, 2015). Así cuando los cisticercos fueron incubados en presencia de androstenediona tritiada o de DHEA tritiada sintetizaron andrógenos y pequeñas cantidades de 17β -estradiol (Gómez *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003; Valdéz *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2006), lo que sugiere que estos parásitos tienen actividad propia de las enzimas de 17α -hidroxilasa, 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD), 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y aromatasa. Además se encontró que los cisticercos poseen receptores para andrógenos y estrógenos (Jiménez *et al.*, 2006), y un claro efecto en el crecimiento por la adición de gonadotropina coriónica humana (hCG) en cisticercos *T. solium* y aumento en el número de cisticercos de *T. crassiceps* por gemación (Díaz-Orea *et al.*, 2007). Recientemente se demostró también la presencia de receptores para hCG, tanto en cisticercos como en las tenias

(Castellanos-Sanchez *et al.*, 2009). Además el bloqueo de receptores para andrógenos con flutamida, disminuyó significativamente la carga parasitaria de ratones macho, después de 10 días de tratamiento (Jiménez, 2006). *In vitro*, la administración de bloqueadores de receptores de andrógenos (flutamida) y de estrógenos (tamoxifen) disminuyeron la incorporación de timidita tritiada en los cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium* (Jiménez, 2006). Estos experimentos sugieren un rol de los andrógenos y estrógenos en el desarrollo del parásito.

Los gusanos de *T. crassiceps* y de *T. solium* son también capaces de sintetizar esteroides *in vitro* a partir de DHEA. Por histoquímica se demostró la presencia de la enzima 3 β -HSD que es crítica en la esteroidogénesis (Fernández- Presas *et al.*, 2008). La capacidad de sintetizar andrógenos y estrógenos por los cisticercos y las tenias podría, como sucede en embriones de aves y mamíferos, ser necesaria para el desarrollo y/o viabilidad de los parásitos.

En resumen, los datos del grupo de trabajo indican que los cisticercos pueden sintetizar esteroides sexuales utilizando precursores como progesterona, DHEA androstenediona y testosterona, lo que sugiere que tienen la posibilidad de utilizar las rutas $\Delta 4$ y $\Delta 5$, como lo hacen las gónadas de mamíferos y aves para la síntesis de andrógenos y estrógenos.

8. Antecedentes sobre la síntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides en parásitos

Valdez *et al.* (2012) demostraron que los cisticercos de *T. crassiceps* WFU tienen la capacidad de sintetizar corticosteroides *in vitro* a partir de precursores tritiados, siendo el metabolito más abundante la 11-deoxicorticosterona (11-DOC). La síntesis de corticosteroides fue modificada por la presencia de metirapona (inhibidor del metabolismo de corticosteroides).

Trabajando con gusanos de *T. solium* *in vitro*, se encontró que al cultivarse con 3H-progesterona tienen la habilidad de transformarla a corticosteroides, principalmente deoxicorticosterona y 11-DOC tritiada (Valdez *et al.*, 2014)

9. Efecto de la infección con parásitos sobre aspectos reproductivos del huésped

Las respuestas de los individuos a los parásitos son causadas por diferencias inmunológicas entre los sexos (dimorfismo sexual) (Schuurs y Verheul, 2005).

Se ha encontrado que varios parásitos reducen la inversión de recursos del huésped en su reproducción, haciendo que éstos sean más abundantes para el crecimiento del parásito. Los cambios conductuales son adaptativos para el parásito o para el huésped, por lo que es pertinente que la infección induzca cambios en la conducta sexual del hospedero. Además cuando la transmisión del parásito está ligada a la copulación del huésped con su pareja, o a la reproducción, la manipulación de la conducta sexual puede beneficiar a ambos protagonistas (Thomas *et al.*, 2005). Al evitar machos parasitados, las hembras pueden beneficiarse directamente a través de limitar las oportunidades de que ellas se infecten y maximizar el cuidado parental paterno. Además, si la resistencia a parásitos es hereditaria, aparearse con machos no infectados incrementará las oportunidades de producir descendencia resistente (Dunn, 2005). Los mamíferos parecen usar como guía el olfato para evitar aparearse con individuos parasitados. Se ha encontrado que los machos y las hembras de ratón se abstienen de copular con individuos infectados con *T. crassiceps* (Gourbal y Gabrion, 2004).

Aunque los machos son más susceptibles que las hembras a varios parásitos, hay parásitos para los cuales los machos son más resistentes que las hembras (Aguilar-Delfín *et al.*, 2001; Larralde *et al.*, 1995). Las causas por las que se observan diferencias sexuales en respuesta a ciertos parásitos no se han dilucidado, pero podrían deberse a diferencias entre las interacciones hospedero-patógeno que son afectadas por el sistema endócrino (Klein, 2004).

La relación funcional bidireccional entre los sistemas inmune y endócrino ha sido bien demostrada, de modo que se han identificado receptores funcionales para hormonas esteroides en tejidos y células del sistema inmune (Cutolo *et al.*, 1996). Las respuestas inmunológicas son diferentes entre los sexos en respuesta a la infección parasitaria; por ejemplo, en el

caso de *Leishmania major* o *mexicana* en el ratón macho hay incremento de IgG1, IgE, IL-5 y TNF α , en cambio en la hembra sólo se observa aumento en el IFN γ (Klein, 2004).

Además se han encontrado diferencias genéticas, ya que las ratonas de la línea BALBc/AnN son más susceptibles que los machos a la infección con cisticercos de *T. crassiceps* ORF (Sciutto *et al.*, 1991). Los estrógenos favorecen la infección mientras que los andrógenos en la hembra inhiben la reproducción de los cisticercos (Terrazas *et al.*, 1994). Los machos desarrollan mayor respuesta inmunológicas de células Th1, elevada síntesis de IFN γ , mientras que las hembras muestran aumento de la producción de IL-10 durante la etapa temprana de la infección (Terrazas *et al.*, 1998). Se encontró que la gonadectomía equilibra la susceptibilidad entre ambos sexos, por reducir las cargas parasitarias en hembras e incrementarlas en machos, exponiendo claramente la relevancia de las hormonas sexuales en el proceso de infección (Huerta *et al.*, 1992).

10. Fármacos inhibidores de enzimas esteroidogénicas

Danazol

Es un análogo sintético de la 17 α -etinil testosterona y ha sido usado en el tratamiento de endometriosis y mastopatías. Se han reportado varios efectos farmacológicos del danazol como: inhibición de la liberación de gonadotropinas (Franchimont y Cramillon, 1977), inhibición competitiva de enzimas esteroidogénicas (en ovario de hámster inhibe 17 α -hidroxilasa, 17,20-liasa y 3 β -HSD, y en el testículo de rata también inhibe a la 17 β -HSD) (Barbieri *et al.*, 1977) y supresión de la proliferación celular en tejido endometrial (Rose *et al.*, 1988). El danazol puede unirse a receptores de andrógenos, receptores de progesterona y receptores de glucocorticoides, aunque el danazol no se une bien a receptores de estrógenos (Barbieri *et al.*, 1979). Además se ha encontrado que el danazol inhibe competitivamente la actividad de la P450-aromatasa, en células del estroma derivadas de endometrio sin afectar a los niveles de RNAm ni de proteína de la enzima

(Murakami *et al.*, 2006). Danazol inhibe 3 β -HSD, 17 β -HSD, 17 α -hidroxilasa, 17-20-liasa, 21 β -hidroxilasa y 11 α -hidroxilasa en ovario y testículo de humano (Barbieri *et al.*, 1977, 1981). Además suprime la expresión de aromatasa en el endometrio obtenido de pacientes con endometriosis (Ishihara *et al.*, 2003).

Ketoconazol

Es un derivado del imidazol, utilizado como una droga antimicótica para prevenir y tratar infecciones micóticas de la piel y se sabe que inhibe a varias enzimas de la ruta esteroidogénica en células adrenales, testículos y ovarios, inhibiendo a la 11 β -hidroxilasa, 17 α -hidroxilasa, 17-20 liasa y a la aromatasa *in vitro* (Weber *et al.*, 1991). Es usado para controlar hipercortisolismo en pacientes con síndrome de Cushing (Feelders *et al.*, 2010). En el caso del testículo no se encontró inhibición de la 3 β -HSD o de la 17 β -HSD (Ayub y Levell, 1987). Se encontró que el ketoconazol disminuye la concentración de testosterona sérica sin incremento significativo de LH (Adams *et al.*, 1998) y FSH (Amin, 2008). Kan *et al.*, (1985) y Nagal *et al.*, (1986) encontraron que el ketoconazol inhibe la esteroidogénesis, al inhibir la actividad microsomal y mitocondrial de enzimas del citocromo P-450, en la ruta esteroidogénica de múltiples órganos.

El ketoconazol ha sido usado para controlar el crecimiento de parásitos *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* así como de *Babesia equi* y *Babesia caballi* (Bork *et al.*, 2003 a,b). Dos derivados de imidazo, clotrimazol y ketoconazol fueron potentes inhibidores del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei* y *Trypanosoma cruzi in vivo* (Berman *et al.*, 1984) Ketoconazol también inhibe *in vitro* el crecimiento y desarrollo del parásito de peces *Ichthyophonus sp.* (Hontoria *et al.*, 2009). La adición de ketoconazol al triclabendazol inhibe el metabolismo de esta droga mediada por sistemas enzimáticos P450 que es un mecanismo de resistencia al fármaco usado por el parásito *Fasciola hepática* (Devine *et al.*, 2011). Actuando como un inhibidor del metabolismo de colesterol, el ketoconazol inhibe la replicación de la bacteria *Coxiella burnetii* (Howe and Heintzen 2005).

Por otra parte, el prazicuantel es uno de los medicamentos más frecuentemente usados para tratar la NC, Ridditid *et al.*, (2007) reportó que adicionando ketoconazol al antihelmíntico prazicuantel se incrementaban los niveles séricos de éste, por lo tanto la dosis del antihelmíntico podría reducirse.

Inhibidores de P450-aromatasa

La actividad de la aromatasa está regulada por factores como IL-1 y TNF, ácido retinoico y glucocorticoides, en células del estroma vascular de tejido adiposo de humano (Schmidt and Löffler, 1994; Zhao *et al.*, 1996). Ha sido demostrado que la inhibición de aromatasa por fadrozol disminuye la carga de cisticercos en ratones (Morales-Montor *et al.*, 2002). Recientemente se demostró que en cisticercos de *T. crassiceps* WFU, la síntesis de estrógenos se incrementa por la adición de corticosterona o dexametasona al medio del cultivo (Hinojosa *et al.*, 2012).

Los inhibidores de P450-aromatasa han sido divididos en dos categorías, inhibidores esteroideos y no esteroideos, basándose en su estructura y su mecanismo de acción. Los inhibidores esteroideos (exemestane, formestane) son derivados de androstenediona, que es un sustrato natural de la aromatasa y compiten con ésta por unirse con el sitio activo. Esta unión es irreversible causando inactivación permanente aún después de que la droga ha sido eliminada de la circulación (Buzdar *et al.*, 2002). Los efectos negativos que pueden tener en humanos son acné y aumento de peso, además de dolor, fatiga e insomnio (Folkestad *et al.*, 2009)

Los inhibidores no esteroideos (aminoglutetimida, fadrozol, anastrozol, letrozol) tienen un grupo funcional triazol, que interactúa directamente con el sitio activo hierro heme en el citocromo P450, formando un fuerte pero reversible enlace covalente que inhibe a la enzima aromatasa, excluyendo efectivamente a los ligandos endógenos (testosterona y androstenediona) e inhibiendo casi completamente la producción de estrógenos (Buzdar *et al.*, 2002). Entre los efectos secundarios de estos inhibidores en humanos se encuentran sofocos, cambios de humor, fatiga e incremento en la transpiración (Folkestad *et al.*, 2009)

Experimentos *in vivo* han demostrado que la inhibición de la enzima P450-aromatasa, disminuye la carga parasitaria en ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps*, ya que cuando se administró a los ratones fadrozol, disminuyó la carga parasitaria (Morales-Montor *et al.*, 2002)

11. 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) una enzima clave en la biosíntesis de andrógenos

La familia de la 17 β -HSD modula el potencial biológico de estrógenos y andrógenos por conversión en la posición 17: ceto-formas son inactivas mientras que las hidroxí-formas son activas (Mindnich *et al.*, 2004) (Fig. 7).

La catálisis es dependiente de los cofactores NADPH o NADH en reacciones reductoras, NADP⁺ o NAD⁺ en reacciones oxidativas (Persson *et al.*, 2003), y estos cofactores se unen en la región N-terminal de la proteína (Kallberg *et al.*, 2002).

