

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“PERFIL ESTEROIDEO EN TRES ESTADIOS DE DESARROLLO DEL  
CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* WFU”.**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M en C. JOSÉ MARTIN PATRICIO GÓMEZ**

Para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE  
FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR

DIRECTOR DE TESIS:

**Dra. Marta C. Romano Pardo**

Comité tutorial:

**Dr. Arturo Ponce Balderas**

**Dr. Adolfo Sierra Santoyo**

**Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido**

**Dr. Raúl José Bobes Ruíz**

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio 43 bajo la tutoría de la Dra. Marta C. Romano Pardo, con el apoyo económico del CONACYT (331375/38994).

Así, a medida que la ciencia avanza, Dios parece tener cada vez menos que hacer. Es un gran universo, desde luego, por lo que Él, Ella o Ello, podría estar ocupado provechosamente en muchos sitios. Pero lo que evidentemente ha ocurrido es que ante nuestros propios ojos ha ido apareciendo un Dios de los vacíos; es decir, lo que no somos capaces de explicar, se lo atribuimos a Dios. Después, pasado un tiempo, lo explicamos, y entonces deja de pertenecer al reino de Dios. Los teólogos lo dejan de lado y pasa a la lista de competencias de la ciencia.

Carl Sagan: "La diversidad de la ciencia" [2007].

## DEDICATORIA

A mis padres, como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y formación profesional. Porque sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todo lo que hacen por mí, ni aún con la riqueza más grande del mundo. Por lo que soy y por todo el tiempo que les robé pensando en mí.

A mi hermana, por el apoyo que me ha brindado, por aquellos consejos de hermanos que hacen que cada día sea mejor amigo, hijo y hermano.

A mi sobrino, quien hace de mi vida una alegría más para ser mejor.

A la vida.

Solo me queda decir, Gracias.

*Dedicado con Amor y gratitud a mis hermanos Alex<sup>t</sup> y Chava<sup>t</sup>, los llevo en mi corazón.*

*Los amo eternamente, los quiero y los extraño.*

## AGRADECIMIENTOS

Comenzar a escribir estas líneas implica el final de una etapa importante de mi vida, en la que he aprendido muchas cosas pero que también me ha permitido darme cuenta de todo lo que aún me queda por aprender. Espero que este punto y aparte sea la señal de salida para un nuevo recorrido, que me aporte al menos lo mismo que éste que culmina. En estos años han sido muchísimas las personas que me han acompañado y ayudado, muchísimas personas a las que les estaré siempre enormemente agradecido por haber estado ahí de un modo u otro.

Me gustaría comenzar dando las gracias a la Directora de esta Tesis Doctoral:

A la **Dra. Marta C. Romano Pardo** por permitirme aprender de ella y con ella durante todos estos años, por confiar en mí y transmitirme todo su entusiasmo, energía y conocimiento. Gracias, espero que esto sólo sea el comienzo de todo lo que nos queda por hacer.

A los miembros del comité tutorial:

A la **Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido** por su paciencia en mi formación como estudiante y ahora como investigador, por sus precisas y acertadas correcciones.

Al **Dr. Arturo Ponce Balderas** por sus comentarios y acertadas correcciones para la mejora de esta tesis.

Al **Dr. Raúl José Bobes Ruíz** por sus valiosas sugerencias y tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

Al **Dr. Adolfo Sierra Santoyo** por el apoyo para la mejora de esta tesis.

A los técnicos y auxiliares:

Al **Biol. Ricardo Arturo Valdés Pérez** por su apoyo técnico y su colaboración en la realización de esta tesis. Gracias por tu amistad.

A la **Q.F.B. María De Lourdes López González** por su apoyo técnico y su colaboración en la realización de esta tesis. Gracias.

Al **Gabriel Vargas Corona** por estar siempre dispuesto a colaborar. Gracias

A **Marisol G. Bautista Torres** por estar siempre dispuesto a colaborar. Gracias.

A la **Secretaría y amiga Luz María Buendía**, por el apoyo y por estar siempre dispuesta a colaborar. Gracias.

Merece una mención especial el **Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar** del Laboratorio 125, Conjunto E del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, por su fundamental participación en el desarrollo del método analítico de UPLC-MS<sup>2</sup> de esta Tesis, y en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos. Gracias.

Todo este trabajo, así como mi formación, no habrían sido posibles sin la colaboración del **Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**. Gracias.

También han sido fundamentales en todo este proceso todos y cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Fisiología comparada del laboratorio 43, los de siempre, Brenda, Arlet, Manuel y Martín, los que ya se fueron y los que acaban de empezar. Gracias a todos, por hacer muy ameno todos estos años de trabajo. Gracias.

**A todos los participantes** en este estudio, porque sin su ilusión, sus ganas, su colaboración e implicación no habría sido posible. Gracias por conseguir que cada uno de los muchos momentos que hemos pasado durante muchos años, hayan estado cargados de sonrisas, felicidad y crecimiento personal.

**A todos mis amigos** por haber estado ahí en los malos y en los buenos momentos, por hacer que esta etapa de estudio y formación se quede marcada por infinidad de buenos recuerdos. Gracias a todos por acompañarme siempre.

Por último, aunque siempre para mí estarán en mi primer lugar, **a mi familia. A mis padres** por enseñarme el valor del esfuerzo y sacrificio, por ser mis guías y por levantarme todas las veces que he tropezado en este camino. **Gracias mamá, gracias papá.** A mi hermana **María de la Cruz**, por permitirme aprender de ella, por estar siempre ahí y por ser un ejemplo para mí. Y concluyo dando las gracias a mi sobrino **Abdallah**, por conseguir que intente ser mejor persona cada día. Gracias.

<b>I. ÍNDICE</b>	<b>pag.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Taenia crassiceps</i> WFU .....	<b>2</b>
1.1.1 Ciclo de vida .....	<b>2</b>
1.2 Interacción huésped-parásito .....	<b>3</b>
1.3 Biosíntesis de esteroides sexuales .....	<b>4</b>
1.3.1 Producción de esteroides sexuales por cisticercos y tenias de <i>T. solium</i> y <i>T. crassiceps</i> .....	<b>8</b>
1.4 Biosíntesis de hormonas corticosteroides .....	<b>9</b>
1.4.1 Metabolismo de los corticosteroides .....	<b>9</b>
1.4.2 Producción de corticosteroides por los parásitos .....	<b>13</b>
1.5 Tratamientos experimentales <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> para controlar la parasitosis y sus efectos secundarios .....	<b>14</b>
1.6 Los neuroesteroides .....	<b>15</b>
1.6.1 Biosíntesis de neuroesteroides en vertebrados .....	<b>16</b>
1.6.2 Metabolismo de los neuroesteroides .....	<b>18</b>
1.6.3 Mecanismo de acción de los neuroesteroides .....	<b>19</b>
1.6.3.1 Receptor GABA <sub>A</sub> .....	<b>20</b>
1.6.3.2 Receptor NMDA .....	<b>21</b>
1.7 Justificación .....	<b>23</b>
1.8 Hipótesis .....	<b>23</b>
1.9 Objetivo general .....	<b>23</b>
1.9.1 Objetivos específicos .....	<b>23</b>
 <b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
2.1 Estrategia experimental .....	<b>25</b>
2.2 Origen de los reactivos .....	<b>25</b>
2.3 Método de infección para el desarrollo de los cisticercos .....	<b>26</b>
2.3.1 Extracción de los cisticercos .....	<b>26</b>
2.4 Cultivo de cisticercos con hormonas tritadas y fría .....	<b>27</b>
2.5 Método de infección para el desarrollo de las tenias y extracción .....	<b>27</b>



2.6	Cultivo de las tenias con hormona tritiada y fría .....	28
2.7	Extracción de las hormonas .....	28
2.7.1	Procedimiento .....	28
2.8	Identificación de las hormonas por Cromatografía de capa fina (TLC).....	29
2.8.1	Principio.....	29
2.9	Análisis de estrógenos y sus metabolitos por cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC-MS <sup>2</sup> ).....	30
2.9.1	Condiciones cromatográficas.....	30
2.10	Análisis estadísticos.....	31
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
3.1	Metabolismo de corticosteroides en cisticercos invaginados y evaginados de <i>Taenia crassiceps</i> WFU.....	32
3.2	Metabolismo de esteroides sexuales en cisticercos invaginados y evaginados de <i>Taenia crassiceps</i> WFU .....	35
3.3	Síntesis de esteroides sexuales por el gusano de <i>Taenia crassiceps</i> WFU.....	37
3.4	Síntesis de corticosteroides por gusanos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU.....	38
3.5	Evaluación de hormonas corticosteroides y hormonas sexuales por cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC-MS <sup>2</sup> ).....	40
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>VI.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>50</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>61</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>70</b>

## II. ÍNDICE DE TABLAS

pag.

<b>Tabla 1.</b> Resumen de los efectos moduladores de los neuroesteroides en los diferentes tipos de receptores.....	22
<b>Tabla 2.</b> Programa de solventes para el análisis de los corticosteroides, andrógenos, estrógenos y sus metabolitos.....	30
<b>Tabla 3.</b> Síntesis de [ <sup>3</sup> H]-DOC tiempo-dependiente a partir del precursor [ <sup>3</sup> H]-P <sub>4</sub> .....	34
<b>Tabla 4.</b> Evolución temporal de la síntesis de esteroides por dos etapas de desarrollo del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> WFU. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Tiempos de retención e ion molecular de los corticosteroides y hormonas sexuales. ....	46
<b>Tabla 6.</b> Comparación del perfil metabólico en cisticercos invaginados y evaginados sin estimulación con P <sub>4</sub> vs cisticercos estimulados con P <sub>4</sub> durante 43 horas, y el parásito adulto de <i>Taenia crassiceps</i> WFU al mismo tiempo.....	48
<b>Tabla 7.</b> Metabolitos nuevos secretados de forma <i>per se</i> por los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU. Ambos estadios larvarios del cisticerco secretan hormonas de forma basal, de las cuales algunas no han sido reportadas hasta estos momentos. ....	49

<b>III. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico del cestodo de <i>Taenia crassiceps</i> WFU. ....	2
<b>Figura 2.</b> Desarrollo del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> WFU. ....	3
<b>Figura 3.</b> Susceptibilidad en el periodo de infección entre machos y hembras. ....	4
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de ingreso del colesterol hacia el interior de la mitocondria. ....	5
<b>Figura 5.</b> Síntesis de esteroides sexuales en el humano. ....	7
<b>Figura 6.</b> Síntesis de corticosteroides en el humano. ....	12
<b>Figura 7.</b> Biosíntesis de los neuroesteroides moduladores del receptor GABA. ....	19
<b>Figura 8.</b> Estrategia experimental para el desarrollo del presente proyecto. ....	25
<b>Figura 9.</b> Diagrama del gradiente de solventes usados para el análisis de los corticosteroides, andrógenos, estrógenos y sus metabolitos. ....	31
<b>Figura 10.</b> Metabolismo de corticosteroides por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU a las 12 horas. ....	32
<b>Figura 11.</b> Metabolismo de corticosteroides por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU a las 24 horas. ....	33
<b>Figura 12.</b> Metabolismo de corticosteroides por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU a las 43 horas. ....	34
<b>Figura 13.</b> Metabolismo de esteroides sexuales en cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU a las 6 horas. ....	35
<b>Figura 14.</b> Metabolismo de esteroides sexuales por la ruta $\Delta 5$ -esteroidogénica. ....	37
<b>Figura 15.</b> Síntesis de esteroides sexuales a partir de [ $^3\text{H}$ ]-A <sub>4</sub> por gusanos de <i>T. crassiceps</i> WFU. ....	38
<b>Figura 16.</b> Síntesis de esteroides sexuales por gusanos de <i>T. crassiceps</i> WFU. ....	38
<b>Figura 17.</b> Curso temporal del metabolismo de [ $^3\text{H}$ ]-P <sub>4</sub> por gusanos de <i>T. crassiceps</i> WFU. ....	39
<b>Figura 18.</b> Patrones de fragmentación de los estandares de corticosteroides y hormonas sexuales. ....	42
<b>Figura 18.1.</b> Continuación de los patrones de fragmentación de los estandares de corticosteroides y hormonas sexuales. ....	43

<b>Figura 19.</b> Cromatogramas individuales de los estándares analizados por UPLC-MS <sup>2</sup> .....	<b>44</b>
<b>Figura 19.1</b> Continuidad de los cromatogramas individuales de los estándares analizados por UPLC-MS <sup>2</sup> .....	<b>45</b>
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas de extractos de medios de cultivo con o sin cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU y del parásito adulto. ....	<b>47</b>
<b>Figura 21.</b> Resumen de las vías esteroidogénicas de <i>T. crassiceps</i> WFU propuesto. ....	<b>56</b>
<b>Figura 22.</b> Puertas traseras de la DHT y Progesterona en el cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> WFU.....	<b>58</b>

#### **IV. ABREVIATURAS**

**Δ4 y Δ5:** Delta 4 y Delta 5.

**17-OHP<sub>4</sub>:** 17-hidroxiprogesterona.

**17β-HSD:** 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa.

**[<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub>:** Androstenediona tritiada.

**[<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub>:** Progesterona tritiada.

**3α-HSD:** 3 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa.

**3β-HSD:** 3 beta-hidroxisteroide deshidrogenasa.

**5-HT<sub>3</sub>:** Serotonina.

**A<sub>4</sub>:** Androstenediona.

**ACTH:** Adrenocorticotrofina hipofisaria.

**ADIOL:** Androstenediol.

**ALDO:** Aldosterona.

**ALLO-DOC:** Allotetradexicorticosterona.

**AlloP:** Allopregnanolona.

**AMPA:** Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.

**AN:** Androsterona.

**ASN:** Androstanediona.

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina.

**CLS:** Cortisol.

**CNA:** Corticosterona.

**CS:** Corticosteroides.

**CYP450:** Citocromo P450.

**DCLS:** Deoxicortisol.

**DHA:** Dihidroandrosterona.

**DHC:** Dihidrocorticosterona.

**DH-DOC:** Dihidrodeoxicorticosterona.

**DHEA:** Dihidroepiandrosterona.

**DHEAS:** Dihidroepiandrosterona sulfatada.

**DHP:** Dihidroprogesterona.

**DHT:** Dihidrotestosterona.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**DOC:** 11- desoxicorticosterona.

**E<sub>1</sub>:** Estrona.

**E<sub>2</sub>:** Estradiol.

**E<sub>3</sub>:** Estriol.

**GABA<sub>A</sub>:** Ácido gamma-aminobutírico.

**GC:** Glucocorticoides.

**GR:** Receptor de glucocorticoides.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Ácido sulfúrico.

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad.

**HIDROPROG:** Hidroxiprogesterona.

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad.

**MBR:** Mitochondrial-type benzodiazepine receptor.

**MC:** Mineralocorticoides.

**MeOH:** Metanol.

**MR:** Receptor de mineralocorticoides.

**nAChR:** Receptor nicotínico.

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

**NCC:** Neurocisticercosis.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato.

**OHT:** Hidroxitestosterona.

**P<sub>4</sub>:** Progesterona.

**P<sub>5</sub>:** Pregnenolona.

**PREG:** Pregnanolona.

**PregS:** pregnenolona sulfatada.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**StAR:** Steroidogenesis Acute Regulator.

**T:** Testosterona.

**TLC:** Cromatografía de capa fina.

**UPLC-MS<sup>2</sup>:** cromatografía líquida de ultra resolución acoplado a masas.

## Resumen

Las *tenias sp* son helmintos hermafroditas que gradualmente desarrollan testículos y ovarios en sus unidades reproductivas. La etapa larval de las tenias son llamadas cisticercos, que son una vesícula que contiene el escólex invaginado y prolifera asexualmente en la cavidad abdominal de los ratones. Una vez en el huésped, se evaginan, se adhieren al intestino y se convierten en un organismo adulto, la tenia. Anteriormente hemos descrito que los cisticercos de *Taenia crassiceps* ORF y *Taenia solium* transforman los precursores de esteroides en andrógenos y estrógenos. Mientras que los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU pueden sintetizar corticosteroides. El objetivo del presente trabajo es investigar la relación entre la capacidad de síntesis de esteroides en el cisticerco y gusano adulto de *Taenia crassiceps* WFU. Con este fin, se obtuvieron cisticercos de la cavidad abdominal de ratones hembra, se separaron manualmente en parásitos invaginados (IC) y evaginados (CE) y se preincubaron durante 24 h en medio DMEM más antibiótico/antimicótico. El siguiente paso consistió en incubar a los cisticercos a diferentes tiempos con androstenediona tritiada [ $^3\text{H}$ ]-A<sub>4</sub>, progesterona [ $^3\text{H}$ ]-P<sub>4</sub> o P<sub>4</sub> fría según el experimento. Los gusanos adultos de *Taenia crassiceps* WFU se obtuvieron del intestino de los hámsters dorados que habían sido infectados por vía oral con cisticercos. Los gusanos se cultivaron previamente en DMEM más FBS y antibióticos, y luego se incubaron sin FBS durante diferentes tiempos, en presencia de [ $^3\text{H}$ ]-A<sub>4</sub>, [ $^3\text{H}$ ]-P<sub>4</sub> o P<sub>4</sub> fría. Al final de los experimentos, los medios fueron recuperados tanto de los cisticercos como de las tenias para ser analizados por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC/MS<sup>2</sup>). Los resultados obtenidos por TLC mostraron que la síntesis de testosterona fue significativamente mayor en los cisticercos evaginados y aumentó con el tiempo. Los cisticercos invaginados y evaginados también sintetizaron pequeñas cantidades de 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) y estrona. Los cisticercos evaginados sintetizaron dos veces más [ $^3\text{H}$ ]-DOC que los parásitos invaginados y la producción aumentó significativamente con el tiempo de incubación. Los gusanos adultos de *Taenia crassiceps* WFU sintetizaron cantidades significativas de [ $^3\text{H}$ ]-testosterona y pequeñas cantidades de estrona después de solo 3 h de cultivo en presencia de [ $^3\text{H}$ ]-A<sub>4</sub>. Las tenias también transformaron [ $^3\text{H}$ ]-P<sub>4</sub> a [ $^3\text{H}$ ]-DOC y aumentó su síntesis después de 24 h de cultivo. Por otro lado, cuando fue analizado el perfil esteroideo por UPLC/MS<sup>2</sup> se identificó la producción *per se* en los cisticercos invaginados y evaginados, demostrándose por primera vez la producción basal de esteroides. Los cisticercos invaginados secretan 17 hormonas de las cuales 10 no han sido descritas hasta este momento, las

hormonas identificadas son la progesterona (P<sub>4</sub>), la pregnanolona (PREG), la dihidroprogesterona (DHP), la allopregnanolona (AlloP), la dihidrodeoxicorticosterona (DH-DOC), Allotetrahydrodesoxicorticosterona (ALLO-DOC), Androstanediona (ASN), Androsterona (AN), Dihidrottestosterona (DHT) y Hidroxitestosterona (OHT). Por primera vez se identifica la síntesis de andrógenos más potentes que la testosterona como la DHT, y de neuroesteroides como AlloP, ALLO-DOC y PREG. En el cisticerco evaginado, de forma *per se*, o basal, se identificaron 23 hormonas, 6 más de las que secreta el cisticerco invaginado en esta modalidad basal. Por ejemplo se identificó la testosterona, hormona que no secretó basalmente en el cisticerco invaginado; también se identificaron las hormonas dihidrocorticosterona (DHC), corticosterona (CNA), deoxicortisol (DCLS), E<sub>2</sub>, Dihydroandrosterona (DHA), sin embargo el cisticerco evaginado no secretó AlloP. Cuando se potenció el metabolismo de los cisticercos y la tenia con P<sub>4</sub> fría, se encontraron 24 hormonas y a diferencia de la producción *per se*, los cisticercos y el gusano adulto secretan cortisol. En resumen, nuestros datos muestran las vías que utilizan los cisticercos y la tenia de *T. crassiceps* WFU para sintetizar esteroides sexuales, corticosteroides y neuroesteroides en ambas etapas de desarrollo, estas últimas no descritas en el metabolismo clásico.



## Abstract

Taeniids tapeworms are hermaphroditic helminths that gradually develop testis and ovaries in their reproductive units. The larval stage of the tapeworms named cysticercus is a vesicle that contains the scolex and proliferates asexually in the abdominal cavity of mice. Once in the host, they evaginate, attach to the gut and develop into an adult organism, the tapeworm. We have previously reported reported that *T. crassiceps* ORF and solium cysticerci transform steroid precursors to androgens and estrogens. *Taenia crassiceps* WFU cysticerci can also synthesize corticosteroids. The aim of the present work is to investigate the relationship between steroid synthesis ability and the developmental stage of the parasite *T. crassiceps* WFU. To this purpose, cysticerci were obtained from the abdominal cavity of female mice, manually separated in invaginated (IC) and evaginated parasites (EC) and preincubated for 24 h in DMEM plus antibiotics/antimycotics. Next step consisted in incubation for different periods in the fresh media added with tritiated androstenedione [ $^3\text{H}$ ]-A<sub>4</sub> or progesterone [ $^3\text{H}$ ]-P<sub>4</sub> and incubated for different periods. *Taenia crassiceps* WFU tapeworms were recovered from the intestine of golden hamsters that had been orally infected with cysticerci. The worms were pre-cultured in DMEM plus FBS and antibiotics, and then incubated without FBS for different time periods, in the presence of [ $^3\text{H}$ ]-A<sub>4</sub> or [ $^3\text{H}$ ]-P<sub>4</sub>. At the end of the experiments the media from cysticerci and tapeworms were analyzed by thin layer chromatography. Results showed that testosterone synthesis was significantly higher in the evaginated cysticerci and increased with time in culture. The invaginated and evaginated cysticerci also synthesized small quantities of 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and estrone. The evaginated cysticerci synthesized twice more  $^3\text{H}$ -deoxycorticosterone [ $^3\text{H}$ ]-DOC than the invaginated parasites, the production increased significantly with time in culture. *Taenia crassiceps* WFU tapeworms synthesized significant quantities of [ $^3\text{H}$ ]-testosterone and small amounts of estrone after only 3 h of culture in the presence of [ $^3\text{H}$ ]-A<sub>4</sub>. The tapeworms also transformed [ $^3\text{H}$ ]-P<sub>4</sub> to [ $^3\text{H}$ ]-DOC and increased its synthesis after 24 h in culture. When the steroidal profile was analyzed by UPLC/MS<sup>2</sup>, we identified the production *per se* in the invaginated and evaginated cysticerci. We demonstrate here for the first time the basal production of several steroids, the invaginated cysticerci secrete 17 hormones, 10 of them have not been described until now. The hormones identified in this study were progesterone (P<sub>4</sub>), pregnanolone (PREG), dihydroprogesterone (DHP), allopregnanolone (AlloP), dihydrodeoxycorticosterone (DH-DOC), Allotetrahydrodeoxycholesterone (ALLO-DOC), Androstenedione (ASN),

Androsterone (AN), Dihydrotestosterone (DHT) and Hydroxytestosterone (OHT). To note we have identified for the first time the synthesis of androgens more potent than testosterone such as DHT, and neurosteroids such as AlloP, ALLO-DOC and PREG by the parasites. In the evaginated cysticerci we have shown the production *per se* of 23 hormones, six more than those secreted in basal conditions by the invaginated cysticerci, between those testosterone, a hormone not secreted by the invaginated cysticerci, The hormones dihydrocorticosterone (DHC), corticosterone (CNA), deoxycortisol (DCLS), E<sub>2</sub>, Dihydroandrosterone (DHA) were also identified in the evaginated cysticerci. The invaginated and evaginated cysticerci and the tapeworms incubated with P<sub>4</sub> transformed the precursor to cortisol after 48 h in culture. In summary, our data show the pathways that *T. crassiceps* WFU cysticerci use to synthesize sexual steroids in both larval developmental stages, and reveals the steroidogenic capacity of the tapeworms, as well as the production of neurosteroids, hormones that were not identified until now in parasites.