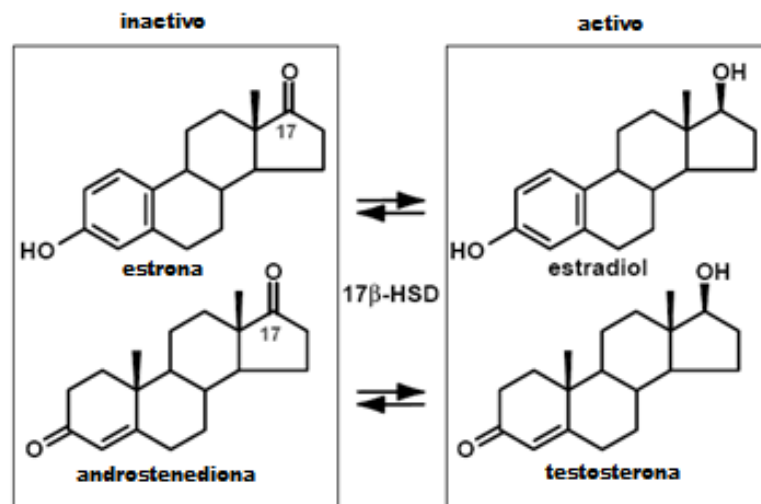


Fig. 8. Formas activas e inactivas de andrógenos y estrógenos

A pesar de que las diferentes 17 β -HSD son comúnmente llamadas isoenzimas, esto es incorrecto, ya que las 17 β -HSDs son codificadas por diferentes genes no homólogos con diferentes secuencias de aminoácidos que revelan diferentes localizaciones subcelulares, así como diferentes cofactores y preferencias de sustratos. Estas enzimas pertenecen a dos superfamilias de proteínas: dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR) y aldo-cetoreductasa (AKR) (Penning, 2003).

Las SDRs han sido divididas en dos grandes familias: clásicas y extendidas, que tienen diferentes motivos de glicina en la región de unión a la coenzima y diferentes largos de la cadena (250 residuos en las clásicas y 350 en las extendidas) (Jörnvall *et al.*, 1995). La identidad de la secuencia de aminoácidos es baja entre los SDRs (alrededor del 15 al 30%), pero las estructuras 3D son bastante similares, excepto por la región C-terminal, que constituye el sitio de unión al sustrato (Kallberg *et al.*, 2002). Entre las estructuras 3D existe alta similitud en los patrones de plegamiento α/β , con plegamiento Rossmann, que consiste de una hoja central β flanqueada por α -hélices (Oppermann *et al.*, 2003).

Por el momento, en mamíferos han sido descritos 14 tipos de 17β -HSD, y sólo en 12 de ellos existen ortólogos en humanos (Lukacik *et al.*, 2006). Los diferentes tipos de 17β -HSDs descritos en mamíferos tienen actividad unidireccional (Luu-The *et al.*, 2001). La conversión de DHEA a $\Delta 5$ -androstene- $3\beta,17B$ -diol ($\Delta 5$ -diol o androstenediol) es catalizada por las 17β -HSDs 1 y 5, mientras que la reacción reversa puede ser mediada por las 17β -HSDs 2 y 4. Estas reacciones pueden tener lugar virtualmente en todos los tejidos (Peltoketo *et al.*, 1999).

La enzima más importante para la producción de testosterona a partir de $\Delta 4$ -androstenediona es la 17β -HSD 3, que se expresa principalmente en los testículos (Andersson *et al.*, 1995). La 17β -HSD 3 también ha sido detectada en tejido adiposo, células primarias osteoblásticas y el lóbulo temporal del cerebro (Corbould *et al.*, 1998; Stoffel-Wagner *et al.*, 1999). La 17β -HSD 5 está involucrado en la formación de testosterona en próstata y células del hueso (Dufort *et al.*, 1999). La oxidación de testosterona puede ser catalizada por la 17β -HSD 2 y 8 en diferentes tejidos humanos (Andersson y Moghrabi, 1997; Lukacik *et al.*, 2006).

La 17β -HSD tipo 3, enzima clave en la síntesis de testosterona (Geissler *et al.*, 1994), se localiza principalmente en los testículos, y la enzima cataliza la reducción de androstenediona a testosterona. El tipo 3 también acepta estrógenos como sustrato; en roedores la enzima tiene una mayor afinidad por la estrona que en humanos (Le Lain *et al.*, 2001). También ha sido demostrado que esta enzima contribuye significativamente a la formación de

testosterona en las adrenales, especialmente en mujeres (Nakamura *et al.*, 2009).

La transformación de estrona hacia el biológicamente potente estradiol es catalizado por las 17 β -HSDs 1, 7 y 12. En el caso de los humanos el gen HSD17B1 se expresa abundantemente en la placenta y menos en el ovario (Peltokeko *et al.*, 1996) y el gen HSD17B7 en hígado, tejido neuronal y en menores niveles en una variedad de otros tejidos (Breitling *et al.*, 2001); mientras que la 17 β -HSD 12 se expresa altamente en el ovario y en la glándula mamaria (Luu-The *et al.*, 2006). La oxidación (inactivación) de estradiol es realizada por las 17 β -HSDs 2, 4, 8 y 10. Los tipos 2 y 8 se expresan en mama y epitelio uterino, así como en una larga serie de tejidos periféricos humanos, mientras que los tipos 4 y 10 son ubicuos (Adamski *et al.*, 2001; He *et al.*, 2001; Vihko *et al.*, 2001).

Algunos microorganismos como bacterias, levaduras y hongos pueden tener 17 β -HSDs, ya que convierten estrógenos y andrógenos entre otros sustratos. Por ejemplo, en la bacteria *Comamonas testosterone*, una 3 β /17 β -HSD específicamente convierte testosterona en androstenediona (Marcus and Talalay, 1965). En levaduras, la actividad de 17 β -HSDs fue demostrada por su habilidad de interconvertir androstenediona y testosterona, además estrona y estradiol (Rizner *et al.*, 2001).

En el caso del gusano *Caenorhabditis elegans* el gen let-767 comparte alta homología con 17 β -HSDs, y se ha demostrado que codifica enzimas homólogas a humano como 17 β -HSD 3 y 12, que están involucradas en la producción de testosterona y estradiol, respectivamente (Desnoyers *et al.*, 2007). Mientras que los parásitos *Schistosoma japonicum* y *Clonorchis sinensis* tienen una 17 β -HSD 12, que metaboliza estrona a estradiol (Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009), y en el abulón *Haliothis diversicolor supertexta* existe un 17 β -HSD 11, que cataliza una reacción oxidativa (Zhai *et al.*, 2011). Además de estas especies en el *E. multilocularis*, han encontrado una secuencia que corresponde a una 17 β -HSD, pero aún no se han realizado pruebas de funcionalidad de la misma (Tsai *et al.*, 2013)

La 17 β -HSD12 de los humanos fue primero caracterizada como una 3cetoacil-CoA reductasa especialmente involucrada en la síntesis de

cadenas de ácidos grasos largos y muy largos (Moon and Horton, 2003). El primer reporte sobre su habilidad para reducir estrona a estradiol (Luu-The *et al.*, 2006) ha comenzado una serie de investigaciones y un debate tratando de descifrar cuál es su rol fisiológico en humanos, en el metabolismo de esteroides o de ácidos grasos (Song *et al.*, 2006; Day *et al.*, 2008). En el caso del pez cebra su genoma contiene dos copias parálogas de 17 β -HSD llamadas 12A y 12B. Ambas son ampliamente expresadas en tejidos de peces en desarrollo y adultos (Mindnich *et al.*, 2004; Thisse and Thisse, 2004). La reducción de estrona a estradiol fue observada para ambas enzimas, pero los sustratos de 3 cetoacil-CoA no han sido todavía probados. La evolución de 17 β -HSD 12 es compleja, dando pie a la relación que tiene con 17 β -HSD 3, pero aún no se han caracterizado genes parecidos a HSD y al zf 3.2 del pez cebra entre otros (Mindnich *et al.*, 2004). Sin embargo dada su alta conservación en la secuencia de aminoácidos, 17 β -HSD 12 puede ser rastreada hasta su homólogo ancestral de la levadura YBR159 (Beaudion *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002), y también puede ser identificado en artrópodos (CG1444 in *D. melanogaster*) y nemátodos (LET-767 in *C. elegans*). LET-767 muestra capacidad de convertir esteroides cuando se expresa in vitro (Desnoyers *et al.*, 2007), pero parece jugar un papel importante en el metabolismo de esteroides (Kuervers *et al.*, 2003), así como en la producción de monometil y de ácidos grasos de cadena larga, cruciales para el apropiado crecimiento y desarrollo de *C. elegans* (Entchev *et al.*, 2008).

El patrón de expresión de la en humano, incluye en corazón, esqueleto, músculo, hígado, riñón, glándula adrenal, testículos y placenta (Sakurai *et al.*, 2006).

Justificación

Dada la capacidad de los cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps* WFU de sintetizar esteroides, es importante saber si este proceso podría ser modificado por inhibidores de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis como el danazol, ketoconazol o los inhibidores de la P450-aromatasa (formestane).

Por otra parte no se habían identificado las enzimas del parásito involucradas en la síntesis de testosterona, un andrógeno que los cisticercos sintetizan en abundancia. En ninguna especie de tenia se ha caracterizado molecular ó funcionalmente la enzima 17β -HSD, fundamental para la síntesis de esteroides sexuales. Por lo que en la segunda parte de esta tesis se clonó y caracterizó funcionalmente una 17β -HSD del cisticerco de *T. solium*.

Hipótesis

Hipótesis 1

La síntesis de esteroides en los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU es afectada por fármacos inhibidores de las enzimas esteroideogénicas

Hipótesis 2

En el cisticerco de *T. solium* se expresa la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa que transforma el esteroide sexual androstenediona a testosterona

OBJETIVO

Objetivo 1

Estudiar *in vitro* el efecto de inhibidores de esteroides sobre la producción de estas hormonas en cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU.

Particulares

- Estudiar el efecto de formestane sobre la síntesis de esteroides sexuales (estradiol).
- Investigar el efecto de danazol sobre la síntesis de esteroides sexuales.
- Estudiar el efecto de ketoconazol sobre la síntesis de esteroides sexuales y corticosteroides.

Objetivo 2

Caracterizar molecular y funcionalmente la enzima 17 β -HSD del cisticerco de *T. solium*.

Particulares:

- Identificar y caracterizar la enzima 17 β -HSD del cisticerco de *T. solium*
- Evaluar la función de la enzima 17 β -HSD del cisticerco de *T. solium*.

Material y Métodos

Obtención de cisticercos

Los cisticercos de *T. crassiceps* se obtuvieron de ratones hembra de la cepa Balb/c, infectados intraperitonealmente con cisticercos de *T. crassiceps* WFU. Se sacrificaron los ratones y se obtuvieron los cisticercos de la cavidad abdominal. Los parásitos se lavaron con solución salina y luego con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) estéril adicionado con antibióticos. Se pusieron un día en precultivo en una placa de cultivo de 24 pozos para que se adhirieran en su superficie las células residuales del huésped y además eliminar detritus celulares. Después de 24 horas, los cisticercos se cambiaron a una nueva placa y se procedió a los tratamientos que se describen en cada experimento a continuación.

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron de la carne de cerdos infectados con el parásito, disecando cada uno de los cisticercos sin romperlos y colocándolos en tubos Falcon. Estos fueron lavados con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 9.6 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.4) y congelados a -70°C para posteriormente obtener el RNA total.

Síntesis de esteroides

Se colocaron 200 µl de cisticercos de *T. crassiceps* WFU en viales conteniendo 2 ml de DMEM mas antibióticos (ampicilina) y 0.1% de BSA (albúmina sérica bovina). Se adicionó el precursor marcado con tritio (³H-DHEA, ³H-progesterona o ³H-androstenediona). Se prepararon viales que sólo llevaban el medio de incubación y el precursor radioactivo (blancos). Pasado el período de incubación, se retiró el sobrenadante que se vació en un vial nuevo y se guardó a -20 °C hasta el análisis por cromatografía en capa fina (TLC).

Tratamiento con los inhibidores

Cisticercos procesados como se describió anteriormente, fueron expuestos a diferentes inhibidores de la esteroidogénesis como danazol, ketoconazol y formestane, a diferentes concentraciones y tiempos de incubación junto con un control con el solvente (etanol) de cada uno de los fármacos usados. En el día de tratamiento se adicionó un precursor esteroideo, ^3H -DHEA, ^3H -progesterona o ^3H -androstenediona (100,000 cpm) por diferentes tiempos para investigar el efecto sobre la síntesis de esteroides sexuales y glucocorticoides, con forme a la siguiente tabla:

Tabla 2. Dosis y periodos de incubación de los inhibidores de la esteroidogénesis empleados

Inhibidor	Dosis	Periodo de incubación	Precursor utilizado
Danazol	10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM	24 horas	^3H - DHEA
	100 nM	2, 4, 6, 12, 24 horas	
Ketoconazol	0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	24, 48, 72 horas	^3H -Progesterona
		24 horas	^3H -Androstenediona
Formestane	10 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM	24 horas	^3H - Androstenediona
	100 μM	2, 4, 6, 12, 24 horas	

Después del período de incubación programado, se retiró el sobrenadante, que se colocó en viales nuevos que se conservaron a -20 C° .

Extracción de los esteroides del medio de cultivo

Los medios de cultivo se descongelaron a temperatura ambiente. Se les adicionó 5 ml de éter anhidro por cada ml de medio para extraer los

esteroides. Se taparon los viales y agitaron durante 1 minuto cada uno. Se dejaron reposar 15-20 minutos hasta que se separaron las fases, la acuosa queda abajo y la etérea arriba. Mientras se preparó un recipiente con hielo seco y se le adicionó acetona y se colocaron los viales durante 15 minutos para que se congelara la fase acuosa. Una vez congelada, se recuperó la fase etérea colocándola en viales nuevos. Se evaporó el éter hasta secar en baño María a 37°C. Se taparon los viales y se guardaron a 4 °C.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Para realizar la TLC se utilizaron placas de sílica gel. Se sembraron en los primeros carriles 5 µl de los estándares (disueltos en acetona HPLC).