## 1 INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una enfermedad causada por la fase larvaria de cestodos de la familia *Taenidae* que afecta a una variedad de especies de mamíferos incluidos los seres humanos. La cisticercosis provocada por *Taenia solium*, es un problema grave de salud pública en México, América Central y del Sur, India y África subsahariana, y es endémica en muchos países subdesarrollados. Es también la razón principal por la que la epilepsia es dos veces más común en los países en desarrollo, en comparación con los países desarrollados (Sciutto *et al.*, 2000; White y *et al.*, 1997). La forma más sintomática y grave de la enfermedad ocurre cuando los parásitos se localizan en el sistema nervioso central, causando la neurocisticercosis (NCC). Una de las características de la NCC es su gran heterogeneidad a nivel clínico, radiológico e inflamatorio (Del Brutto y cols., 1988; Fleury y cols., 2004). Más del 50% de los casos son asintomáticos, pero en el 50% restante puede aparecer una gama de sintomatología como epilepsia leve o severa, hipertensión intracraneana, déficit motor o sensitivo, síndromes extra-piramidales y hasta trastornos psiquiátricos. Participan en esta heterogeneidad el número de parásitos que alcanzan el sistema nervioso central, la localización de los mismos, el estadio del parásito (Vesicular, coloidal o calcificado) y la intensidad de la reacción inflamatoria desarrollada. Las causas que determinan esta heterogeneidad no están totalmente dilucidadas por el momento, pero se sospecha que participan factores propios del parásito y del hospedero, así como la intensidad de la exposición al parásito. Hemos demostrado con nuestros colaboradores que la presencia de cisticercos de *T. solium* en el cerebro provoca alteraciones en los esteroides sexuales y hormonas hipofisarias del paciente que varían dependiendo del tipo de desarrollo de la neurocisticercosis (Cardenas *et al.*, 2012).

Ante la dificultad de experimentar para conocer y definir diversos factores biológicos en la relación hospedero-parásito a la cisticercosis humana, se adoptó, y ha resultado de gran utilidad un modelo de cisticercosis experimental murina. Dos especies son usadas: *Taenia crassiceps* ORF, cuyos cisticercos no poseen scolex y la causada por *Taenia crassiceps* WFU que tiene scolex y por lo tanto se asemeja mucho al de *Taenia solium* que posee también scolex.

## 1.1. *Taenia crassiceps* WFU

### 1.1.1 Ciclo de vida

*Taenia crassiceps* WFU es un parásito de caninos que en su forma de adulto o cestodo común se encuentra en el intestino del zorro rojo Europeo y norteamericano (Delvalle, 1989; Dorais y Esch, 1969; Freeman, 1962). La etapa larvaria o el cisticerco (también conocido como *Cysticercus longicollis*) se desarrolla en pequeños roedores que adquieren la infección por ingestión de los huevos provenientes de las heces de los zorros. En los roedores, en la infección natural, los huevos se desarrollan a cisticercos que pueden multiplicarse asexualmente (Toledo y *et al.*, 1997) los cuales se alojan en diversos tejidos y en la cavidad del cuerpo del roedor (Figura 1) (Toenjes y *et al.*, 1999). 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 (Terrazas *et al.*, 1994b). Experimentalmente puede inducirse la infección con la inyección intraperitoneal de los cisticercos. La reproducción del parásito por gemación produce una gran cantidad de parásitos (Huerta *et al.*, 1992; Sapolsky *et al.*, 2000). Además, permite cultivarlo, lo que facilita los estudios *in vitro* (Huerta *et al.*, 1992; Zubarian and Willms, 2008). Dado que el cisticerco de *T. crassiceps* WFU tiene scolex, es capaz de desarrollar un gusano adulto o tenia cuando se infectan hamsters con cisticercos por vía oral (Figura 2).

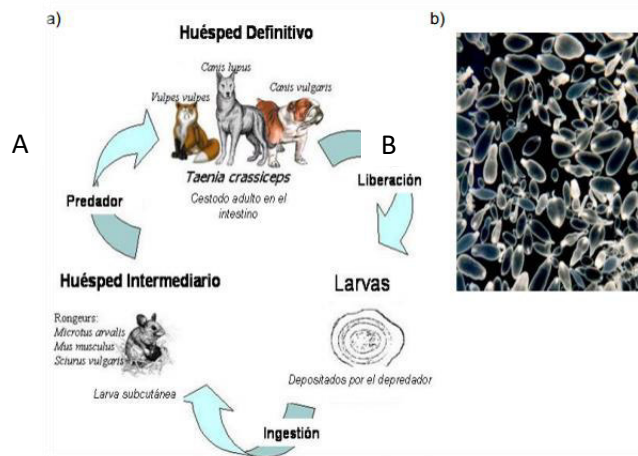


Figura 1. Ciclo biológico del cestodo de *Taenia crassiceps* WFU. A) Presenta dos huéspedes, el hospedero intermediario es un conjunto extenso de roedores y el huésped definitivo son los cánidos y felinos. B) larvas recolectadas de ratón infectado con *T. crassiceps* WFU de la cavidad peritoneal.



Figura 2. Desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU. A y B). Cisticercos invaginados y evaginados respectivamente, reproducidos en la cavidad peritoneal y extraídos de ratones BALB/c infectados previamente. C). Tenia de *Taenia crassiceps* WFU desarrollado en el intestino de hámster infectados oralmente.

## 1.2. Interacción huésped-parásito

En el curso de la infección por el cisticerco, las interacciones huésped-parásito afectan profundamente la respuesta inmune del huésped (White *et al.*, 1997). Se ha demostrado que el sexo del huésped influye en el desarrollo de las parasitosis (Terrazas *et al.*, 1994a; Huerta *et al.*, 1992; Bojalil *et al.*, 1993). Asimismo con nuestros colaboradores hemos demostrado que la infección de ratones con cisticercos de *T. crassiceps* ORF tiene efectos sobre el medio ambiente hormonal (Morales-Montor *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 1996; Larralde *et al.*, 1995).

Se ha descrito una notable susceptibilidad asociada al sexo del hospedero. Se ha descrito que en ratones hembras de diferentes cepas son más susceptibles a la infección aguda que en los machos por el cisticerco de *T. crassiceps* ORF (Sciutto *et al.*, 1991; Huerta *et al.*, 1992). Sin embargo, después de 4 semanas de la infección, la carga parasitaria aumenta masivamente en ambos géneros de roedores para llegar a cientos de metacéstodos por hospedero. Esta reducción de la resistencia inicial del huésped a la infección masculina está asociada con un proceso de “feminización”, asociada a un aumento del estradiol (E<sub>2</sub>) 200 veces con respecto a los valores normales, mientras que los de la testosterona (T) se reducen a 10% con respecto a los ratones control (Figura 3) (Morales-Montor *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 1996; Larralde *et al.*, 1995).

Al mismo tiempo, los ratones macho infectados disminuyen progresivamente su comportamiento sexual normal, la pérdida de la primera respuesta de la eyaculación, más tarde la respuesta a intromisión y finalmente, a las 16 semanas de infección, la respuesta de monta se encuentra completamente abolida (Morales *et al.*, 1996).

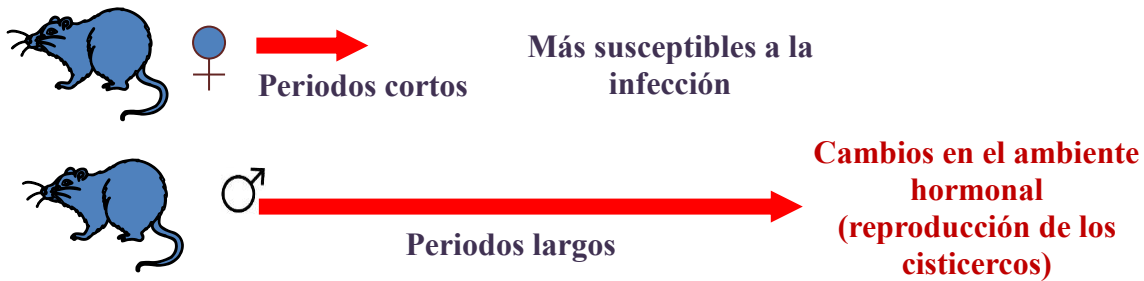


Figura 3. Susceptibilidad en el periodo de infección entre machos y hembras. Las hembras por el ambiente estrogénico requieren periodos cortos para aumentar la carga parasitaria, mientras que los machos requieren de mayor tiempo. Esto se debe por el cambio hormonal del huésped provocada por un aumento progresivo lento de la carga parasitaria.

### 1.3. Biosíntesis de esteroides sexuales

Las hormonas esteroideas tienen una estructura derivada de la molécula ciclopentanofenantreno, aquellas de 18 carbonos (C18) son estranos, las de 19 carbonos (19) androstanos y las de 21 carbonos (C21) pregnanos. Para la biosíntesis de esteroides el colesterol puede provenir de tres fuentes: el colesterol circulante en la sangre en forma de lipoproteína, el que se sintetiza *de novo* dentro del ovario y del testículo a partir de acetilcoenzima A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Niswender, 2002). La fuente principal de colesterol utilizado para la síntesis de hormonas esteroideas deriva de la captación del colesterol presente en las lipoproteínas de baja (LDL) y de alta densidad (HDL). En las células del ovario y del testículo existen receptores para las LDL y HDL, las cuales luego de unirse al receptor liberan el colesterol hacia el interior de la célula, dentro de ella el colesterol debe llegar hasta al interior de la mitocondria, este paso constituye el paso limitante para que se inicie la síntesis de hormonas esteroideas. En este proceso de internalización interviene la proteína StAR (por sus siglas en inglés, Steroidogenesis Acute Regulator) (Soccio y Breslow, 2003). El acarreador StAR transfiere el colesterol al receptor mitocondrial a benzodiazepinas (MBR, mitochondrial-type benzodiazepine receptor) ubicado en la membrana mitocondrial (Figura 4) (Papadopoulos y Brown, 1995). Éste forma un canal que dirige el colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentra la enzima esteroideogénica, la colesterol desmolasa o citocromo P450 (CYP) 11A1 rompe la cadena lateral del colesterol y lo transforma en pregnenolona (P<sub>5</sub>). La enzima CYP17 (17 $\alpha$ -hidroxilasa/C<sub>17-20</sub> liasa) actúa de dos maneras, como 17-beta-hidroxilasa; convirtiendo P<sub>5</sub> a 17alfa-hidroxipregnenolona y P<sub>4</sub> a 17alfa-progesterona, y como 17,20-liasa

convirtiendo 17-alfa-hidroxipregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHEA) que es sustrato de la 3 $\beta$ -HSD y se transforma en androstendiona (A<sub>4</sub>). A su vez, la 17alfa-hidroxiprogesterona se transforma en A<sub>4</sub>. La androstenediona puede transformarse a diferentes esteroides: por la acción de la 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) puede convertirse en T o por la acción de la P450-Aromatasa (CYP19A1) puede convertirse a estrona (E<sub>1</sub>). Es importante destacar que la 17 $\beta$ -HSD convierte E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub> en una acción de naturaleza reversible. La T puede reducirse a un andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (DHT) por acción de la 5 $\alpha$ - reductasa (Labrie *et al.*, 2000) (Figura 5).