En los experimentos en los que se utilizó DHEA como precursor se empleó androstenediol, androstenediona, testosterona, estradiol y estrona como estándares. En los que se utilizó androstenediona se empleó testosterona, estradiol y estrona como estándares. En los que se usó progesterona se empleó deoxicorticosterona, corticosterona, deoxicortisol y cortisol como estándares.

Las muestras obtenidas se resuspendieron en 100 µl de etanol absoluto, se agitaron durante 1 minuto en vortex y se sembraron 20 µl en los carriles correspondientes. La placa se colocó en una cámara cromatográfica. La cámara contenía el sistema de solventes (benceno:metanol 9:1 ó tolueno:acetona 4:1). Pasado este tiempo, se retiró la placa de la cámara y se dejaron evaporar los solventes. Los estándares se detectan en las placas, usando luz UV y se revelan con H₂SO₄ y calor. Se cuadrículó la placa usando las regiones correspondientes de los estándares, se recortó y se colocaron los cuadros en viales con líquido de centelleo. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Obtención de RNA y RT-PCR de 17β-HSD de cisticercos de *T. solium*

El RNA total fue extraído a partir de 3 cisticercos de *T. solium* usando TRIzol® Reagent (Invitrogen) y fue precipitado por la adición de isopropanol.

La síntesis de DNA complementaria (c)DNA a partir del RNA total fue catalizada mediante el sistema SuperScript® One-Step RT-PCR con Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) con los oligos específicos 5' ATG GCT GTC TTT CTC CTT G 3' forward y 5' CTA CTG GGT CTT CTC GTG 3' reverse diseñados con base en la secuencia genómicas identificada como la más probable para codificar a la enzima 17 β -HSD fueron obtenida de la base de datos del proyecto de secuenciación genómica de *T. solium* (Tsai *et al.*, 2013).

Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización a 94°C por 3 minutos; 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos repetido 35 veces; y un paso final a 72°C por 20 minutos.

El fragmento obtenido se analizó por gel para confirmar el tamaño esperado de 957 pb. Los fragmentos de cDNA se insertaron en el vector pcDNA3.1-GFP-CT (Invitrogen). El vector resultante nombrado Tsol-17 β HSD-pcDNA3.1-GFP-CT fue secuenciado para verificar la integridad y estabilidad para posteriormente transfectarlo en células HEK293-T.

Transfección en células HEK293-T

Las células se mantuvieron en cultivo en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino más antibiótico (ampicilina), a 37°C con 5% de CO₂. Para realizar la transfección las células se colocaron en cajas de 6 pozos y se dejaron replicarse hasta alcanzar un 50% de confluencia para proceder con la transfección. Este procedimiento se realizó con lipofectamina LTX más Plus Reagent (Invitrogen), colocando 5 μ g del plásmido en cada uno de los pozos (3 pozos por experimento). Al mismo tiempo se colocó 1.5 μ g del vector vacío como control (3 pozos por experimento). Para identificar si la transfección resultó exitosa se hicieron observaciones en microscopía de fluorescencia a las 24 y 48 horas, encontrándose mayor fluorescencia a las 48 horas en los controles. Sin embargo, en las células transfectadas con el plásmido con el gen Tsol-17 β HSD la fluorescencia fue muy baja, por lo que se optó por cambiar el vector por el pcDNA3.1(+) (Invitrogen), en los sitios de restricción Kpn1 y Not1 y utilizar el pcDNA3.1-GFP-CT como reportero, realizando una cotransfección.

En los tiempos de 24 y 48 horas posteriores a la transfección se adicionaron los precursores tritados a las células (^3H -androstenediona y ^3H -estrona) y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas más. Posteriormente se retiró el medio de cultivo para realizar la extracción de los esteroides en el extracto total obtenido.

Análisis filogenético

La secuencia de *T. solium* generada en este estudio fue alineada con las secuencias de 17 bHSD de los siguientes organismos obtenidas de la base de datos de GenBank:

Ts: *Taenia solium* (www.genedb.org/Homepage/Tsolium); Em: *Echinococcus multilocularis* Em17 β -HSD (EmW_000624600); Cs: *Clonorchis sinensis* estradiol 17 β -HSD 12 (GAA55022.1); Sj: *Schistosoma japonicum* estradiol 17 β -HSD 12 (CAX70720.1); Ce: *Caenorhabditis elegans* LET 767 (Q09517.2); Ip: *Ictalurus punctatus* estradiol 17 β -HSD 12, (NP_001187450.1); Xt: *Xenopus tropicalis* estradiol 17 β -HSD 12 (NP_001017234.1); Ni: *Nucella lapillus* 17 β -HSD 12 (AFV95595.1); Ss: *Salmo salar* estradiol 17 β -HSD 12 (NP_001135118.1); Bt1: *Bos taurus* testosterone 17 β -HSD 3 (NP_001069907.1); Bt2: *Bos taurus* estradiol 17 β -HSD 12 (NP_001231116.1); Ss1: *Sus scrofa* testosterone 17 β -HSD 3 (NP_001231719.1); Ss2: *Sus scrofa* estradiol 17 β -HSD 12 (BAI47714.1); Mf: *Macaca fascicularis* testosterone 17 β -HSD 3 (AAY84568.1); Mm: *Macaca mulatta* estradiol 17 β -HSD 12 (EHH22972.1); Hs1: *Homo sapiens* estradiol 17 β -HSD 12 (NP_057226.1), Hs2: *Homo sapiens* testosterone 17 β -HSD 3 (NP_000188.1). Los números de acceso al GenBank se muestran en paréntesis. Todas las secuencias fueron alineadas usando el programa MUSCLE (Edgar, 2004) en Seaview software version 4.0. (Gouy *et al.*, 2010). La divergencia genética entre las secuencias fue estimada con observaciones de distancia. El árbol Neighbor-joining fue inferido con 10,000 bootstrap registrados.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism version 4.2003 (GraphPad Software Inc.). Los datos están expresados como la media± el error estándar (EE). Los valores de probabilidad de $p > 0.05$ fueron considerados significativos. Se utilizó una prueba de Kolmogorov Smirnov para identificar normalidad. La prueba de Kruskal-Wallis seguida de una comparación múltiple de Dunn, o ANOVA y la prueba t de Student no pareada se utilizaron para analizar las diferencias estadísticas entre los grupos de los inhibidores y los controles. La prueba de Mann-Whitney fue usada para identificar las diferencias estadísticas entre los grupos control y el gen Tsol-17 β HSD. Los experimentos fueron repetidos tres veces y cada uno fue realizado por triplicado. Se hizo un concentrado en el caso de las transfecciones

Resultados

Efecto de inhibidores enzimáticos sobre la síntesis de esteroides sexuales por cisticercos de *T. crassiceps* WFU

Efecto del formestane sobre la síntesis de esteroides sexuales por el cisticerco

La figura 8 muestra el efecto de 100 μM de formestane sobre la síntesis de testosterona tritiada y 17β -estradiol por cisticercos incubados por diferentes tiempos. Como se aprecia en la figura 8 el formestane disminuyó significativamente la síntesis de 17β -estradiol a partir las 2 horas de incubación (Figura 8A). La síntesis de testosterona fue inhibida a las 2 y 4 horas de incubación, pero después de seis horas comenzó una reversión de este efecto y una acumulación significativa del andrógeno se hizo evidente a las 24 horas de incubación (Figura 8B). El efecto de formestane sobre la síntesis de 17β -estradiol fue dosis-dependiente alcanzando el efecto máximo a 100 μM (Figura 9).

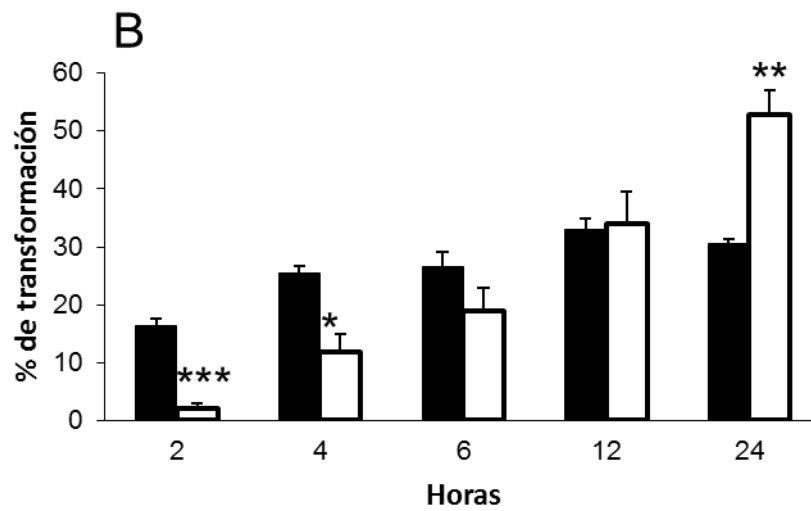
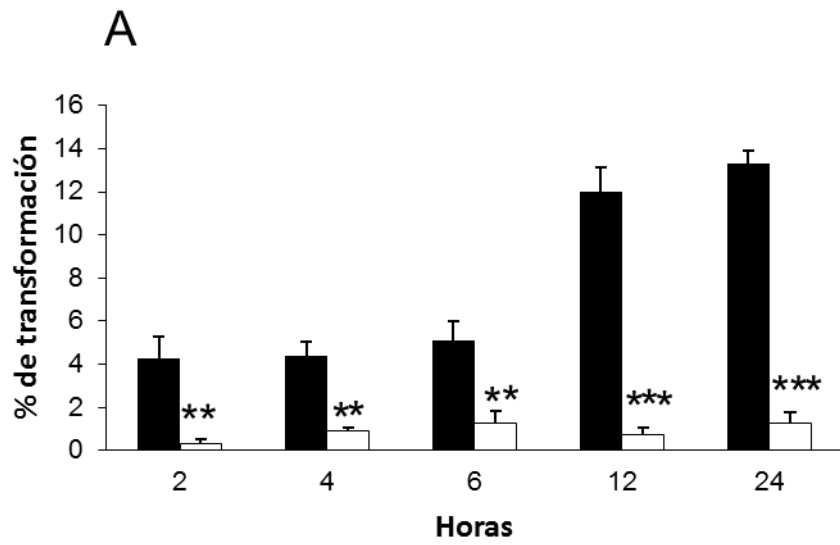


Fig. 9. Efecto de 100 μ M de formestane sobre la síntesis de esteroides por cisticercos (200 μ l) de *T. crassiceps* WFU incubados con androstenediona tritiada como precursor. ■ Control, □Formestan. A. Síntesis de 3H-17 β -estradiol. B. Síntesis de 3H-testosterona. Media \pm EE, n = 8 por cada tiempo de cultivo. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

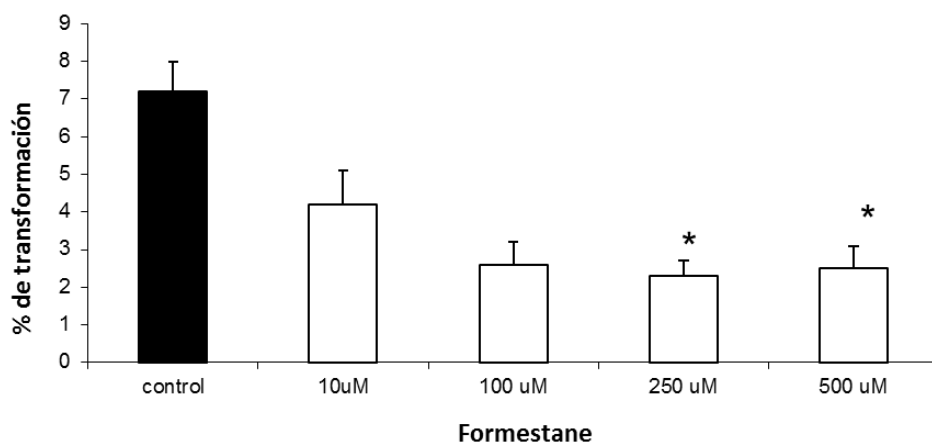


Fig. 10. Efecto dosis-respuesta de diferentes concentraciones de formestane sobre la síntesis de estradiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (200 μ l) incubadas en presencia de androstenediona tritiada, después de 24 h de cultivo con formestane. Experimento representativo. Media \pm EE, n = 4 pozos por cada dosis. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

Efecto del danazol sobre la síntesis de esteroides sexuales por el cisticerco

La exposición de los cisticercos a 100nM de danazol por diferentes periodos inhibió significativamente la síntesis de 17 β -estradiol (Figura 10B). Por el contrario se observó una acumulación de androstenediol que fue significativa después de 6 horas de incubación (Figura 10A). Diferentes concentraciones de danazol provocaron una inhibición dosis-dependiente de la síntesis de 17 β -estradiol el efecto fue significativo a partir de 100 nM con un efecto máximo a 10 μ M (Figura 11)