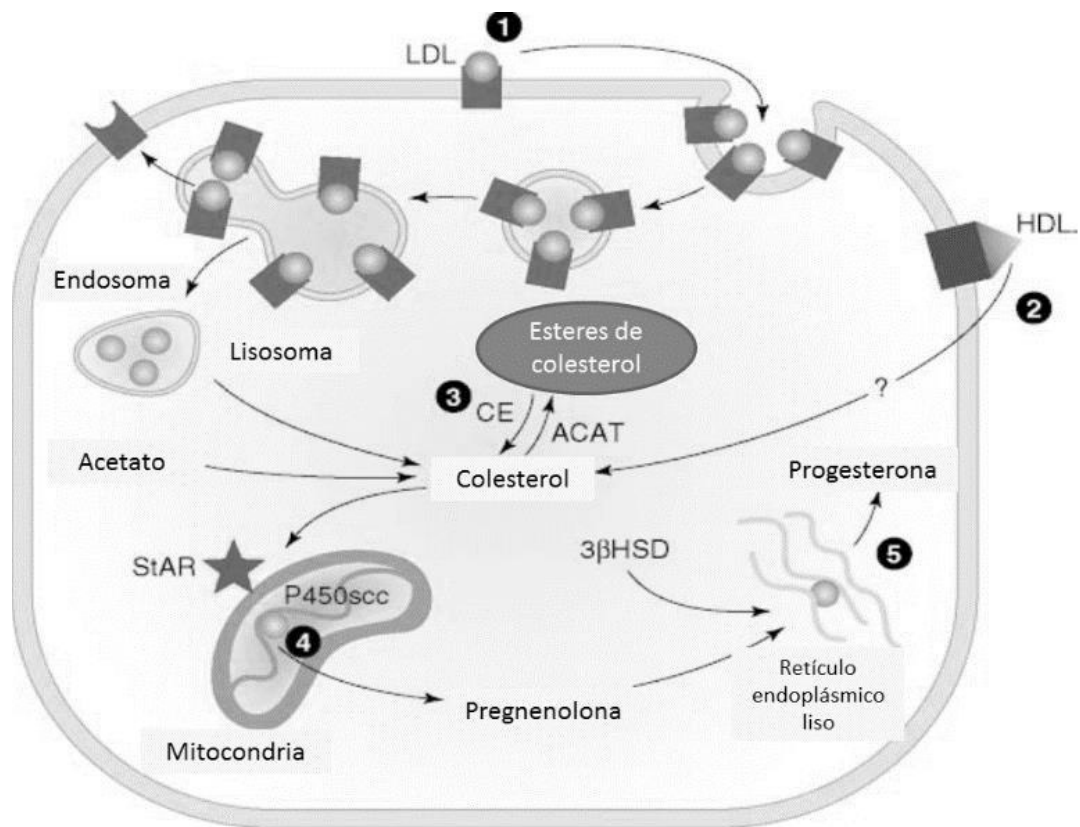


Figura 4. Mecanismo de ingreso del colesterol hacia el interior de la mitocondria. 1) La lipoproteína de baja densidad se une a su receptor, 2) la lipoproteína de alta densidad se une a su receptor y viaja al endosoma, 3) síntesis del colesterol almacenado en las gotas lipídicas por la esterasa de colesterol (CE), 4) síntesis de pregnenolona en la mitocondria y 5) síntesis de progesterona en el retículo endoplásmico liso. (Modificado de Soccio y Breslow 2003).

Por otro lado, la enzima  $5\alpha$  reductasa puede convertir a la androstenediona a androstanadiona, este último sustrato de la 3 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa ( $3\alpha$ -HSD) para metabolizar a la androsterona y DHT a lo que se le conoce como la puerta trasera de la T, La DHT puede metabolizarse a 17-dihidroandrosterona por la misma enzima  $5\alpha$  reductasa. Los productos finales de la esteroidogénesis en cada tejido dependen de la existencia de las enzimas que los sintetizan, como por ejemplo los citocromos P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas presentes.



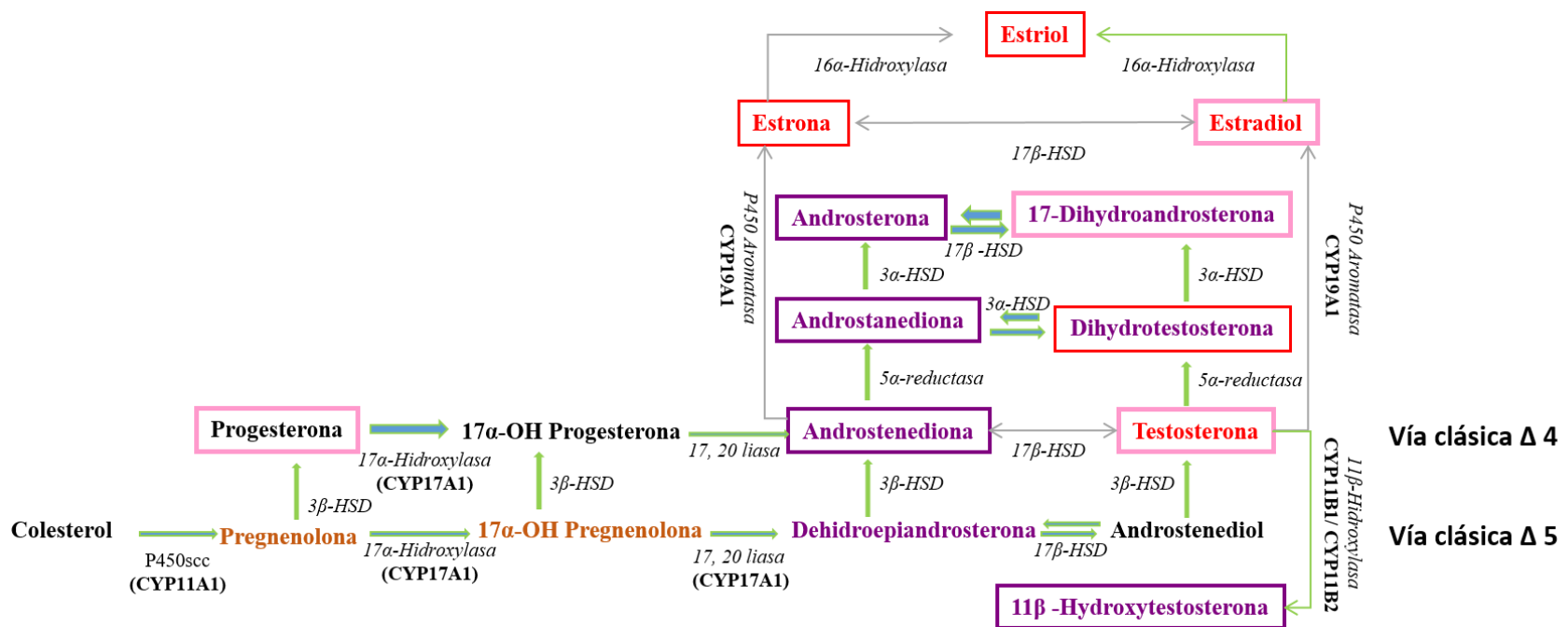


Figura 5. Síntesis de esteroides sexuales en el humano. El CYP11A1 es una enzima mitocondrial, mientras que los CYP17A1 y 19A1 o aromatasa se encuentran en el retículo endoplásmico liso (Modificado de Monostory y Dvorak, 2011).

### 1.3.1. Producción de esteroides sexuales por cisticercos y tenias de *T. solium* y *T. crassiceps*

El conjunto de datos mencionados arriba, hizo que nuestro laboratorio se interesara por conocer la endocrinología del parásito. La producción y el posible significado fisiológico de las hormonas sexuales producidas por los parásitos mismos ha recibido escasa atención (Romano *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2015). En nuestro laboratorio se ha investigado la capacidad de los cisticercos de *T. crassiceps* ORF para sintetizar esteroides sexuales *in vitro* (Gomez *et al.*, 2000). Se demostró que estos parásitos pueden transformar [<sup>3</sup>H]-androstenediona a [<sup>3</sup>H]-testosterona. Recientemente se reportó que también los cisticercos de *T. solium* sintetizan *in vitro* andrógenos y pequeñas cantidades de estradiol a partir de androstenediona (Valdéz *et al.*, 2006). Estos parásitos pueden también sintetizar andrógenos a partir de progesterona (P<sub>4</sub>) y de dehidroepiandrosterona (DHEA), lo que significa que poseen enzimas activas de las vías esteroidogénicas Δ<sub>4</sub> y Δ<sub>5</sub> como la 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) y 17β-HSD) (Jiménez *et al.*, 2006). La producción de testosterona por los cisticercos fue ratificada por recristalización del esteroide (Valdéz *et al.*, 2006). Cuando en nuestro laboratorio agregaron diferentes dosis de testosterona al cultivo del parásito, que son del orden fisiológico en el suero del huésped, este andrógeno estimuló la proliferación de los parásitos en forma dosis-dependiente (Romano *et al.*, 2003). En concordancia con nuestros estudios se ha demostrado que entre otros parásitos, los merozoitos de *P. falciparum* aumentan el número de gametocitos bajo la influencia de testosterona, estradiol y progesterona (Lingnau *et al.*, 1993). El efecto de otro andrógeno, la dehidroepiandrosterona también ha sido estudiado en amibas y cisticercos (Escobedo *et al.*, 2004; Carrero *et al.*, 2006). No se han encontrado estudios en cisticercos con scolex como es el caso de los de *Taenia crassiceps* WFU.

Asimismo en el laboratorio se ha demostrado la presencia de enzimas esteroidogénicas en cisticercos y taenias de *Taenia solium*, como es el caso de la 3β-HSD, enzima clave en la esteroidogénesis (Fernández Presas *et al.*, 2008). Recientemente se clonó y caracterizó la enzima 17β-HSD de cisticercos *T. solium*, que convierte androstenediona en testosterona, y se expresó en células HEK-291 (Aceves-Ramos *et al.*, 2014) transfectadas con la enzima clonada. Se demostró por cromatografía en capa fina (TLC) que esta enzima del cisticercos transforma androstenediona en testosterona, pero no estrona en estradiol por lo que se considera que es del tipo 3, de entre 14 isoformas descritas hasta el momento.

Por otra parte, existen datos en la literatura sobre los efectos de cortisol en *P. falciparum* y *Entamoeba histolytica* en los que se encontró que esta hormona estimula *in vitro* el crecimiento y la reproducción de los parásitos (Maswoswe *et al.*, 1985; Lingnau *et al.*, 1993; Carrero *et al.*, 2006), mientras que estudios en *Schistosoma mansoni* señalan lo contrario (Morales-Montor *et al.*, 2001). Un estudio de nuestro laboratorio mostró que los corticosteroides (CS) como la corticosterona y la dexametasona, un corticoide sintético usado para tratar enfermos con neurocisticercosis, estimulan la síntesis de estrógenos por los parásitos (Hinojosa *et al.*, 2012). En este sentido, trabajos de nuestro grupo y de otros, mostraron que los estrógenos estimulan la proliferación de los cisticercos *in vitro* (Romano *et al.*, 2008), por lo que se podría pensar que este podría ser uno de los mecanismo por la cual los CS podrían facilitar el desarrollo de los cisticercos.

#### **1.4. Biosíntesis de hormonas corticosteroides**

##### **1.4.1. Metabolismo de los corticosteroides**

En los mamíferos los corticosteroides son producidos por la corteza suprarrenal. La corteza suprarrenal está formada histológicamente por tres regiones que, de afuera hacia adentro son: a) La zona glomerular: constituida por cordones celulares plegados y replegados sobre sí mismos, aparentando glomérulos, b) La zona fasciculada: en la que los cordones celulares continúan en forma rectilínea separados unos de otros por los vasos sanguíneos, dispuestos en forma radiada, c) La zona reticular: donde los cordones celulares forman un retículo sobre cuyas mallas se disponen los capilares sanguíneos.

Los cordones celulares están formados por células epiteliales con características diferenciales en cada zona. El cortisol es segregado en la zona fasciculada, la aldosterona en la zona glomerular y los androcorticoides en la zona reticular.

A partir del colesterol la corteza suprarrenal sintetiza dos clases de corticosteroides:

I) Corticosteroides de 21 átomos de carbono: son las hormonas más importantes y las responsables de las funciones endócrinas de la corteza suprarrenal. Siendo los glucocorticoides (GC), principales el cortisol o hidrocortisona, y los mineralocorticoides como la aldosterona. II) Corticoides de 19 átomos de carbono son andro y estrocorticoides, principalmente la dihidroepiandrosterona, de débil acción androgénica. Posiblemente también se produzcan pequeñas cantidades de testosterona y estradiol, pero en proporción muy escasa.

Sin duda los esteroides de 21 átomos de carbono son los más importantes: el cortisol de acción predominante en el metabolismo hidrocarbonado, proteico y lipídico, y gran actividad antiinflamatoria; y la aldosterona cuya influencia se manifiesta en el metabolismo hidroelectrolítico. El colesterol es el precursor obligado en la síntesis de los corticosteroides. Aunque la corteza suprarrenal puede sintetizar el colesterol a partir del acetato, la mayor parte del mismo, aproximadamente el 80% es de procedencia exógena. Las reacciones enzimáticas ocurren con la participación de oxidasas de función mixta (hidroxilasas de esteroides) en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico de las células de la corteza, con la participación del citocromo P450, oxígeno molecular y el sistema NADPH, como dador de electrones.

La serie de reacciones enzimáticas que se llevan a cabo a partir del colesterol, pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Supresión de la cadena lateral del colesterol por oxidación y formación de pregnenolona por acción del citocromo CYP 17A1, que posteriormente por oxidación en el C21 producirá a la progesterona que originará al mineralocorticoide 11-Dexosicorticosterona (11-DOC) y que está por hidroxilación en C11 y C12 formará a la corticosterona. El agregado de un grupo aldehído en C18 originará la aldosterona, esta serie de reacciones se presenta por acción del CYP 21, 11B1 y 11B2 respectivamente.

2. La hidroxilación de la pregnenolona en C17, produce 17-alfa-hidroxipregnenolona, que después por una serie de reacciones formará los glucocorticoides 11-deoxicortisol y cortisol, por acción del CYP21 y 11B1 respectivamente (Figura 6) (Kagawa y Waterman, 1990; Monostory y Dvorak, 2011).

Este proceso metabólico está regulado por la adrenocorticotrofina hipofisaria (ACTH), que regula y mantiene la síntesis del cortisol, activando la enzima adenilatociclasa en las células epiteliales de la zona fasciculada y reticular principalmente. El AMPc, cuya producción aumenta por la acción de la adenilatociclasa que incrementa la esteroidogénesis por varios mecanismos, no todos ellos conocidos.

La activación de la adenilatociclasa se produce previa estimulación de un receptor específico de membrana para la ACTH. El AMPc formado estimula el primer paso en el proceso biosintético, que es el rompimiento oxidativo de la cadena lateral del colesterol, activando el CYP 11A1, y la formación de pregnenolona. Este constituye el proceso limitante de la esteroidogénesis, ya que produce la formación de pregnenolona, este sustrato queda disponible para la acción del

resto de las enzimas mitocondriales que intervienen en la esteroidogénesis (Kagawa y Waterman, 1990).

La corteza suprarrenal no tiene mecanismos para el almacenamiento o depósito de las hormonas. Por lo tanto, el aumento de la síntesis se acompaña de un aumento de la liberación. La producción y liberación de aldosterona puede estimularse en la zona glomerular directamente por bajas concentraciones de sodio, altas concentraciones de potasio y por la ACTH.

La angiotensina II y III son también importantes factores en la regulación de la síntesis aldosterona. Existen receptores específicos en las células corticosuprarrenales para la angiotensina II y III que al estimularse incrementan la síntesis de aldosterona.

Se estima que en condiciones fisiológicas el cortisol es liberado en una cantidad de 20 mg. por día, y la síntesis de aldosterona es de 0,12 mg diarios. Además, existe un ritmo diurno en la secreción de corticosteroides.

El cortisol, corticosterona y aldosterona son hormonas esenciales que se encuentran en la mayoría de los vertebrados. Su importancia en la respuesta al estrés, la inmunidad, el metabolismo, la reproducción, en la homeostasis de iones y la diferenciación está bien documentado (Charmandari *et al.*, 2005; Sapolsky *et al.*, 2000). Los corticosteroides actúan principalmente mediante la unión a receptores citosólicos, que después de unirse a su ligando se transportan al núcleo donde actúan como factores positivos y negativos de la transcripción al unirse a los elementos de respuesta a glucocorticoides o mineralocorticoides (MC) en el ADN. Su actividad conduce a la expresión o represión de diversas proteínas reguladoras que contrarrestan los efectos de los factores de estrés externos, manteniendo así la homeostasis (Sapolsky *et al.*, 2000).

Los receptores a glucocorticoides (GC) están ampliamente distribuidos en la mayoría de las células de vertebrados y se clasifican como receptores de GC tipo I y II.

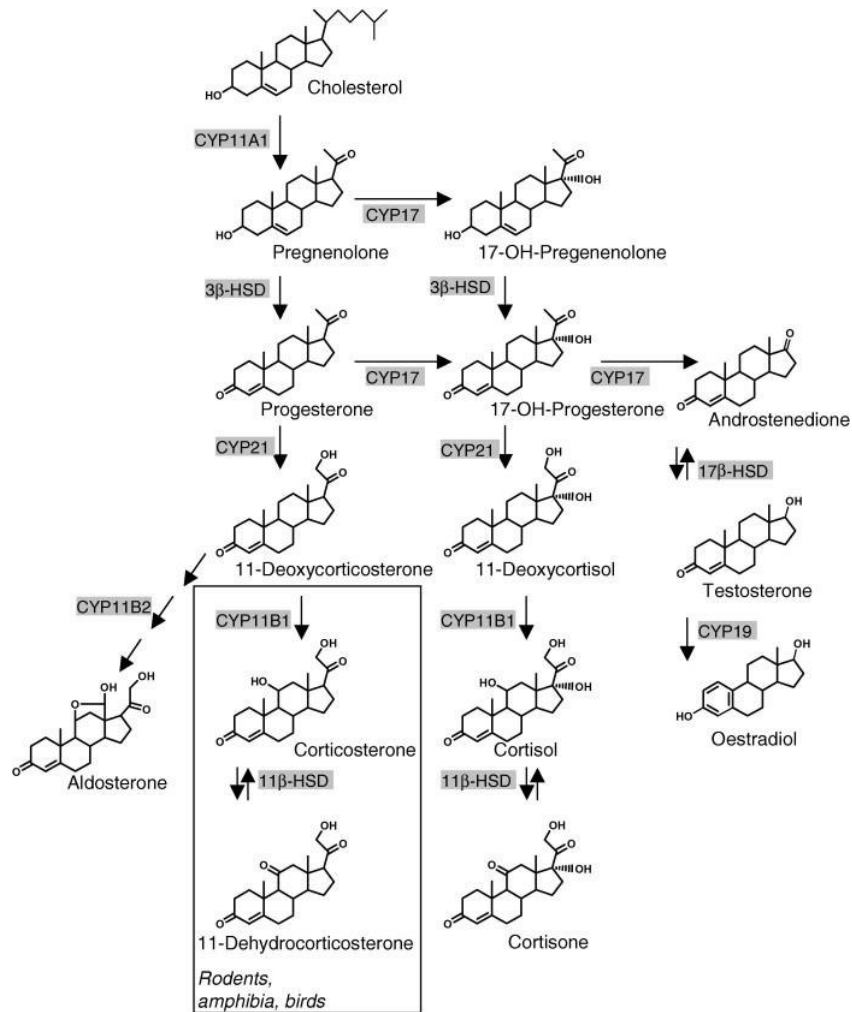


Figura 6. Síntesis de corticosteroides en el humano. La síntesis de las hormonas Los corticosteroides se sintetizan a partir del colesterol, que mediante una serie de reacciones enzimáticas se transforma en glucocorticoides como el cortisol, y en mineralocorticoides como la aldosterona en los humanos, mientras que en roedores, anfibios y aves los mineralocorticoides más abundantes son la corticosterona y la 11dehidrocorticosterona modificado de (Sapolsky *et al.*, 2000).

Los GC son hormonas esteroideas sintetizadas por la zona glomerular de la corteza suprarrenal (Stocco y Clark, 1996) o los tejidos interrenales de anfibios, reptiles y peces. Sin embargo, la síntesis extraadrenal de los corticosteroides se ha encontrado en varios tejidos como el cerebro y los tejidos cardiovasculares (Davies y MacKenzie, 2003). Además, la síntesis de corticosteroide y enzimas androgénica y sus genes correspondientes fueron encontrados en células epiteliales del timo y en células de pulmón en mamíferos en desarrollo (Davies y MacKenzie, 2003; Pazirandeh *et al.*, 1999), y en los queratinocitos de piel humana (Hannen *et al.*, 2011).

El cortisol es el glucocorticoide más abundante en la mayoría de los vertebrados y la corticosterona es el principal corticosteroide en roedores, aves y anfibios, pero además estos esteroides tienen actividad de mineralocorticoides. Los peces teleósteos carecen de aldosterona pero sí tienen cortisol y aparentemente puede actuar como GC y MC (Bury y Sturm, 2007), mientras que la hormona 11-desoxicortisol es el principal corticosteroide en la lamprea, un tipo de agnato y también puede tener acciones de GC y MC (Close *et al.*, 2010). Estudios filogenéticos sobre los receptores a corticosteroides y mineralocorticoides realizados por varios autores sugieren que los receptores para mineralocorticoides evolucionaron primero, (Bridgham *et al.*, 2006; Kumar y Hedges, 1998; Stolte *et al.*, 2006; Thornton, 2001). Otros estudios en peces han demostrado que la hormona 11-desoxicorticosterona (DOC) se encuentra presente en concentraciones altas en el suero de la trucha arco iris durante la espermiación (Campbell *et al.*, 1980; Milla *et al.*, 2008) y además que DOC es un agonista de los receptores a MC en este pez (Sturm *et al.*, 2005).

Con base a estos antecedentes, donde la hormona DOC es un agonista del receptor de MC, se ha desafiado recientemente la concepción de que el cortisol es el único corticosteroide osmoregulador en las diferentes especies estudiadas hasta el momento.

#### **1.4.2. Producción de corticosteroides por los parásitos**

Los corticosteroides tienen dos funciones principales en los vertebrados: una función de glucocorticoides, que afectan el metabolismo y el crecimiento, y una función de mineralocorticoides, que regulan el movimiento de iones y agua. En muchos vertebrados estas funciones son producto de dos hormonas distintas, cortisol (o en algunas especies corticosterona) y aldosterona, que tienen cada uno un receptor específico, el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR) respectivamente. Sin embargo, en otras especies, como en los peces teleósteos en general se ha propuesto que una sola hormona, el cortisol, lleva a cabo las dos acciones, de glucocorticoides y mineralocorticoides (Mommsen *et al.*, 1999; Wendelaar Bonga, 1997), actuando a través de una sola clase de receptores (Chakraborti *et al.*, 1987).

Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que los cisticercos de *T. crassiceps* WFU son capaces de sintetizar corticosteroides como la 11- desoxicorticosterona (DOC), 11-desoxicortisol y corticosterona *in vitro*, siendo el más abundante la 11-desoxicorticosterona (Valdez *et al.*, 2012). Según nuestro conocimiento es la primera vez que se reporta que los parásitos

son capaces de sintetizar este tipo de esteroides que son críticos para la vida, dado su papel relevante en el metabolismo y función inmunológica en mamíferos, aves y peces. Consideramos que será interesante estudiar el papel de estos esteroides producidos por los mismos parásitos. Además los corticosteroides se encuentran en los huéspedes o frecuentemente se administran con fines terapéuticos en la neurocisticercosis. Estudios recientes en peces y lampreas demostraron que la DOC es un activo mineralocorticoide y también lo es el desoxicortisol, ambos estimulan la expresión de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Kiilerich *et al.*, 2011; Close *et al.*, 2010). Sabemos por la literatura que los cisticercos de *T. solium* y *crassiceps* ORF poseen la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa tegumento y en las fibras (Willms *et al.*, 2004). Estos autores demostraron que el cisticerco de *T. solium* posee la subunidad alfa de la enzima en el tegumento, células musculares y ductos protonefridios, ya que aislaron un cDNA de la unidad alfa de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa de una librería de cisticercos de *T. solium* y también en cisticercos de *T. crassiceps* ORF. Por lo tanto, es posible que los corticosteroides como DOC y corticosterona tengan un papel en la expresión de esta enzima en los cisticercos de *Tenia crassiceps* WFU. Hasta la fecha no se encontraron datos en la literatura sobre cómo se regulan estas bombas en los cisticercos, pero la DOC sintetizada por los mismos cisticercos podría ser un candidato para esta importante función.