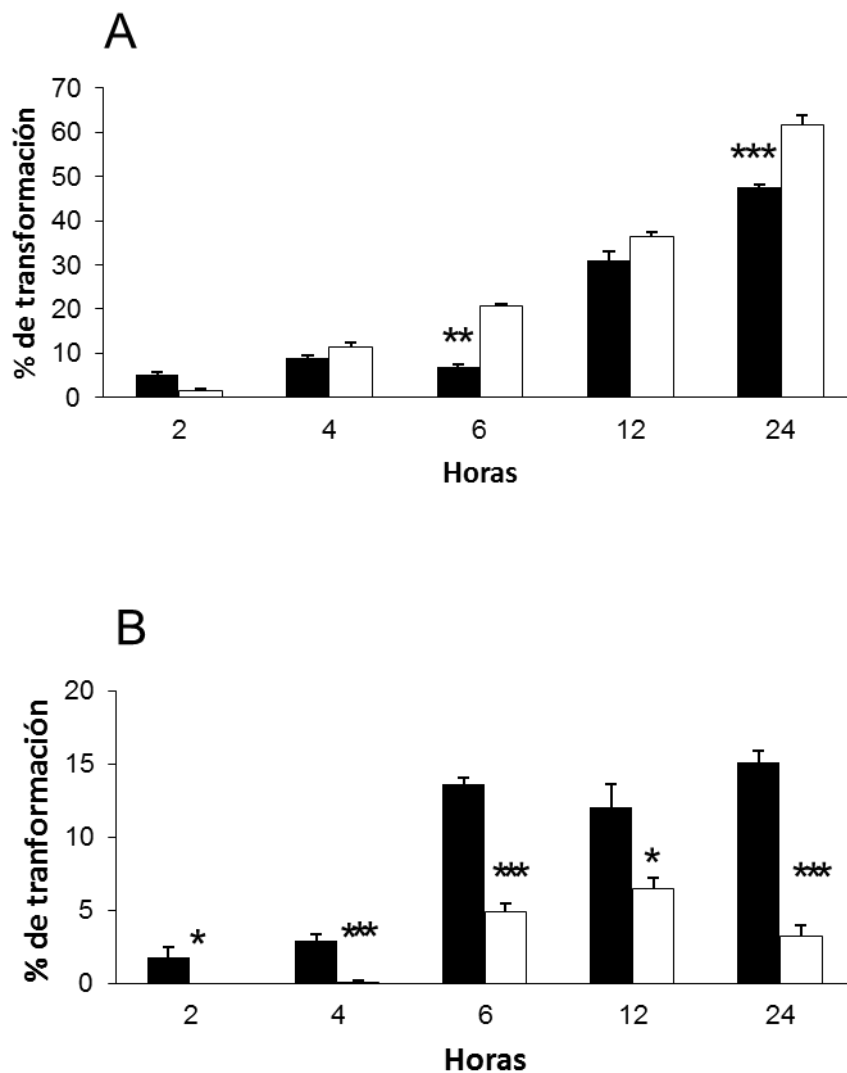


Fig. 11. Curva temporal del efecto de 100 nM de danazol sobre la síntesis de esteroides sexuales de cisticercos de *T. crassiceps* WFU incubados con DHEA tritlada como precursor.

■Control, □Danazol. A. Síntesis de 3H-androstenediol. B. Síntesis de 3H-17 β -estradiol.

Media \pm EE, n = 8 pozos por cada tiempo de cultivo. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

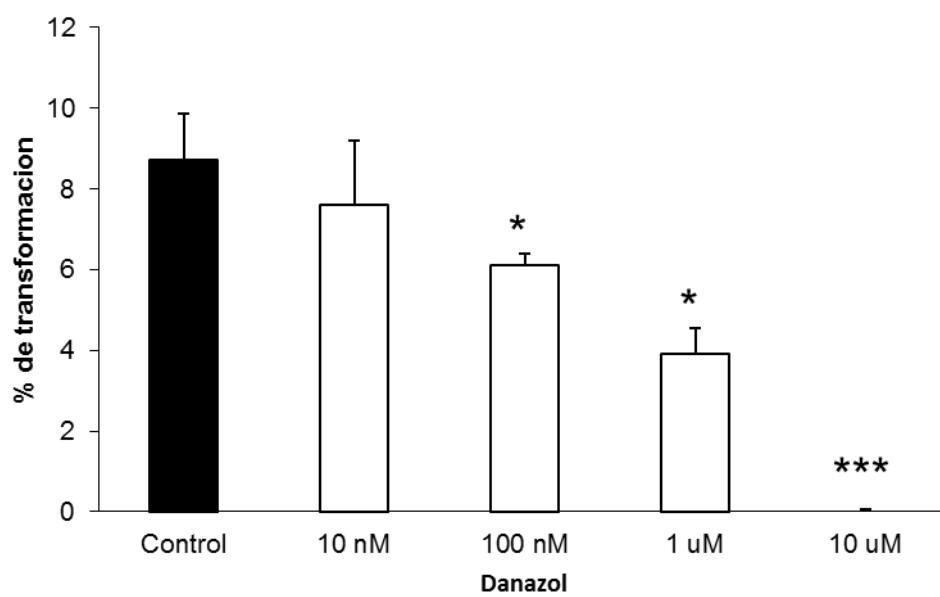


Fig. 12. Efecto dosis-respuesta de diferentes concentraciones de danazol sobre la síntesis de ^3H - 17β -estradiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU incubados en presencia de DHEA tritiada por 24 h. Experimento representativo. Media \pm EE, n = 4 por cada tiempo de cultivo.

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Effecto del ketoconazol sobre la síntesis de esteroides sexuales sobre el cisticercos de *T. crassiceps*

Como se aprecia en la figura 12 no se encontraron cambios estadísticamente significativos con respecto al control en la síntesis de esteroides sexuales cuando se expusieron los cisticercos a diferentes concentraciones de ketoconazol por 24 horas.

Sin embargo, la incubación de cisticercos por un periodo de 24 horas en presencia de diferentes concentraciones de ketoconazol resultó en una inhibición significativa de la síntesis de deoxicortisol (DOC) (figura 13A). Como se observa en la figura 12B el efecto de diferentes dosis de ketoconazol sobre la inhibición de DOC fue más significativo a las 24 horas de tratamiento

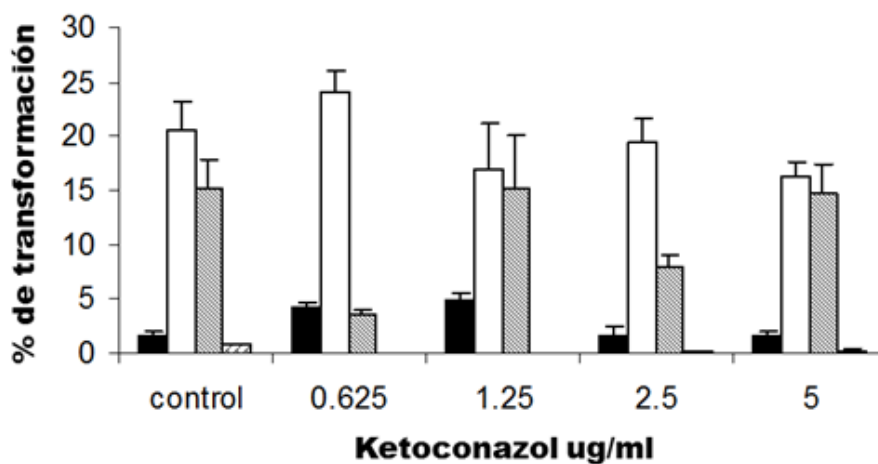


Fig 13. Efecto de diferentes concentraciones de ketoconazol sobre la síntesis de esteroides sexuales por cisticercos de *T. crassiceps* WFU cultivados en presencia de androstenediona tritiada. Los parásitos fueron incubados por 24 h en presencia de diferentes concentraciones de ketoconazol. Las placas de TLC se corrieron en benceno-metanol ■ 17β-estradiol, □ Testosterona, ▨ 17OH progesterona, ▩ androstenediona. Experimento representativo. Media± EE, n = 4 por cada tiempo de cultivo.

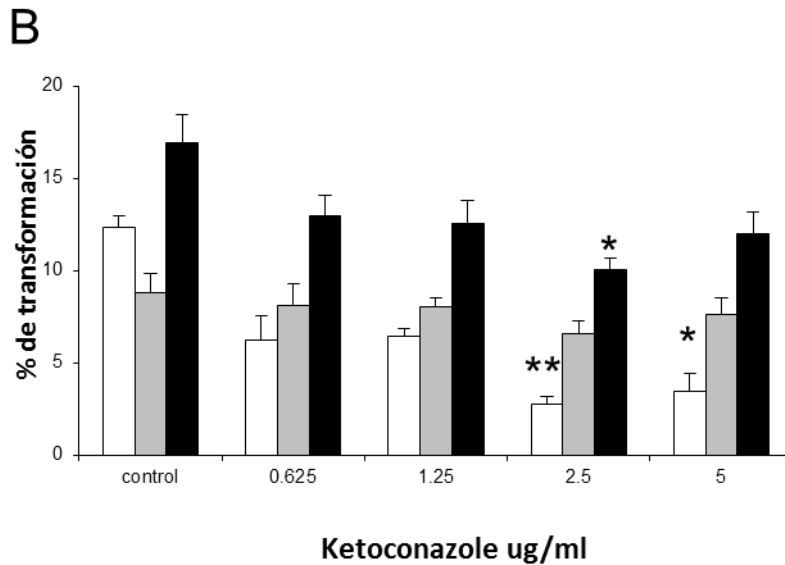
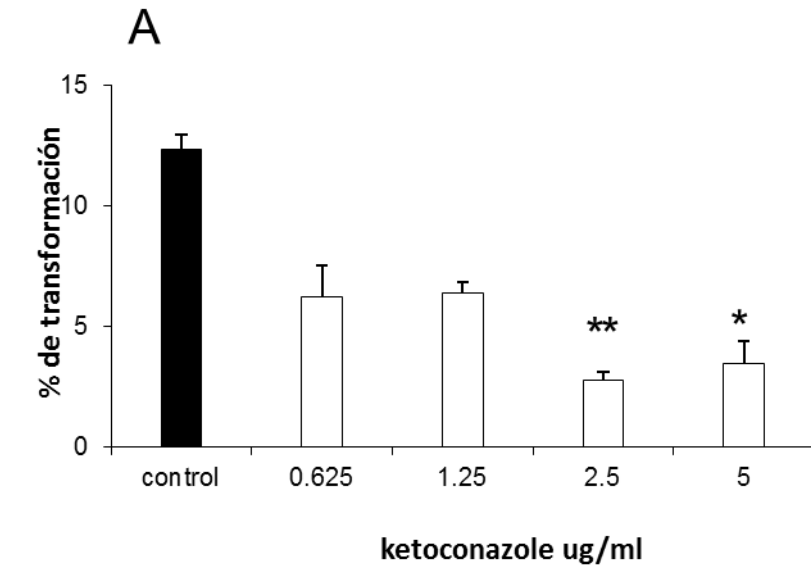


Fig. 14. Efecto dosis-respuesta y tiempo de respuesta del ketoconazol sobre la síntesis de DOC por cisticercos de *T. crassiceps* WFU incubados en presencia de progesterona tritiada. A, efecto de diferentes dosis de ketoconazol sobre la síntesis de 3H-DOC después de 24 horas de cultivo. B, efecto del ketoconazol a diferentes tiempos y dosis sobre la síntesis de 3H-DOC, □24 h, ▒48 h y ■72 h. Experimento representativo. Media± EE, n = 4 por cada tiempo de cultivo. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

Clonación y caracterización de la 17 β -HSD de cisticercos de *T.solium*

El genoma de *T.solium* contiene el gen 17 β -HSD que codifica para una proteína Tsol-17 β HSD

La secuencia genómica de la 17 β -HSD fue obtenida mediante un análisis *in silico* del Proyecto Genoma de *T.solium* (Tsai et al., 2013). Después de los análisis de todos los cDNA relacionados y secuencias genómicas encontradas, un gen similar al 17 β -HSD que se llamó Tsol17 β -HSD, fue identificada y caracterizada en el cisticerco de *T. solium*.

La secuencia, obtenida de una biblioteca completa de cDNA, mostró que la transcripción contenía un marco abierto de lectura (ORF) de 957 pb (Figura 14). Este gen de 1027 pb mostró un intrón de 70 pb (320-389 nt), que codifica para una proteína de 319 aa (Figura 15)

ATG	GCT	GTC	TTT	CTC	CTT	GTT	TGT	GTT	TTG	GGA	TTT	ATT	TTC	TTC	AAA
M	A	V	F	L	L	V	C	V	L	G	F	I	F	F	K
TTA	TTT	TGT	TTC	GGT	TGG	ATC	CTA	CTG	AGG	TAT	ACC	GAC	CCT	ATC	AAA
L	F	C	F	G	W	I	L	L	R	Y	T	D	P	I	K
CGC	GCA	CTG	TCG	AAA	CGG	CAT	GAA	CTC	AAA	TAC	GCT	GGC	GAA	TGG	GCC
R	A	L	S	K	R	H	E	L	K	Y	A	G	E	W	A
ATC	ATA	ACC	GGT	TCC	ACT	GAC	GGC	ATT	GGT	AGG	GCC	TTC	GCA	GAG	GAA
I	I	T	G	S	T	D	G	I	G	R	A	F	A	E	E
CTT	GCC	AGT	GAT	GGG	CTC	AAT	ATT	TTC	CTT	GTC	AGT	CGC	AAAT	GCT	GAA
L	A	S	D	G	L	N	I	F	L	V	S	R	N	A	E
AAA	CTT	CTA	CAT	GTG	TCT	CAG	GAC	CTT	GAA	CGT	GAA	TAC	AAAC	ATT	CAG
K	L	L	H	V	S	Q	D	L	E	R	E	Y	N	I	Q
ACA	AAG	TCT	TTC	GTT	GCT	GAT	TTC	ACT	AAA	GGT	GAT	TTT	TAT	GAG	GCT
T	K	S	F	V	A	D	F	T	K	G	D	F	Y	E	A
CTG	AAA	CGC	GAA	GTC	GAT	GCC	CTT	TCC	TCG	GTC	GCT	TGT	CTT	ATC	AAC
AL	K	R	E	V	D	A	L	S	S	V	A	C	L	I	N
AAC	GTC	GGG	ATG	TCC	CAA	GTT	TGC	GCG	GGT	CCA	TTG	GCT	ACC	TGT	GAA
N	V	G	M	S	Q	V	C	A	G	P	L	A	T	C	E
TTC	CTG	AAC	ACC	GAA	TAC	ATC	CAA	CGC	ATG	ATT	TTC	TGC	AAAC	ACC	GTA
F	L	N	T	E	Y	I	Q	R	M	I	F	C	N	T	V
TCC	ACT	GCT	TGT	ATG	ACG	CGG	GTT	ACA	ATG	CCC	AAG	ATG	CTG	TCG	TCC
S	T	A	C	M	T	R	V	T	M	P	K	M	L	S	S
TAC	GAG	AAG	GAC	CCC	AAG	CAT	CCA	CCT	TGT	GTT	ATT	AAAC	ATG	TCT	TCC
Y	E	K	D	P	K	H	P	P	C	V	I	N	M	S	A
GTC	TCA	GCC	CTC	TTC	CCT	CGC	CCC	TAT	AAA	TCC	CTC	TAC	GCC	GCA	TGC
V	S	A	L	F	P	R	P	Y	K	S	L	Y	A	A	C
AAG	TCA	TTT	GTG	CAG	AAT	TTC	TCG	GCG	TCT	GTT	GCC	GGA	GAA	ACA	AGC
K	S	F	V	Q	N	F	S	A	S	V	A	G	E	T	R
GAA	CTT	CTG	CGC	ACT	CGA	ATT	CGA	TTT	CTC	ACT	CTC	ACT	CCA	GGC	TTC
E	L	L	R	T	R	I	R	F	L	T	L	T	P	G	F
GTC	TGG	ACG	CCT	AGC	AGG	GGC	GAA	AAG	AAA	GTT	AAT	TTT	TTC	GTA	CCC
V	W	T	P	S	R	G	E	K	K	V	N	F	F	V	P
ACT	CCC	GAG	GTA	TTT	GCC	AAC	TCA	GCG	CTG	AAC	ATG	ATT	GGC	ATT	GCC
T	P	E	V	F	A	N	S	A	L	N	M	I	G	I	A
TCC	CAA	TGT	TGT	GGC	TTC	ATG	CCA	CAC	GAG	TTA	ATG	TTC	TTT	GGT	TTG
S	Q	C	C	G	F	M	P	H	E	L	M	F	F	G	L
GAA	TTA	CTA	CCC	GCC	TCT	TTC	CGC	GAT	TGG	ATC	ATC	GCC	AAG	TTT	GAA
E	L	L	P	A	S	F	R	D	W	I	I	G	K	F	E
CTT	AGG	CSG	GCG	GAG	GAA	TCC	CAA	TCG	CAC	GAG	AAG	ACC	CAG	TAG	E
L	R	R	A	E	E	S	Q	S	H	E	K	T	Q	*	

Fig. 15. La secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética Tsol-17 β HSD.

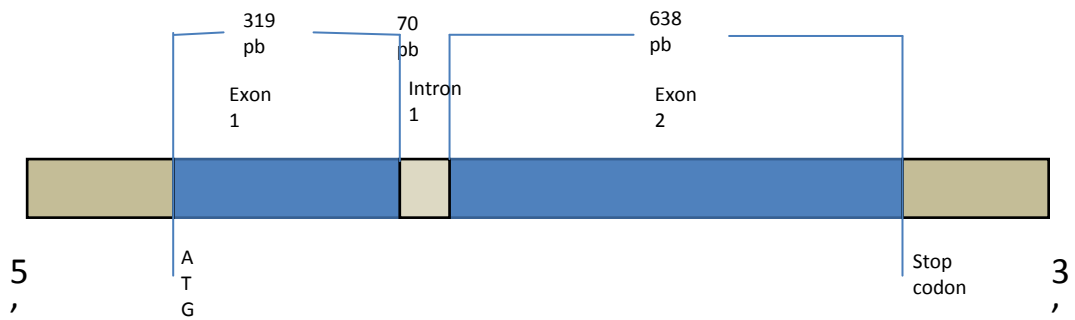


Fig. 16. Representación gráfica del fragmento genómico que contiene al gen Tsol-17HSD. La región codificante está contenida en 2 exones de 319 y 638 pb interrumpidos por un intrón de 70 pb entre las posiciones 320 a 389. Río arriba del codón de inicio se encuentra una región sin traducir (UTR) de 400 pb. Río abajo del codón de terminación hay otro UTR de 283 pb.

Homología de la proteína Tsol17 β -HSD

La alineación de la secuencia de aminoácidos de Tsol-17 β HSD con secuencias homólogas de otros organismos obtenidas de bases de datos públicas, mostró homología con las 17 β -HSDs tipo 3 y 12 de otras especies. La mayor homología encontrada (84%) correspondió a una secuencia proteica descrita en *E. multilocularis* (Tsai *et al.*, 2013). Comparaciones hechas con secuencias anotadas de 17 β -HSDs mostraron que la mayor homología de Tsol-17 β HSD fue de 44% con la 17 β -HSD 12 del platelminto *Clonorchis sinensis*, que tiene la capacidad de transformar estrógenos. Se encontró un 35% de homología con la 17 β -HSD 3 del *Bos taurus* y *Sus scrofa* y 36% con la de humano, que son capaces de transformar andrógenos (Tabla 2). La secuencia encontrada en el cisticerco de *T. solium* corresponde a una proteína de la superfamilia deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR). Esta familia comparte varias regiones de secuencias de aminoácidos que se encuentran también en la de Tsol-17 β HSD (Figura 16).

Análisis filogenético

El árbol NJ indicó que la secuencia de Tsol-17 β HSD de *T. solium* tiene una relación cercana con secuencias de otros Platyhelminthes como *E. multilocularis*, *C. sinensis*, *S. mansoni* y este grupo tiene un soporte de 100% bootstrap. Otro grupo de secuencias está conformado por proteínas de mamíferos, y también del nemátodo *C. elegans* que tiene una cercana relación con *B. taurus* 17B12 y *N. lapillus* 17B12 HSDs. Sin embargo, estos nodos recibieron un bajo soporte de bootstrap (Fig 19).

Tabla 3. Homología de la proteína Tsol-17 β HSD con la de otras especies cuya función se ha reportado

Sp.	Tipo	% homología	Sustratos
<i>C. sinensis</i>	17 β HSD12	44	Estrógenos
<i>S. japonicum</i>	17 β HSD12	41	Estrógenos
<i>C. elegans</i>	17 β HSD 3 y 12	29	Estrógenos y andrógenos
<i>S. salar</i>	17 β HSD12	36	Estrógenos
<i>X. tropicalis</i>	17 β HSD12	34	Estrógenos
<i>M. musculus</i>	17 β HSD3	32	Andrógenos
<i>M. musculus</i>	17 β HSD12	32	Estrógenos y andrógenos
<i>S. scrofa</i>	17 β HSD3	35	Andrógenos
<i>S. scrofa</i>	17 β HSD12	33	Estrógenos
<i>B. taurus</i>	17 β HSD3	35	Andrógenos
<i>B. taurus</i>	17 β HSD12	32	Estrógenos
<i>M. fascicularis</i>	17 β HSD12	32	Estrógenos
<i>H. sapiens</i>	17 β HSD3	36	Andrógenos
<i>H. sapiens</i>	17 β HSD12	32	Estrógenos

Fig. 17: Alineación de la secuencia de aminoácidos de Tsol-17 β HSD con homólogos de diferentes especies mostrando algunos sitios conservados y porcentaje de identidad: En amarillo se muestran los sitios conservados de la familia SDR: TGxxxGxG, YxxxK y PGxxxT; en azul, los miembros de la tétrada catalítica. El porcentaje de homología de Tsol17HSD con otras especies se muestran al final de la alineación. El programa de alineación utilizado fue MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin>).

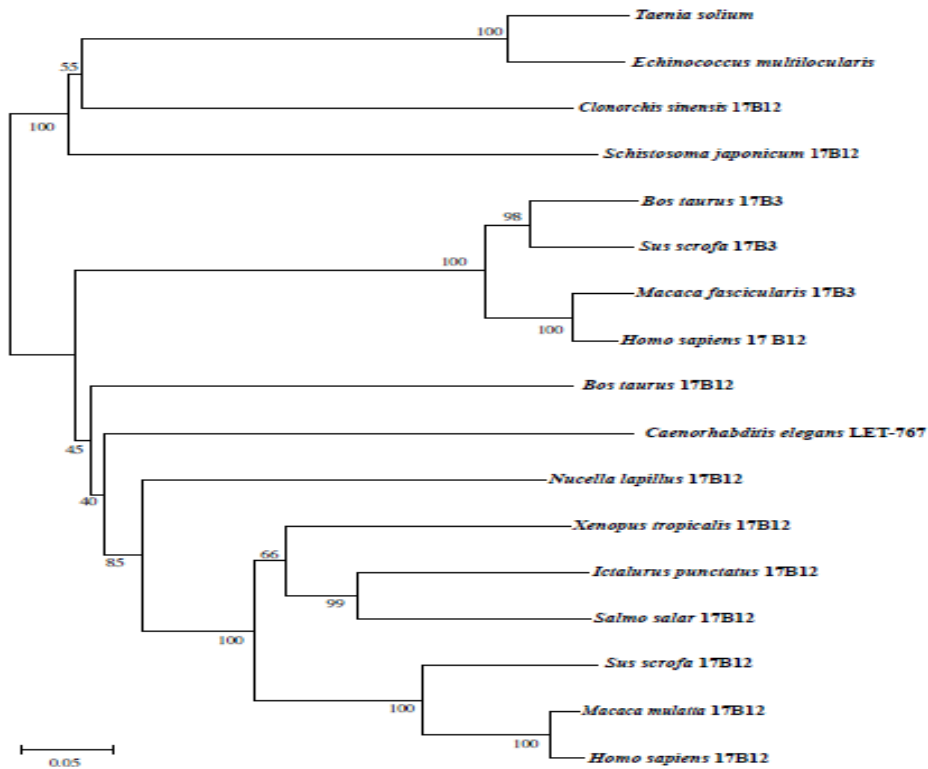


Fig. 18. Análisis filogenético. La secuencia de Tsol-17HSD de *T. solium* generada en este estudio fue alineada con otras secuencias de 17 β -HSD (tipo 12 y 3) encontradas en GenBank. El árbol Neighbor-joining fue deducido con 10,000 bootstraps registrados.

Ensayo enzimático

Cuando se incubaron con ^3H -androstenediona células HEK293-T previamente transfectadas con pcDNA3.1(+)-Tsol17 β -HSD se encontró síntesis de testosterona (Figura 18). La actividad de la enzima valorada por el porcentaje de transformación de ^3H -androstenediona a ^3H -testosterona se incrementó significativamente después de 48 h en presencia del precursor tritiado. Las células control no presentaron una síntesis significativa de testosterona.

La incubación de células transfectadas con ^3H -estrone no produjo diferencia significativa de la síntesis de estradiol comparada con las células control (Figura 19).

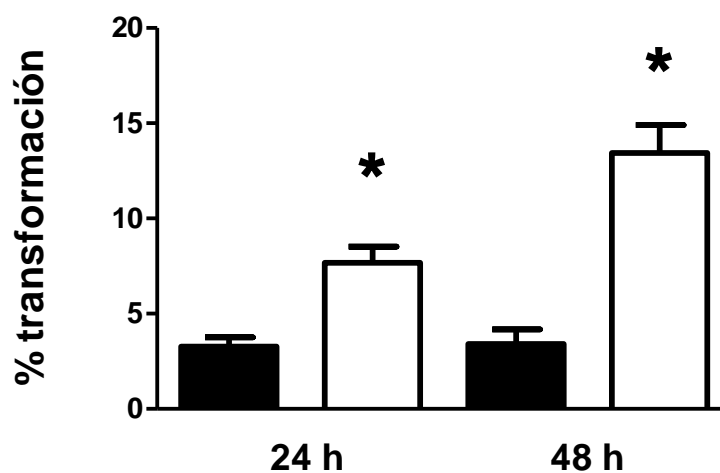


Fig. 19. Producción de testosterona por células HEK293T transfectadas con Tsol-17 β HSD-pcDNA3.1(+). Después de 24 h de transfección con □Tsol-17 β HSD-pcDNA3.1(+) o con ■ pcDNA3.1(+), las células se incubaron con ^3H -androstenediona por 24 ó 48 h. El porcentaje de testosterona tritiada sintetizada fue determinada por TLC. Media \pm EE (n=5 experimentos independientes). (*P<0.05)

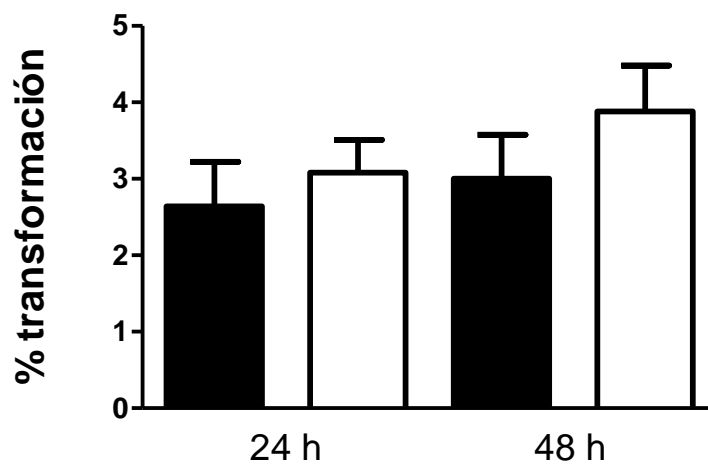


Fig. 20. Producción de estradiol por células HEK293T transfectadas con Tsol-17βHSD-pcDNA3.1(+). Después de 24 h de transfección con □Tsol-17βHSD-pcDNA3.1(+) o con ■ pcDNA3.1(+), las células fueron incubadas con ³H-estrone por 24 o 48 h. El porcentaje de estradiol tritizado sintetizado fue determinado por TLC. Media±EE (n=5 experimentos independientes).