### **1.5. Tratamientos experimentales *in vivo* e *in situ* para controlar la parasitosis y sus efectos secundarios.**

En clínica humana es frecuente el uso de compuestos que bloquean el efecto de las hormonas esteroides sexuales, sobre todo para inhibir la proliferación de células cancerosas hormono-dependientes como por ejemplo las de cáncer de seno y endometrio (Bulun *et al.*, 2005). Algunas de ellas bloquean el receptor a la hormona como es el caso del tamoxifen, flutamida, y ciproterona; esta última es un esteroide, no así los otros dos fármacos. Otras inhiben la enzima que interviene en la síntesis del esteroide como ese el caso de los fármacos que se han desarrollado para inhibir la actividad de la aromatasa, enzima fundamental en la síntesis de estrógenos (Brodie, 2002). En este último caso podemos mencionar al fadrozole y letrozole. Experimentos de nuestro grupo mostraron que el tratamiento con fadrozole disminuyó la carga parasitaria en ratonas infectadas con cisticercos de *T. crassiceps* ORF (Morales-Montor *et al.*, 2002). En otros experimentos de nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con flutamida, un antiandrógeno que bloquea el receptor a andrógenos y que se utiliza en clínica en humanos



(Neumann, 2005), es capaz de disminuir la carga parasitaria en ratonas infectadas con cisticercos de *T. crassiceps* ORF, y de disminuir la proliferación por gemación de este tipo de cisticercos que carece de scolex (Romano *et al.*, 2003).

Por otra parte, en clínica se utilizan los glucocorticoides en el tratamiento de la neurocisticercosis para paliar la inflamación en el huésped que ocasiona la presencia y también la muerte brusca del parásito causado por los antiparasitarios (Dinkel *et al.*, 2002). Además, la presencia de la enfermedad, que ocasiona severos síntomas neurológicos puede causar stress y aumentar los niveles de cortisol en sangre y en SNC. Por lo tanto, es importante investigar si los corticosteroides influyen en el desarrollo y viabilidad de los cisticercos. Asimismo, es bien sabido que en medicina humana se utilizan fármacos que bloquean enzimas que intervienen en la síntesis de corticosteroides para el tratamiento de síndromes en los que se presentan niveles patológicos de cortisol, por ejemplo la metirapona, trilostano, aminoglutetimida, mitotane y fluconazol (Fassnacht *et al.*, 2000; Brown y Fishman, 2000; Aceves-Ramos *et al.*, 2013). Al respecto, el trabajo de Aceves y cols (2013) demostró recientemente que inhibidores enzimáticos de uso clínico en humanos como metirapona y ketoconazol bloquean la síntesis de corticosteroides *in vitro* en cisticercos de *T. crassiceps* WFU (Aceves-Ramos *et al.*, 2013). Sin embargo, no se conocen los efectos positivos o negativos que estos inhibidores tienen sobre el desarrollo y la supervivencia de los cisticercos.

## **1.6. Los neuroesteroides**

Dentro del metabolismo de hormonas sexuales y corticosteroides, se pueden generar metabolitos llamados neuroesteroides. Las hormonas esteroides periféricas atraviesan las barreras hematoencefálicas y actúan sobre las células cerebrales a través de mecanismos mediados por receptores intracelulares que regulan varias funciones neuronales importantes del cerebro. Por lo tanto, el cerebro tradicionalmente se ha considerado como órgano blanco de hormonas esteroides periféricas. En contraste con este concepto clásico, los nuevos hallazgos en las últimas dos décadas han demostrado que el cerebro mismo sintetiza esteroides *de novo* a partir del colesterol a través de mecanismos al menos en parte independientes de las glándulas esteroideogénicas periféricas. Tales esteroides sintetizados *de novo* en el cerebro y otros sistemas nerviosos se denominan "neuroesteroides (NS)". Baulieu y sus colegas han abierto la puerta a un nuevo campo de investigación de "neuroesteroides" a partir de sus estudios con roedores. Baulieu fue el primero

en acuñar el término neuroesteroide, el describe al SNC como un tejido esteroideogénico, demostró que esteroides como la pregnenolona (P<sub>5</sub>) y DHEA y sus formas sulfatadas P<sub>4</sub>S y DHEAS, se encuentran en mayores concentraciones en el cerebro que en la circulación periférica de roedores. Se ha demostrado que el sistema nervioso central (SNC) expresa la mayoría de las enzimas que sintetizan o modifican esteroides. Se ha documentado la presencia de todas las enzimas que participan en la síntesis de esteroides en el cerebro de rata y en regiones del cerebro humano (Mellon & Deschepper 1993; Gómez-Sánchez *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2002). Los oligodendrocitos, astrocitos y neuronas presentan capacidad esteroideogénica, pero es importante resaltar que entre las neuronas y células gliales existen diferencias en cuanto a la presencia y actividad de estas enzimas (Zwain & Yen, 1999).

Los neuroesteroides por definición, son esteroides que se acumulan en el cerebro en ausencia de glándulas esteroideogénicas, y son sintetizadas en este órgano a partir de precursores endógenos y enzimas presentes *in situ* (Baulieu y Robel 1990).

### **1.6.1. Biosíntesis de neuroesteroides en vertebrados**

Baulieu demostró que las concentraciones de los esteroides como la pregnenolona, la DHEA y sus formas sulfatadas (PregS y DHEAS, respectivamente, permanecían inalterada en el cerebro de roedores 15 días después de la extirpación de las glándulas periféricas responsables de la esteroideogénesis (gónadas y corteza adrenal), sugiriendo que la biosíntesis de estos esteroides se podría dar en el cerebro (Baulieu, 1998 y Corpechot *et al.*, 1993). Además, diversos estudios han demostrado la presencia de enzimas responsables de la esteroideogénesis en el sistema nervioso. Estas enzimas son capaces de sintetizar esteroides a partir del colesterol y de metabolizar los esteroides periféricos que alcanzan el sistema nervioso a través del torrente sanguíneo. Las principales células esteroideogénicas en el sistema nervioso son las neuronas y las células gliales, en el sistema nervioso periférico son las células de Schwann, y en el SNC, los oligodendrocitos y astrocitos (Tsutsui, 2000). También se ha demostrado que algunas estructuras del cerebro de los mamíferos poseen las enzimas CYP P450 (Hu *et al.*, 1987; Le Goascogne *et al.*, 1987; Jung-Testas *et al.*, 1989; Iwahashi *et al.*, 1990; Papadopoulos *et al.*, 1992; Mellon y Deschepper, 1993; Ukena *et al.*, 1998). Otros estudios han demostrado que el ARN mensajero (ARNm) de las enzimas del CYP 450 se expresan en el cerebro de la rata (Jung-Testas *et al.*, 1989; Baulieu y Robel, 1990; Baulieu, 1991; Mellon y Deschepper, 1993; Compagnone *et al.*, 1998; Kohchi *et al.*, 1998; Ukena

*et al.*, 1998). Por lo tanto, la formación de pregnenolona y su éster a partir del colesterol es un proceso bien establecido en el cerebro de los mamíferos. Datos obtenidos en estudios post mortem mediante la técnica de radioinmunoensayo mostraron que la pregnenolona es el neuroesteroide más abundante en el cerebro humano, seguido de la DHEA (Lanthier y Patwardhan, 1986). Los primeros estudios llevados a cabo con las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas para la cuantificación de los niveles de neuroesteroides en el cerebro humano han proporcionado valores de referencia y están de acuerdo con estudios previos adonde se utilizaba la técnica de radioinmunoensayo, en determinar que la pregnenolona es el neuroesteroide más abundante en diferentes regiones del cerebro. Los niveles más altos de esteroides encontrados en diferentes regiones cerebrales (hipocampo, amígdala, córtex frontal, estriado, hipotálamo y cerebelo) en orden decreciente son los siguientes: pregnenolona > DHEA > progesterona > PregS > DHEAS > allopregnanolona (AlloP) (Weill-Engerer *et al.*, 2002). Ciertas regiones cerebrales, como el córtex, el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo, contienen altos niveles de enzimas esteroidogénicas (Griffin y Mellon, 1999). De todas formas, es necesario tener en cuenta que los niveles de neuroesteroides no son estáticos y están sujetos a cambios dinámicos, por ejemplo, durante el estrés, el ciclo menstrual, los últimos meses del embarazo o en respuesta a la ingestión de agentes psicoactivos incluyendo el alcohol (Baulieu, 1998; Morrow *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2001). En humanos, la mayoría de estudios se han basado en los niveles de DHEA y DHEAS, que son los dos neuroesteroides más abundantes en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo (Orentreich *et al.*, 1992; Guazzo *et al.*, 1996). Los niveles circulantes de estos neuroesteroides disminuyen marcadamente con la edad, alcanzando a los 80 años de edad niveles que representan el 20% de los observados a los 20 años (Orentreich *et al.*, 1992; Moffat 2002). La fluctuación de los niveles corticales de AlloP a lo largo de la edad puede constituir un importante factor relacionado con el estrés, la memoria, la ansiedad y la conducta sexual, funciones típicamente alteradas en edades avanzadas, y se puede corresponder con una variedad de enfermedades afectivas observadas en la vejez (Bernardi *et al.*, 1998).

En contraste, otros estudios realizados en otros vertebrados como las aves, excelentes modelos animales para comprender las acciones de los esteroides periféricos en el cerebro y el comportamiento, han demostrado que a partir del colesterol en el cerebro de la codorniz japonesa *Coturnix japónica* se producen neuroesteroides, ya que posee las enzimas del citocromo P450, 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerasa (3 $\beta$ -HSD), 5 $\beta$ -reductasa, citocromo

P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa/c17,20-liasa (P450 17 $\alpha$ , liasa), 17 $\beta$ -HSD. El cerebro de estas aves produce pregnenolona, progesterona, 5 $\beta$ -dihidroprogesterona (5 $\beta$ -DHP), 3 $\beta$ , 5 $\beta$ -tetrahidroprogesterona (3 $\beta$ , 5 $\beta$ -THP), androstenediona, testosterona y estradiol a partir del colesterol (Tsutsui y Yamazaki, 1995 ; Usui et al., 1995) . Schlinger y sus colegas también realizaron estudios similares en el pinzón cebra *Taeniopygia guttata* (Vanson *et al.*, 1996 ; Schlinger *et al.*, 1999 ; Freking *et al.*, 2000 ; Soma *et al.*, 2004 ). Por lo tanto, en el cerebro de las aves ocurre la formación y el metabolismo de varios neuroesteroides a partir del colesterol.

Además de los mamíferos y las aves, la formación y el metabolismo de los neuroesteroides a partir del colesterol ahora está bien documentado en los anfibios (Mensah-Nyagan *et al.*, 1994, 1999; Beaujean *et al.*, 1999; Takase *et al.*, 1999, 2002; Inai *et al.*, 2003; Matsunaga *et al.*, 2004; Do-Rego *et al.*, 2007; Bruzzone *et al.*, 2010) y peces (Sakamoto *et al.*, 2001). En consecuencia, la neurosteroidogénesis *de novo* a partir de colesterol, se considera una propiedad conservada de los vertebrados. Sin embargo, las vías biosintéticas de los neuroesteroides en las aves, así como en otros vertebrados, aún no están completamente mapeadas.