DISCUSION

Efecto de inhibidores de la ruta esteroidogénica

Se demostró previamente que la metirapona, un inhibidor enzimático usado en el tratamiento de hipercortisolismo en humanos y animales domésticos, inhibe la síntesis de corticosteroides por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (Valdez *et al.*, 2012). Con base en dicho estudio se condujo un estudio exploratorio para evaluar la eficacia de otros inhibidores de enzimas esteroidogénicas sobre la síntesis de esteroides sexuales de cisticercos de *T. crassiceps* WFU que formó parte de esta tesis.

La importante inhibición de la síntesis de 17β -estradiol por los cisticercos expuestos a formestane encontrada en este estudio apoya la conclusión de que el parásito tiene una aromatasa similar a la que sintetiza estrógenos en los vertebrados. Los resultados muestran además la acumulación de testosterona después de 12 horas en presencia de formestane, lo que respalda el efecto de este inhibidor en la producción de estrógenos desde andrógenos, ya que al inhibir la capacidad de aromatización de dicho andrógeno, éste se acumula.

Además se investigó el efecto de danazol, un inhibidor enzimático que en otros organismos bloquea no sólo la síntesis de estrógenos, sino también la de diferentes enzimas esteroidogénicas como la 3β -HSD. El danazol inhibió en los cisticercos la síntesis de estradiol después de 6 horas de incubación cuando se utilizó a la ^3H -DHEA como precursor, un efecto que fue también observado en células cultivadas de la granulosa del folículo ovárico (Tsang *et al.*, 1979). Es interesante señalar que se ha demostrado que el danazol además inhibe la expresión de aromatasa en células endometriales obtenidas de pacientes con endometriosis (Ishihara *et al.*, 2003). La acumulación de ^3H -androstenediol observada después de 4 horas de incubación de los parásitos en la presencia de danazol, sugiere la inhibición de 3β -HSD. Después de 4 horas de incubación con danazol, la acumulación de testosterona sugiere un efecto sobre la aromatasa.

Deoxicorticosterona (DOC) es un metabolito intermedio en la síntesis de corticosterona por mamíferos y aves. Sin embargo, este esteroide es importante por sí mismo en peces donde regula el delicado metabolismo hidroelectrolítico requerido para ajustar el medio interno a diferentes ambientes salinos (Liilerich et al., 2011). En el presente estudio se encontró un efecto significativo del ketoconazol sobre la síntesis de DOC, después de la exposición al inhibidor por 24 horas. El efecto del ketoconazol puede deberse a la inhibición de una o más enzimas de la ruta esteroidogénica de corticosteroides. Como se ha descrito, la DOC ha sido asociada a la regulación de la ATPasa Na⁺-K, y Willms et al. (2004) mostró la presencia de esta enzima en los cisticercos. Por lo tanto la inhibición de la síntesis de DOC por un tratamiento a largo plazo con ketoconazol podría afectar la viabilidad del parásito. Los datos sugieren que algunas de las enzimas involucradas en la síntesis de DOC, como la 21 α -hidroxilasa fue inhibida por el ketoconazol. Aunque hay datos *in vivo* en la literatura indicando efectos de ketoconazol sobre la síntesis de esteroides sexuales en ratas (Heckman et al., 1992), los resultados obtenidos no apoyan la presencia de estos efectos en los parásitos.

Caracterización molecular y funcional de la enzima 17 β -HSD

La Tsol-17 β HSD encontrada en el genoma de *T. solium* conserva los dominios descritos en los miembros de la familia SDR, incluyendo la secuencia TGxxxGxG (parte del plegamiento Rossmann de unión del cofactor) entre los aa 51 al 58; YxxxK (sitio activo) entre los aa 205 y 209; PGxxxT (sitio activo C-terminal, el sitio de unión al sustrato) entre los aa 238 y 243 (Mindnich et al., 2004; Luu-The et al., 2006). En los SDRs se ha establecido una tétrada catalítica de residuos de Asn-Ser-Tyr-Lys (Oppermann et al 2003), que también se encuentra presente en el Tsol-17 β HSD en los aa 159, 192, 205 y 209 respectivamente. Todos estos dominios encontrados en la secuencia de Tsol-17 β HSD sugieren que se trata de la enzima 17 β -HSD con la misma actividad catalítica de esta familia.

En la región N-terminal de los SDRs clásicos, existe un patrón de tres residuos de glicinas que es característico de enzimas que unen NAD(P)(H) (Kallberg *et al.*, 2002). En la secuencia de aa de Tsol-17 β HSD podemos observar esta región entre los aa 51 al 58, lo que indica que la secuencia obtenida es una forma reductasa de la 17 β -HSD

La 17 β -HSD 12 en los mamíferos fue caracterizada como una 3-cetoacil-CoA reductasa involucrada en la síntesis de cadenas largas de ácidos grasos (Moon and Horton, 2003). Esta 17 β -HSD 12 es homóloga a la de la levadura YBR159 (Han *et al.*, 2002) y también se ha identificado en artrópodos (*D. melanogaster*) y nemátodos (LET-767 *C. elegans*) (Desnoyers *et al.*, 2007).

En 2006 se publicó un primer reporte de este tipo de 17 β -HSD que reduce la estrona transformándola en estradiol (Luu-The *et al.*, 2006); desde entonces han sido caracterizadas en otras especies con la misma actividad (tabla 2). A pesar de que el tipo 12 ha sido identificado como reductor de estrona, es comparativamente menos activa en la formación de estradiol que los tipos 1 y 7 (Laplante *et al.*, 2009).

En el caso del humano y el ratón la 17 β -HSD 12 comparte alrededor del 40% de identidad con 17 β -HSD 3 que cataliza la transformación de androstenediona en testosterona (Mindnich *et al.*, 2004). Una particularidad de los miembros de esta familia de enzimas es que poseen estructuras primarias muy diferentes, con sólo un 20% de identidad de aa (Oppermann *et al.*, 2003; Luu-The *et al.*, 2006) y es posible que el tipo 12 pudiera ser un ancestro del tipo 3 (Mindnich *et al.*, 2005). Observando el porcentaje de identidad de Tsol-17HSD con otras secuencias de 17 β -HSDs, la identidad más alta es con el tipo 12 del *C. sinensis* (44%) y con el *S. japonicum* (41%), ambos parásitos, pero cuando se comparan con organismos vertebrados la identidad es mayor con el tipo 3 (hasta un 36%) y con el tipo 12 es alrededor del 32%. Con esta información se seleccionaron androstenediona y estrona como precursores para los ensayos enzimáticos, considerando que éstos son los sustratos de los tipos 3 y 12 de la mayoría de las especies estudiadas.

Aunque la secuencia Tsol-17 β HSD tiene una mayor identidad con la secuencia de aa del tipo 12 de otras especies, la actividad mostrada por la secuencia obtenida del cisticerco de *T. solium* está relacionada con la actividad de una 17 β -HSD tipo 3 como podemos ver por la transformación de androstenediona a testosterona que se muestran en la figura 17 pero, no de estradiol desde estrona (fig. 18). En el caso del ratón (*M. musculus*) Blanchard and Luu-The (2007) demostraron que la 17 β -HSD 12 puede metabolizar androstenediona y estrona a su correspondientes metabolitos, testosterona y estradiol. Ellos asociaron esta capacidad con un cambio por una leucina en la posición 234 en la enzima del ratón, mientras que en humanos y primates esta posición es ocupada por una fenilalanina que impide la entrada de esteroides de 19 C (Blanchard and Luu-The; 2007). Cuando se hizo la comparación entre las secuencias de 17-HSD 12 del humano, ratón y *T. solium*, se encontró que en esta posición tanto en la secuencia del humano y el cisticerco hay una fenilalanina, lo cual indica que en el caso del parásito no existe un impedimento dado por la fenilalanina para evitar la entrada de sustratos androgénicos.

CONCLUSIONES

La primera parte de este estudio indica que las enzimas esteroidogénicas del cisticerco de *T. crassiceps* WFU pueden ser inhibidas por inhibidores enzimáticos clásicos. Como se mostró previamente en éste y otros laboratorios, la sobrevivencia y desarrollo de los parásitos dependen de la presencia de esteroides sexuales, por lo tanto la inhibición de su síntesis es un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos, o el reemplazo de la terapia usual en infecciones parasitarias resistentes.

La segunda parte de este estudio mostró que el cisticerco de *T. solium* posee una enzima 17β -HSD que cataliza la transformación de androstenediona a testosterona, que pertenece a la familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta y que comparte sitios conservados y actividad con la enzima tipo 3 de otras especies. El presente fue el primer estudio realizado que mostró la expresión y actividad de una enzima esteroidogénica en el cisticerco de *T. solium*.

PERSPECTIVAS

La inhibición de la síntesis de esteroides sexuales puede ser un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos de la cisticercosis, o para mejorar la terapia utilizada actualmente en la infección parasitaria resistente.

Se demostró en esta tesis que el cisticerco de la *T. solium* tiene una 17 β -HSD que transforma esteroides sexuales con menor actividad a otros muy potentes como la testosterona. Es necesario investigar si esta actividad es reversible como sucede en algunas especies, lo que indicaría que el parásito tiene también otros tipos de 17 β -HSD.

BIBLIOGRAFIA

- Adams ML, Meyer E, Cicero TJ. Imidazoles suppress rat testosterone secretion and testicular interstitial fluid formation in vivo. *Biol Reprod* 1998; 59:248-254.
- Adamski J, Normand T, Leenders F, Monte D, Begue A, Stehelin D, Jungblut PW, de Launoit Y. Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem. J.* 1995; 311:437-443.
- Adamski J, Jakob F. A guide to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell Endocrinol.* 2001; 171:1-4.
- Aguiar-Delfín I, Homer MJ, Wettstein PJ, Persing DH. Innate resistance to *Babesia* infection influenced by genetic background and gender. *Infect immune* 2001; 69:7955-7958.
- Aguilar-Díaz H, Bobes RJ, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos MA, Dávila G, Rodríguez-Dorantes M, Escobedo G, Fernández JL, Fragoso G, Gaytán P, Garciarubio A, González VM, González L, José MV, Jiménez L, Lacleite JP, Landa A, Larralde C, Morales-Montor J, Morett E, Ostoa-Salao P, Scuitto E, Santamaria RI, Soberón X, de la Torre P, Valdés V, Yáñez J. The genome Project of *Taenia solium*. *Parasitology International* 2006; 55:S127-S130
- Andersson S, Geissler WM, Patel S, Wu L. The molecular biology of androgenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53:37-39.
- Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* 1997; 62:143-147.
- Andrade-Nieto VV, Theodore Cicco NN, Ferreira Cunha-Junior E, Marcuzzo Canto-Cavilheiro M, Correa Atella G, Torres-Santos EC. The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Tropica* 2011; 119:194-198.

- Amin A. Ketoconazole-induced testicular damage in rats reduced by Gentiana extract. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59:377-384.
- Ayub M y Levell MJ. Inhibition of testicular 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase but not 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase or 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase by ketoconazole and other imidazoles drugs. *J Steroid Biochem* 1987; 28:521-531.
- Barbieri RL, Canica JA, Makris A, Todd RB, Ryan KJ. Danazol inhibits steroidogenesis. *Fertil Steril* 1977; 28:809-813.
- Barbieri RL, Lee H, Ryan KJ. Danazol binding to rat androgen, glucocorticoid, progesterone, and estrogen receptors: correlation with biological activity. *Fertil Steril* 1979; 31:182-188.
- Barbieri RL, Osathanondh R, Ryan KJ. Danazol inhibition of steroidogenesis in the human corpus luteum. *Obstet. Gynecol.* 1981; 57:722-724.
- Becerro M. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *RAMD*, 2008; 1:22-36.
- Berman JD, Holz GG, Beach DH. Effects of ketoconazole on growth and sterol synthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 12:1-13.
- Blanchard PG and Luu-The V. Differential androgen and estrogen substrates specificity in the mouse and primates types 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Endocrinol* 2007; 194:449-455.
- Bork S, Yokoyama N, Matsuo T, Claveria GF, Fujisaki K, Igarashi I. Clotrimazole, ketoconazole, and clidinafop-propargyl inhibit the *in vitro* growth of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* (Phylum Apicomplexa). *Parasitology* 2003; 127:311-315.
- Bork S, Yokoyama N, Matsuo T, Claveria FG, Fujisaki K, Igarashi I. Clotrimazole, ketoconazole, and clidinafop-propargyl as potent growth inhibitors of equine *Babesia* parasites during *in vitro* culture, *J. Parasitol* 2003; 89:604-606.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Scuitto E, Sarralde C. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to

experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1993; 79:384-389.

- Botero D, Uribe CS, Sánchez JL, Alzate T, Velásquez G, Ocampo NE, Villa LA. Short course albendazole treatment for neurocysticercosis in Columbia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;
- Breitling R, Krazeisen A, Möller G, Adamski J. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type7-an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171:199-204.
- Brodie A. Aromatase inhibitors in breast cancer. *Trends Endocrinol Metabolism* 2002; 13:61-65
- Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R, Lam EWF. Steroid receptor action. *B Prac R Clin Obst Gyn* 2004; 18:265-283.
- Brown JW y Fishman LM. Biosynthesis and metabolism of steroid hormones by human adrenal carcinomas. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33:1235-1244
- Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole and exemestane. *Cancer* 2002; 95:2006-2016.
- Castellanos Sánchez VO, Gómez-Conde E, Rocha-García RD, Pimentel A, Aluja AS, Hernández-Jauregui P, Huerta M, Díaz-Orea MA. Chorionic gonadotropin hormone receptors on *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci in culture. *J Parasitol* 2009; 95:1287-1294.
- Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. Glucocorticoids and their actions. An Introduction. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1024:1-8.
- Cheng S, Harding BW, Carballeira A. Effects of metyrapone on pregnenolone synthesis and of cholesterol-cytochrome P-450 interaction in the adrenal. *Endocrinology* 1974; 94:1451-1458
- Chrousos GP, Kino T. Glucocorticoid signaling in the cell. *Glucocorticoids and Mood. Ann NY Acad Sci* 2009; 1179:153-166
- Corbould AM, Judd SJ, Rodgers RJ. Expression of types 1, 2, and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in subcutaneous abdominal

and intra-abdominal adipose tissue of women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:187-194.

- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996; 81:820-827.
- Del Brutto OH, Sotelo J, Román GC. Neurocysticercosis. A clinical Handbook; Swets & Zeitlinger BV, Lisse, 1998
- Delvalle B. Larvae of *Taenia crassiceps* (cestoda): host specificity and localisation. *Parasitol Res.* 1989; 76:181-182.
- Desnoyers S, Blanchard PG, St-Lauren JF, Gagnon SN, Baillie DL, Luu-The V. *Caenorhabditis elegans* LET-767 is able to metabolize androgens and estrogens and likely shares common ancestor with human types 3 and 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Endocrinol.* 2007; 195: 271-279.
- Devine C, Brennan GP, Lanasse CE, Alvarez LE, Trudgett A, Hoey E, Fairweather I. Inhibition of triclabendazole metabolism *in vitro* by ketoconazole increases disruption to the tegument of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola Hepatica*. *Parasitol Res* 2011; 109:981-995.
- Dluhy RG, Lifton RP. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84:4341-4144.
- Dufort I, Rheault P, Huang XF, Soucy P, Luu-The V. Characteristics of a highly labile human type 5 17 hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1999; 140:568.574.
- Dunn AM. Parasitic manipulation of host life history and sexual behavior. *Bahavioural Processes*, 2005; 68:255-258.
- Eom KS. What is Asian *Taenia*? *Parasitol Int.* 2006; 55:137-141
- Escobedo F, Penagos P, Rodriguez J, Sotelo J. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch Inter Med* 1987; 147:738-741.
- Everhast ME, Kuhn RE, Zelmer DA. Intrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. *J Parasitol* 2004; 90:79-84

- Fassnacht M, Hahner S, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B. New mechanism of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *Eur J Clin Invest Suppl* 2000; 3:76–82.
- Feelders RA, Hofland LJ, Herder WW. Medical treatment of Cushing's syndrome: Adrenal- blocking drugs and ketoconazole. *Neuroendocrinology* 2010; 92:11-115.
- Feix M, Wolf ., Schweikert HU. Distribution of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171:163-164.
- Fernández-Presas AM, Valdez RA, Willms, Romano MC. The key of steroidogenic enzyme 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU). *Parasitol Res.* 2008; 103:847-852.
- Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto, E. Symptomatic human neurocysticercosis-age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol.* 2004; 251:830-837
- Folkestad L, Bjarnason NH, Bjerregaard JK, Brixen K. The effect of aromatase inhibitors on bone metabolism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 104:3-10
- Franchimont P y Cramillon C. The effect of danazol on anterior pituitary function. *Fert Steril* 1977; 28:814-817.
- Gómez OS, Gutiérrez AAM, Valenzuela P EL. Corticoids: 60 years later a pending subject. *Rev Cienc Salud* 2007; 5:58-69
- Gómez Y, Valdez RA, Larralde C, Romano MC. Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cysticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74:143-147.
- Gourbal BEF, Gabrion C. A study of mate choice in mice with experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis: can males choose? *Can J Zool*, 2004; 82:635-643.

- Gupta GS. Proteomics of spermatogenesis. Specificity of retinol, estrogen and steroid linked proteins. Chapter 4. Ed Springer. NY, USA 2005.
- Heckman WR, Kane VR, Pakyz RE, Cosentino MJ. The effect of ketoconazole on endocrine and reproductive parameters in male mice and rats. *J Andrology* 1992; 13:191-198
- Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003; 1:52-66.
- Hinojosa L, Valdez RA, Salvador V, Rodríguez AG, Willms K, Romano MC. The effect of glucocorticoids on sex steroid synthesis in cultured *Taenia crassiceps* WFU cysticerci. *J Helminthology* 2012; 86:465-469.
- Hontoria F, González MA, Sitja-Bobadilla A, Palenzuela O, Alvarez-Pellitero P. Ketoconazole inhibits the growth and development of *Ichthyophonus* sp. (Mesomycetozoa) in vitro. *J Eukaryot Microbiol* 2009; 56:848-491.
- Howe D, Heintzen RA. Replication of *Coxiella burnetii* is inhibited in CHO K-1 cells treated with inhibitors of cholesterol metabolism. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1063 :123-129.
- Huerta L, Terrazas LI, Sciutto E, Larralde C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cisticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol*, 1992; 78:471-476.
- Ishihara H, Kitawaki J, Kado N, Koshiba H, Fushiki S, Honjo H. Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalise aromatase cytochrome P450 expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis and leiomyomas. *Fert Steril* 2003; 79:735-742.
- Jiménez P, Valdéz RA, and Romano MC. Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Steroid Biochem. Mol* 2006; 99:203-208
- Jörnvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 1995; 34:6003-6013.

- Jung H, Cárdenas G, Scuitto E, Fleury A. Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2008; 8:424-433.
- Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H, Persson B. Short chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur J Biochem* 2002; 269:4409-4417.
- Kan PB, Hirst MA, Feldman D. Inhibition of steroidogenic cytochrome P-450 enzymes in rat testis by ketoconazole and related imidazole antifungal drugs. *J Steroid Biochem* 1985; 23:1023-1029.
- Kiilerich P, Tipsmark CK, Borski RJ, Madsen SS. Differential effects of cortisol and 11-deoxycorticosterone on ion transport protein mRNA levels in gills of two euryhaline teleosts, Mozambique tilapia and striped bass. *J of Endocrinol* 2011; 209:115-126
- Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 2004; 26:247-264.
- Kim KH, Lee YS, Jeon HK, Park KJ, Kim CB, Eom KS. Hox genes from the tapeworm *Taenia asiatica* (Platyhelminthes: Cestoda). *Biochem Genet.* 2007; 45:335-343
- Laplante Y, Rancourt C, Poirier D. Relative involvement of three 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 301:146-153.
- Larralde C, Aluja A. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Secretaría de Salud, Fondo de Cultura Económica. México, 2006.
- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Scuitto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. Serioepidemiology of cisticercosis in Mexico. *Salud Pública Mex.* 1992;34:197:210.
- Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;52:575-580

- Lefevre A, Rogier E, Astraud C, Duquenne C, Finazz C. Regulation by retinoids of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} -isomerase and 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid levels in the K9 mouse Leydig cell line. *Mol Cell Endocrinol* 1994;106:31-39.
- Lee HK, Yoo MS, Choi HS, Kwon HB, Soh J. Retinoic acids up-regulate steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 148:1-10.
- Lukacik P, Kavanagh KL, Oppermann U. Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248:61-71.
- Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 76:143-151.
- Luu-The V, Tremblay P, Labrie F. Characterization of type 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol Endocrinol* 2006; 20:437-443.
- Marcus PI, Talalay P. Induction and purification of alpha and beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 1965; 234:2009-2013.
- McTernan PG, Anderson LA, Anwar AJ, Eggo MC, Crocker J, Bennett AH, Stewart PM, Kumar S. Glucocorticoid regulation of P450 aromatase activity in human adipose tissue: gender and site differences. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1327-1336.
- Mindnich R, Deluca D, Adamski J. The role of 17-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 218:7-20.
- Mindnich R, Haller F, Halbach F, Moeller G, Hrabe de Angelis M, Adamski J. Androgen metabolism via 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in mammalian and non-mammalian vertebrates: comparison of the human and the zebrafish enzyme. *J Mol Endocrinol* 2005; 35:305-316.

- Moon YA, Horton JD. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem* 2003; 278:7335-7343.
- Morales-Montor J, Baig S, Hallal-Calleros C, Damián RT. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Experimental Parasitology*. 2002; 100:209-216
- Morales-Montor J, Hallal-Caballeros C, Romano MC, Damian RT. Inhibition of P450-aromatase prevents feminization and induces protection during cisticercosis. *Inter J Parasitol*. 2002; 32:1379-1387
- Morales-Montor J, Larralde C The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology*, 2005; 131:287-294
- Munetsuna E, Hojo Y, Hattori M, Ishii H, Kawato S, Ishida A, Kominami SAJ, Yamazaki T. Retinoic acid stimulates 17 β -estradiol and testosterone synthesis in rat hippocampal slice cultures. *Endocrinology* 2009; 150:4260:4269.
- Murakami K, Nomura K, Shinohara K, Kasai T, Shozu M, Inoue M. Danazol inhibits aromatase activity of endometriosis derived stromal cells by a competitive mechanism. *Fert Steril* 2006; 86:291-297.
- Nagai K, Miyamori I, Ikeda M, Koshida H, Takeda R, Suhara K, Katagiri M. Effect of ketoconazole (an imidazole antimycotic agent) and other inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P450-catalyzed reactions. *J Steroid Biochem* 1986; 24:321-333
- Nakajin S, Takahashi M, Higashiyama K, Shinoda M. Evidence for involvement of cytochrome P450-linked oxygenase system in the conversion of C21-steroids to delta 16-C-19-steroids catalyzed by pig testicular microsomes. *J Biochem* 1985; 98:615-520.
- Oppermann U, Salim S, Hult M, Eissner G, Jornvall H. Regulatory factors and motifs in SDR enzymes. *Adv Exp Med* 1999; 463:365-371.
- Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu XQ, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jornvall H. Short-chain

dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* 2003; 143:247-253.

- Osslor E, Borg B, Brunstrom B, Håkansson H, Klasson-Wehler E. Endocrine disrupting substances. Impairment of reproduction and development. Swedish Environmental Protection Agency. Elanders Gotab, Stockholm Sweden, 1998. pp. 17-29.
- Pasley JN. Effects of metyrapone on reproductive organs of the meadow vole *Microtus pennsylvanicus*. *J Reprod Fert* 1974; 40:451-453.
- Parthasarathy C, Balasubramanian K. Assessment of in Vitro effects of metyrapone on Leydig cell steroidogenesis. *Steroids* 2008; 73:328-338.
- Peltoketo H, Isomaa V, Poutanen M, Vihko R. Expression and regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Endocrinol* 1996; 150:21-30.
- Peltoketo H, Luu-The V, Simard J, Adamski J. 17-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 1999; 23:1-11.
- Penning TM. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of the steroid. *Human Reproduction Update* 2003; 9:193-205.
- Persson B, Kallberg Y, Oppermann U, Jornvall H. Coenzyme based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* 2003; 143-144:271-278.
- Rangel R, Torres B, Del Brutto O, Sotelo J. Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 1987;36:387-392
- Ridditid W, Ratsamemonhton K, Mahatthanatrakul W, Wongnawa M. Pharmacokinetic interaction between ketoconazole and praziquantel in healthy volunteers. *J Clin Pharm Ther* 2007; 32:585-593
- Rizner TL, Zakelj Mavric M, Plemenitas A, Zorco M. Purification and characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase from the

filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. J Steroid Biochem Mol Biol 1996; 59:205-214.

- Rizner TL, Stojan J, Adamski J. Searching for the physiological function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase from fungus *Cochliobolus lunatus*. Mol Cell Endocrinol 2001; 171:193-198.
- Romano MC, Valdez RA, Cartas AL, Gomez Y, Larralde C. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003; 85:221-225
- Romano MC, Valdez RA, Hinojosa L, Gomez Y, Jimenez P. Are hormones relevant for the search and desing of anti-parasitic drug? Curr Top Med Chem. 2008; 8:408-418.
- Rose GL, Dowsett M, Mudge JE, White JO, Jeffcoate SL. The inhibitory effects of danazol, danazol metabolites, gestrione, and testosterone on the growth of human endometrial cells in vitro. Fert Steril 1988; 49:224-228.
- Sciutto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensjy T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. Parasitol Res, 1991; 77:243-246.
- Schmidt M, Löffler G. Induction of aromatase in stromal vascular cells from human breast adipose tissue depends on cortisol and growth factors. FEBS Lett 1994; 341:177-181
- Schuurs AH, Verheul HA. Effects of gender and sex steroids on the immune response. J Steroid Biochem 1990; 35:157-172.
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, Mendelson CR. Aromatase expression in health and disease. Recent Prog Horm Res 1997; 52:185-213.
- Sorvillo FJ, DeGiorgio C, Waterman SH. Deaths from cysticercosis United States. Emerg Infect Dis 2007; 13:230-235.

- Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms . Arch Intern Med. 1985;145:442-445
- Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, Schramm J, Bidlingmaier JF, Klingmuller D. Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 3 and 4 in the human temporal lobe. J Endocrinol 1999; 160:119-126.
- Steckelbroeck S, Watzka M, Reissinger A, Wegener-Topfer P, Bidlingmaier F, Bliesener N, Hans VH, Clusmann H, Ludwig M, Siekmann L, Klingmuller D. Characterization of estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) activity in the human brain. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 86:79-92.
- Takayanagui OM, Jardim E. Therapy for neurocysticercosis. Comparison between albendazole and praziquantel. Arch Neurol 1992; 49:290-294
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. A role for 17beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 1994; 80:563-568.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T y Larralde C. Shift from early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol 1998; 84:74-81.
- Thomas F, Adamo S, Moore J. Parasitic manipulation: where are we and should we go? Behav Process, 2005; 68:185-199.
- Toenjes A, Cruz C, Fragoso G, Laciette JP, Merchant MT, Hernández M, Scuitto. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. J Parasitol. 1999;118:623-633
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Scuitto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernández C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol,

S., Paps, J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y, Taenia solium Genome Consortium, Cai X, Soberón PD, Olson, Laclette JP, Brehm K, Berriman M. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013; 496:57-63.

- Tsang BK, Henderson KM, Armstrong DT. Effect of danazol on estradiol-17beta and progesterone secretion by porcine ovarian cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133:256-259
- Storey DM. Vitamin A deficiency and the development of *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea) in cotton rats. *Z Parasitenkd* 1982; 67:309-315.
- Valdez RA, Jiménez P, Cartas AL, Gómez Y, Romano MC. *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens in vitro. *Parasitol Res.* 2006; 98:472-476.
- Valdez RA, Hinojosa L, Willms K, Romano MC. *Taenia crassiceps* WFU cysticerci synthesize corticosteroids in vitro: Metirapone regulates the production. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 176:409-414.
- Vihko P, Isooma VV, Ghosh D,. Structure and function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase typi 1 and 2. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171:71-76.
- Valli G, Sudha S, Ravi Sankar B, Govindarajulu P, Srinivasan N. Altered corticosterone status impairs steroidogenesis in the granulosa and theca cells of Wistar rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 73:153-158.
- Wang X, Chen W, Huang Y, Sun J, Men J, Liu H, Luo F, Guo L, Lv X, Deng C, Zhou C, Fan Y, Li X, Huang L, Hu Y, Liang C, Hu X, Xu J, Yu X. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonochis sinensis*. *Genome Biol* 2011; 12:R107
- Weber MM, Will A, Adealman B, Engelhardt D. Effect of ketoconazole on human ovarian C17,20-desmolasa and aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 38:213-218.
- White Jr AC, Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infec Dis* 1997; 24:101-113

- Wickenheisser KJ, Nelson-DeGrave VL, Hendricks KL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4858-4865.
- Willms K, Robert L, Jiménez JA, Everhart M, Kuhn RE. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps strobilae* WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Teaniidae) from golden hamsters. *Parasitol Res* 2004; 93:262-267.
- Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: In vitro and in vivo models. *Parasitology* 2010; 137:335-346.
- Zhao Y, Nichols JE, Valdez R, Mendelson CR, Simpson ER. Tumor necrosis factor-alpha stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1350-1357.
- Zhai H, Zhou J, Cai Z. Cloning characterization, and expression analysis of a putative 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 11 in the abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 130:57-63.
- Zhou Y, Zheng H, Chen Y, Zhang L, Wang K, Guo J, Huang Z, Zhang B, Huang W, Jin K, Dou T, Hasegawa M, Wang L, Zhang Y, Zhou J, Tao L, Cao Z, Li Y, Vinar T, Brejova B, Brown D, Li M, Miller DJ, Blair D, Zhong Y, Chen Z, Liu F, Hu W, Wang ZQ, Zhang QH, Song HD, Chen S, Xu X, Xu B, Ju C, Huang Y, Brindley PJ, McManus DP, Feng Z, Han ZG, Lu G, Ren S, Wang Y, Gu W, Kang H, Chen J, Chen X, Chen S, Wang L, Yan J, Wang B, Lu X, Jin L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhang W, Hu Q, Zhu G, Wang J, Yu J, Wang J, Yang H, Ning Z, Beriman M, Wei CL, Ruan Y, Zhao G, Wang S, Liu F, Zhou Y, Wang ZQ, Lu G, Zheng H, Brindley PJ, McManus DP, Blair D, Zhang QH, Zhong Y, Wang S, Han ZG, Chen Z, Wang S, Han ZG, Chen Z. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* 2009; 460:345-351.

- Zhou LY, Wang DS, Senthilkumaran B, Yoshikuni M, Shibata Y, Kobayashi T, Sudhakumari CC, Nagahama Y. Cloning, expression and characterization of three types of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Mol Endocrinol* 2005; 35:103-116.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

General and Comparative Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygcen

Steroid synthesis by *Taenia crassiceps* WFU cysticerci is regulated by enzyme inhibitorsA. Aceves-Ramos^a, R.A. Valdez^a, B. Gaona^a, K. Wilms^b, M.C. Romano^{a,*}^aUniv. de Física y Biología y Neurociencias, QWESTAV del IPN, Apdo. Postal 14-760, 07260 Mexico D.F., Mexico
^bUniv. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, 04510 Mexico D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 20 April 2013Keywords:
Steroid synthesis
Parasites
Taenia crassiceps WFU cysticerci
Formestane
Danazol
Ketozonazole

ABSTRACT

Cysticerci and tapeworms from *Taenia crassiceps* WFU, ORF and *Taenia solium* synthesize sex-steroid hormones *in vitro*. Corticosteroids increase the 17 β -estradiol synthesis by *T. crassiceps* cysticerci. *T. crassiceps* WFU cysticerci synthesize corticosteroids, mainly 11-deoxycorticosterone (DOC). The aim of this work was to investigate whether classical steroidogenic inhibitors modify the capacity of *T. crassiceps* WFU cysticerci to synthesize corticosteroids and sex-steroid hormones. For this purpose, *T. crassiceps* WFU cysticerci were obtained from the abdominal cavity of mice, pre-cultured for 24 h in DMEM+ antibiotics/antimycotics and cultured in the presence of tritiated progesterone (³H-P4), and androstenedione (³H-A₄), or dihydroepiandrosterone (³H-DHEA) plus different doses of the corresponding inhibitors, for different periods. Blanks with the culture media adding the tritiated precursors were simultaneously incubated. At the end of the incubation period, parasites were separated and media extracted with ether. The resulting steroids were separated by thin layer chromatography (TLC). Data were expressed as percent transformation of the tritiated precursors. Results showed that after 2 h of exposure of the cysticerci to 100 μ M formestane, the ³H-17 β -estradiol synthesis from tritiated androstenedione was significantly inhibited. The incubation of cysticerci in the presence of ³H-DHEA and danazol (100 nM) resulted in ³H-androstenediol accumulation and a significant reduction of the 17 β -estradiol synthesis. The cysticercal ³H-DOC synthesis was significantly inhibited when the parasites were cultured in the presence of different ketoconazole doses. The drug treatments did not affect parasite's viability. The results of this study showed that corticosteroid and sex-steroid synthesis in *T. crassiceps* WFU cysticerci can be modified by steroidogenic enzyme inhibitors. As was shown previously by our laboratory and others, parasite survival and development depends on sex-steroids, therefore the inhibition of their synthesis is a good starting point exploited in situations where the inhibition of steroidogenesis could help to control the infection for the development of new treatments, or replacement of the usual therapy in resistant parasite infections. We raise the possibility that these drug actions may be beneficially.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The infection with cysticerci, the larval stage of *Taenia solium* in the human brain is known as neurocysticercosis and is the main cause of adult epilepsy in endemic countries, where it affects mainly pigs and humans (White, 1997). Neurocysticercosis (NC) constitutes a public health problem in many underdeveloped countries from which immigration of persons infected with *T. solium* tapeworms has increased the spread of this zoonotic disease to industrialized countries in recent years (Sorvilho et al., 2007).

T. crassiceps WFU cysticerci and tapeworms have been extensively used as experimental models to investigate features related to human and pig cysticercosis because they share immunological

and morphological properties with *T. solium* parasitosis (Wilms and Zarabian, 2010).

Neurocysticercosis treatment remains a difficult clinical problem. Both host and parasite factors can contribute to variations in the response to treatment. The presence of cysticerci in the human brain and the administration of cystocidal drugs induce local inflammation, thus, immunoregulatory agents as glucocorticoids are employed and have proved to be effective in reducing inflammation in the brain (Jung et al., 2008). However, the therapeutic process can be lengthy and can also escalate symptoms and leave severe neurologic deficits in patients (Jung et al., 2008).

Sex-steroid hormones are synthesized by cysticerci and worms of *T. solium* and *Taenia crassiceps* WFU and ORF cysticerci. These parasites have the capacity to synthesize androstenedione, testosterone and estrogens, as well as androstenediol, testosterone and oestrogens through the 3 α -oxo-4-ene and 3 β -hydroxy-5-ene

* Corresponding author. Fax: +52 55 57473800x5109.

E-mail address: mromano@biocinvest.mx (M.C. Romano).



Cloning, characterization and functional expression of *Taenia solium* 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase



A. Aceves-Ramos^a, P. de la Torre^b, L. Hinojosa^a, A. Ponce^a, R. García-Villegas^a, J.P. Lactette^b, R.J. Bobes^b, M.C. Romano^{a,*}

^aUniv. de Hidalgo, Biología y Neurociencias, QUWESTAV #1 IPN, Apdo. Postal 14-760, 07000 México D.F., México

^bUniv. de Zaragoza, Instituto de Investigaciones Biomédicas, IIBAM, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 1 April 2014

Keywords:
Steroid synthesis
Parasites
Taenia solium cysticerci
17 β -HSD
Cloning
Transfection

ABSTRACT

The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSD) are key enzymes involved in the formation (reduction) and inactivation (oxidation) of sex steroids. Several types have been found in vertebrates including fish, as well as in invertebrates like *Caenorhabditis elegans*, *Clonostachyus* and *Malacostraca* diverse crustaceans. To date limited information is available about this enzyme in parasites. We showed previously that *Taenia solium* cysticerci are able to synthesize sex steroid hormones *in vitro* when precursors are provided in the culture medium. Here, we identified a *T. solium* 17 β -HSD through in silico blast searches in the *T. solium* genome database. This coding sequence was amplified by RT-PCR and cloned into the pCDNA 3.1(+) expression vector. The full length cDNA contains 957 bp, corresponding to an open reading frame coding for 319 aa. The highest identity (84%) at the protein level was found with the *Edrioscopus multifasciatus* 17 β -HSD although significant similarities were also found with other invertebrate and vertebrate 17 β -HSD sequences. The *T. solium* Trcl-17 β HSD belongs to the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) protein superfamily.

HEK293T cells transiently transfected with Trcl17 β -HSD induced expression of Trcl17 β -HSD that transformed ³H-androstenedione into testosterone. In contrast, ³H-androstene was not significantly transformed into estradiol. In conclusion, *T. solium* cysticerci express a 17 β -HSD that catalyzes the androgen reduction. The enzyme belongs to the short chain dehydrogenase/reductase family and shares motif and activity with the type 3 enzyme of some other species.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The cysticercus is the metacercarial stage of the hermaphroditic tapeworm *Taenia solium*. The larval stage of this parasite is a bladder with an inverted scolex and neck covered by a syncytial tegumentary tissue from which the tapeworm develops. The adult taenia scolex attaches to the intestinal wall of the definitive host (Merchant et al., 1997). From the neck the tapeworm generate the strobila, a string of independent units called proglottids, which in their mature stage contain the testis and ovaries (Williams et al., 2008). The developing testis can be found in the very early immature proglottids, while the ovaries develop later. *T. solium* cysticerci cause diseases in the pig where they can be mostly found in the muscles, and in the human brain causing neurocysticercosis.

T. solium cysticerci have the ability to transform androstenedione to testosterone (Valdez et al., 2006) which suggested the existence

of steroidogenic enzymes as 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSD) in the parasites. These proteins are key enzymes involved in the formation (reduction) and inactivation (oxidation) of sex steroids. Several types have been found in many species. The 17 β -HSDs are included in two protein superfamilies: short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) and aldo-ketoreductase (AKR) (Oppermann et al., 1999; Penning, 2003). The SDRs have been divided into two large families: classical and extended, with different glycine motifs in the coenzyme-binding regions and different chain lengths (250 residues in classical and 350 in extended) (Jönvall et al., 1995). Amino acid sequence similarity is low between SDRs (around 15–30%), but the 3D folds are quite similar except for the C-terminal regions that constitutes the substrate binding site (Kallberg et al., 2002). The 3D structures of SDRs are highly similar in the α/β folding patterns with Rossmann-fold, consisting of a central β -sheet flanked by α -helices (Oppermann et al., 2003).

The different types of 17 β -HSDs already described in mammals have unidirectional activities (Luu-The et al., 2006). For example, the conversion of dehydroepiandrosterone (DHEA) to

* Corresponding author. Fax: +52 55 57472800x5109.
E-mail address: romano@biocinvest.mx (M.C. Romano).