A diferencia de los vertebrados, al menos de acuerdo a nuestra búsqueda, no se sabe nada sobre la neurosteroidogénesis *de novo* e *in vivo* en invertebrados y parásitos.

### **1.6.2. Metabolismo de los neuroesteroides**

La biosíntesis de todos los neuroesteroides empieza con la conversión enzimática del colesterol a pregnenolona (Figura 7). La etapa limitante en la esteroidogénesis es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentra la primera enzima esteroidogénica citocromo P450 (P450<sub>scc</sub>, CYP11A1), que transforma el colesterol en pregnenolona. Hay dos proteínas que median la translocación del colesterol citoplasmático a la membrana interna mitocondrial: la proteína StAR (por sus siglas en inglés, Steroidogenic Acute Regulatory Protein) y el receptor mitocondrial de benzodiazepinas (MBR, por sus siglas en inglés, mitochondrial-type benzodiazepine receptor). El receptor MBR forma un poro a través del cual transita el colesterol (Papadopoulos, 1993). Los moduladores de este receptor pueden modificar la neurosteroidogénesis favoreciendo o bloqueando la apertura de este canal (Papadopoulos *et al.*, 1992; Papadopoulos y Brown 1995). Por ejemplo, el ligando endógeno de este receptor inhibidor de la unión del diazepam y ligandos exógenos tales como el 4-clorodiazepam o el FGIN-1-27,

tienen la propiedad de estimular la esteroidogénesis mitocondrial de la pregnenolona (Hall, 1995; Papadopoulos et al, 1991). La proteína StAR parece interactuar con el receptor MBR para facilitar el transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial (Belelli y Lambert, 2005). Se ha propuesto que esta proteína capta el colesterol de la membrana mitocondrial externa y lo transfiere al MBR, que formaría el canal de colesterol y lo dirigiría a la membrana mitocondrial interna para usarse como sustrato del enzima P450scc (Sierra, 2004).

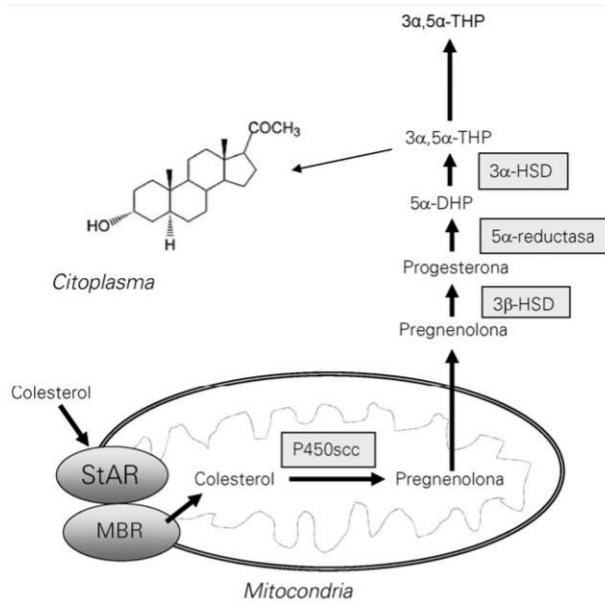


Figura 7. Biosíntesis de los neuroesteroides moduladores del receptor GABA en mamíferos. Se muestra la ruta de síntesis de la AlloP (3α, 5α-THP) desde el colesterol. La proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) podría interactuar con el receptor periférico de benzodiazepinas (MBR) para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial. P450scc: citocromo P450 side chine cleavage; 3α o 3β-HSD: 3α o 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5α-DHP: 5α-dihidroprogesterona. Adaptado de Belelli y Lambert, 2005.

### 1.6.3. Mecanismo de acción de los neuroesteroides

El principal mecanismo de acción de los neuroesteroides en el SNC es la modulación alostérica de receptores ionotrópicos (Rupprecht y Holsboer 1999). Casi la totalidad de los receptores ionotrópicos conocidos modifican su función por efecto de los neuroesteroides (Rupprecht y Holsboer 1999; Rupprecht, 2003). La modulación alostérica de los receptores GABA<sub>A</sub> es la que más extensamente se ha estudiado (Akunne et al., 2001, Reddy y Kulkarni,

1998; Reddy et al., 1998, Smith et al., 1998, Smith, 2002). También se ha descrito la modulación alostérica por neuroesteroides de otros receptores para neurotransmisores ionotrópicos, como son los de serotonina (5-HT<sub>3</sub>) (Wetzel, 1998), NMDA (Park-Chung, 1994), AMPA, kaínico (Wu et al., 1991) y nicotínico (Valera et al., 1992). En la Tabla I se presentan los efectos moduladores de los neuroesteroides sobre los diferentes tipos de receptores.

### **1.6.3.1. Receptor GABA<sub>A</sub>**

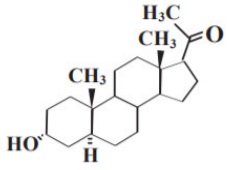
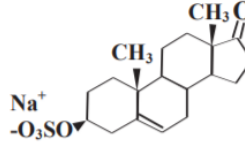
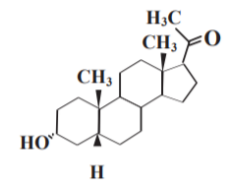
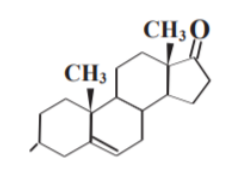
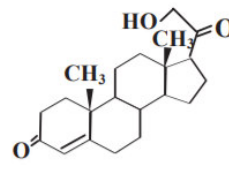
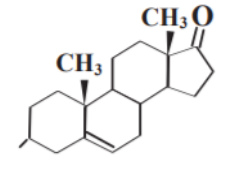
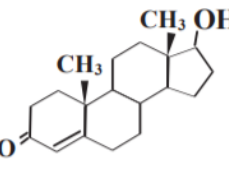
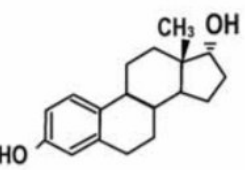
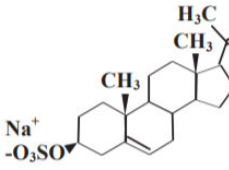
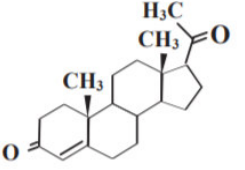
Ciertos neuroesteroides, y en particular los derivados 3 $\alpha$  de la progesterona, se comportan como moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA<sub>A</sub>. Se ha demostrado que la acción de la allopregnanolona (AlloP), uno de estos neuroesteroides, es 20 veces más potente que la acción de las benzodiazepinas y 200 veces más potente que la acción de los barbitúricos sobre la activación del receptor GABA<sub>A</sub> (Harrison, 1984). Estudios de tipo electrofisiológico en neuronas hipocámpales han confirmado que los derivados 3 $\alpha$  de la progesterona actúan sobre el receptor GABA<sub>A</sub> por una parte como los barbitúricos, es decir, aumentando la duración de apertura del canal de Cl<sup>-</sup>, y por otra parte como las benzodiazepinas, aumentando su frecuencia de apertura (Lambert *et al.*, 1995). Se ha observado que los receptores GABA<sub>A</sub> que son insensibles a las benzodiazepinas, en cambio son sensibles a los barbitúricos y aún más sensibles a los neuroesteroides como la AlloP (Whiting *et al.*, 1997). Los efectos de la AlloP sobre los receptores GABA<sub>A</sub> dependen en parte de las subunidades que lo forman. Así, aunque la AlloP modula todos los tipos de composiciones de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> analizadas hasta el momento (Puia *et al.*, 1993), se ha descrito que aquellas que contienen la subunidad  $\delta$  (en lugar de la habitual  $\gamma$ ) son especialmente sensibles (Stell *et al.*, 2003). Por tanto, bajo ciertas condiciones fisiológicas o psicopatológicas, los neuroesteroides GABA positivos pueden alcanzar niveles suficientes para producir un aumento en la función del receptor que posee mayores propiedades inhibitoras en el cerebro. El receptor GABA<sub>A</sub> es una diana terapéutica importante donde actúan diversos compuestos, incluyendo benzodiazepinas y agentes anestésicos generales como el isoflurano o el tiopental (Belelli *et al.*, 1999). Al igual que estos agentes, los neuroesteroides también exhiben propiedades ansiolíticas, anticonvulsiantes, analgésicas y sedativas (Lambert *et al.*, 1995), características acordes con la presencia específica de un sitio de unión en el receptor GABA<sub>A</sub> (Lambert *et al.*, 2001). Otros neuroesteroides como la DHEA o el PregS actúan como moduladores

alostéricos negativos del receptor GABA<sub>A</sub>, inhibiendo la entrada de Cl<sup>-</sup> y reduciendo la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> sin modificar la duración (Gee, 1988; Mienville y Vicini, 1989). Esta acción sobre la frecuencia de apertura del canal es similar a la producida por los agonistas inversos de los receptores de las benzodiazepinas (Akwa y Baulieu, 1999). La modulación negativa del receptor GABA<sub>A</sub> por parte de los neuroesteroides parece implicar específicamente a los neuroesteroides sulfatados. Así, la presencia o ausencia del grupo sulfato parece modificar la interacción del neuroesteroide con el receptor GABA<sub>A</sub>. La pregnenolona se comporta como un agonista del receptor GABA<sub>A</sub>, ofreciendo una acción opuesta a la que presenta su derivado sulfatado (Hawkinson *et al.*, 1996). Los neuroesteroides que actúan como moduladores negativos sobre el receptor GABA<sub>A</sub> presentan perfil proconvulsivo (Williamson *et al.*, 2004), facilitador de la memoria (Darnaudey *et al.*, 2002; Mayo *et al.*, 1993; Pallarés *et al.*, 1998) y ansiogénico (Melchior y Ritzmann, 1994).

### **1.6.3.2. Receptor NMDA**

Los neuroesteroides como el PregS, la DHEA y el DHEAS son moduladores alostéricos positivos del receptor NMDA (Park-Chung *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1991; Bowlby, 1993; Compagnone y Mellon, 1998). Los efectos conductuales de la modulación positiva del NMDA por los neuroesteroides se han investigado ampliamente. La mejora de la memoria inducida por la DHEAS se ha relacionado con la actividad del receptor NMDA (Bergeron *et al.*, 1996; Mathis *et al.*, 1996). El PregS actúa como modulador alostérico positivo del receptor NMDA aumentando la entrada de Ca<sup>++</sup> provocada por el glutamato, tal como se ha descrito en preparaciones de neuronas hipocámpicas (Paul y Purdy, 1992). Esta modulación del receptor NMDA se da aumentando la frecuencia y la duración de apertura del canal de Ca<sup>++</sup> (Mellon, 1994). Se sabe que en el funcionamiento del receptor NMDA es muy importante la acción de la glicina y que la PregS también puede interactuar con el receptor de la glicina. En este sentido, se ha demostrado que la potenciación de la respuesta del NMDA por parte de este neuroesteroide no implica una acción sobre el sitio modulador de la glicina (Wu *et al.*, 1991; Park-Chung *et al.*, 1997). Ciertos neuroesteroides inhiben la acción del receptor NMDA actuando como antagonistas no competitivos. El sulfato de AlloP actúa como modulador alostérico negativo del receptor NMDA, mientras que las formas no sulfatadas son muy poco o nada activas (Park-Chung *et al.*, 1994).

**Tabla 2. Resumen de los efectos moduladores de los neuroesteroides en los diferentes tipos de receptores (adaptado de Dubrovsky, 2005)**

Neuroesteroide	Receptor	Tipo de modulación	Neuroesteroide	Receptor	Tipo de modulación
 Allopregnanolona 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-one 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ tetrahidroprogesterona 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -TH PROG	GABA <sub>A</sub> 5-HT <sub>3</sub> nAChR	Positiva Negativa Negativa	 Sulfato de dihidroepiandrosterona 3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-one sulfato DHEAS	GABA <sub>A</sub> NMDA $\sigma$ tipo I	Negativa Positiva Positiva
 Pregnanolona 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-one 3 $\alpha$ ,5 $\beta$ tetrahidroprogesterona 3 $\alpha$ ,5 $\beta$ -TH PROG	GABA <sub>A</sub>	Positiva	 Dihidroepiandrosterona 3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-one DHEA	GABA <sub>A</sub> NMDA	Negativa Positiva
 Dioxicorticosterona 21-hidroxi-3,20-dione DOC	GABA <sub>A</sub>	Positiva	 Estradiol 1,3,5(10)-estratiene-3,17 $\beta$ -diol 17 $\beta$ -E	NMDA Kainato 5-HT <sub>3</sub>	Negativa Positiva Negativa
 Testosterona 17 $\beta$ -hidroxiandrost-4-en-3-one T	GABA <sub>A</sub> 5-HT <sub>3</sub>	Positiva Negativa	 17 $\alpha$ -estradiol 1,3,5(10)-estratiene-3,17 $\alpha$ -diol 17 $\alpha$ -E	5-HT <sub>3</sub>	Negativa
 Sulfato de pregnenolona 3 $\beta$ -hidroxi-5-en-20-one sulfato PregS	GABA <sub>A</sub> NMDA AMPA Kainato Glicina 5-HT <sub>3</sub> $\sigma$ tipo I nAChR	Negativa Positiva Negativa Negativa Negativa Sin efecto Negativa Negativa	 Progesterona Pregn-4-en-3, 20-one PROG	GABA <sub>A</sub> Kainato Glicina 5-HT <sub>3</sub> nAChR	Positiva Positiva Negativa Negativa Negativa



## **1.7 Justificación**

La neurocisticercosis causada por la presencia de los cisticercos de *T. solium* es una enfermedad grave que puede causar epilepsia, hipertensión intracraneana, y la muerte de los pacientes por lo que es necesario continuar investigando la biología del parásito. Las herramientas terapéuticas actuales no siempre son capaces de controlar el desarrollo del parásito por lo que es necesario profundizar en el conocimiento de la biología del parásito que ayude a encontrar terapias alternativas y/o coadyuvantes para eliminar el cisticerco con el menor daño posible del huésped.

El modelo experimental de cisticercosis por *T. crassiceps* WFU ha resultado ser una excelente herramienta para investigar al cisticerco y el gusano de *T. solium* ya que comparte varias características con esta especie.

Es importante saber si la síntesis de esteroides sexuales y corticosteroides depende del estadio de desarrollo del parásito. También es necesario estudiar la capacidad de síntesis de esteroides del cisticerco y de la tenia con herramientas de gran sensibilidad y especificidad para detectar la síntesis de otras moléculas, como los neuroesteroides.

## **1.8 Hipótesis**

- ❖ El perfil de síntesis de hormonas corticosteroides y sexuales del helminto *Taenia crassiceps* WFU dependerá de la etapa de desarrollo del parásito.

## **1.9 Objetivo general**

- ❖ Evaluar el perfil metabólico de hormonas corticosteroides, esteroides sexuales, en cisticercos invaginado, evaginado y en la tenia de *Taenia crassiceps* WFU.

### **1.9.1 Objetivos específicos**

- ❖ Investigar si la síntesis de corticosteroides y esteroides sexuales depende de la etapa de desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU, invaginados y evaginados.

- ❖ Investigar el perfil metabólico de corticosteroides y esteroides sexuales en el gusano de *Taenia crassiceps* WFU.
- ❖ Desarrollar y adaptar un método de cromatografía líquida de ultra rendimiento con detector de masas (UPLC/MS<sup>2</sup>) para la detección de hormonas corticosteroides y esteroides sexuales en los cisticercos invaginados y evaginados y en el gusano de *Taenia crassiceps* WFU.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Estrategia experimental

Para el desarrollo de este proyecto se siguió la siguiente estrategia experimental:

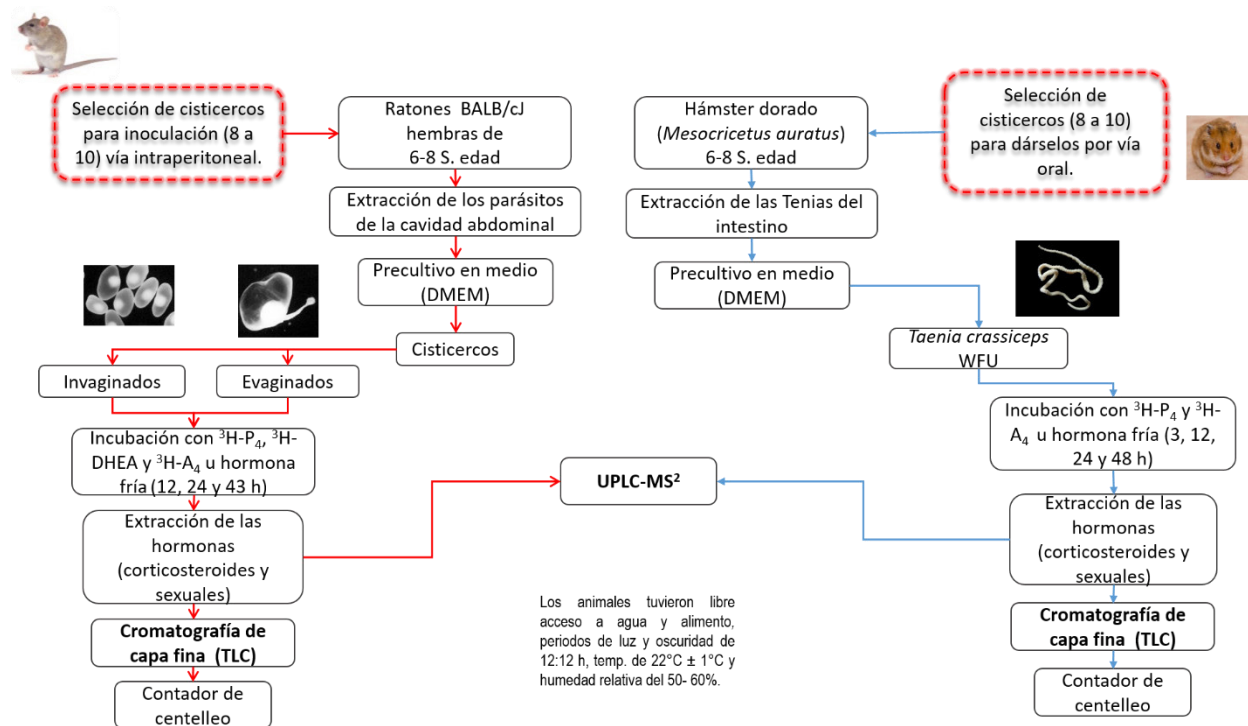


Figura 8. Estrategia experimental para el desarrollo del presente proyecto. Infección y desarrollo de los parásitos y del gusano adulto de *Taenia crassiceps* WFU en la cavidad peritoneal y en el intestino de hámster dorado y cultivados a diferentes tiempos con hormona tritriada o fría y extracción de los analitos para ser identificados por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de ultra resolución acoplado a masas (UPLC-MS<sup>2</sup>).

### 2.2 Origen de los reactivos

Los reactivos y disolventes para este proyecto se obtuvieron de las siguientes marcas comerciales:

Progesterona (P<sub>4</sub>), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP<sub>4</sub>), Androstenediona (A<sub>4</sub>), Allotetradexicorticosterona (ALLO-DOC), Allopregnanolona (ALLOP), Cortisol (CLS), Corticosterona (CNA), Deoxicortisol (DCLS), Dihidrocorticosterona (DHC), Dehidroepiandrosterona (DHEA), Dihidroprogesterona (DHP), Dihidrotestosterona (DHT), Deoxicorticosterona (DOC), Estriol (E<sub>3</sub>), Hidroxiprogesterona (HIDROPROG), Hidroxitestosterona (OHT), Testosterona (T), Aldosterona (ALDO), Androstenediol (ADIOL),

Estradiol (E<sub>2</sub>), Estrona (E<sub>1</sub>), Dihidroandrosterona (DHA), Dihidrodeoxicoticosterona (DH-DOC), Androstanediona (ASN), Androsterona (AN) y Pregnanolona (PREG), fueron obtenidos de Steraloids Inc. (Newport, RI, USA) y Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA).

El metanol (MeOH), el agua, la acetona y el acetonitrilo grado HPLC y masas se compraron de Honeywell Burdick and Jackson (Muskegon, MI, USA) y de Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, USA).

El éter etílico se compró de J. B. Baker (Xalostoc, Edo. de México, México).

### **2.3 Método de infección para el desarrollo de los cisticercos**

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU, que tienen la ventaja de ser similares al cisticerco de *T. solium* ya que ambos tienen scolex; la cepa WFU se obtuvo de un ratón silvestre en 1999 en Michigan, E.U.A. y fue donada por el Dr. Raymond Kuhn de Wake Forest University. Esta especie tiene la facilidad de mantener el estado larvario y reproducirse por gemación. Los cisticercos se seleccionaron considerando que tenían un diámetro vesicular de alrededor de 2 mm que no presenten gemas y que sean transparentes. Las ratonas Balb/cJ de 6-8 semanas de edad se infectaron mediante la inyección intraperitoneal de 10 cisticercos usando jeringas con agujas calibre 27 o 21.

#### **2.3.1 Extracción de los cisticercos**

Después del tiempo de infección (3-4 meses), las ratonas se sacrificaron por decapitación o dislocación craneal y se extrajeron los parásitos. Una vez que se extrajeron los parásitos, se lavaron 10 veces con PBS estéril y finalmente se precultivaron por 24 horas en medio de cultivo estéril DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía 0.1 % de Albúmina Sérica Bovina (BSA), HEPES 25 mM y 1 % de antibiótico-antimicótico (penicilina G sódica, anfotericina y sulfato de estreptomina B), con un pH de 7.8. El volumen del medio DMEM utilizado en la preincubación fue de 1:1 (v/v), es decir, por cada 10 ml de cisticercos se le agregaron 10 ml de medio para que a las 24 horas de preincubación algunos cisticercos invaginados pudieran evaginar por cambio de pH del medio por actividad metabólica de los parásitos. Después terminado el tiempo de preincubación, los cisticercos fueron clasificados en invaginados y evaginados y se

cultivaron en placas multipozos, a cada pozo, se agregaron 200 a 400  $\mu$ l de la suspensión de los cisticercos dependiendo del experimento, y 1 ml de medio de cultivo estéril DMEM. El medio se esterilizó por filtración con un filtro Millipore de poro de 0.22 micrómetros. Los parásitos se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 95 % de humedad relativa (Valdéz y cols., 2006).

#### **2.4 Cultivo de cisticercos con hormonas tritiadas y fría**

Los parásitos fueron clasificados según el desarrollo del cisticerco (invaginados y evaginados) para investigar si la capacidad de sintetizar corticosteroides y hormonas sexuales varía de acuerdo a la etapa de desarrollo del cisticerco. Los parásitos previamente preincubados y terminado el tiempo se les extrajo el medio de cultivo y fueron incubados de nuevo con medio DMEM y adicionado con 50,000 cpm de <sup>3</sup>H-progesterona [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> y <sup>3</sup>H-androstenediona [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> u hormona fría a una concentración de 20  $\mu$ M de P<sub>4</sub> con tiempos de incubación de 6, 12, 24 y 43 horas y terminado el tiempo se recuperó el medio para su posterior extracción de hormonas con éter. Se incubó simultáneamente medio de cultivo sin parásitos al que solo se le agrego el precursor radioactivo u hormona fría como blancos o bien parásitos incubados a los mismos tiempos sin hormona para evaluar el perfil esteroideo basal en los estadios de desarrollo.

#### **2.5 Método de infección para el desarrollo de las tenias y extracción**

Las tenias adultas de *T. crassiceps* WFU se recuperaron del intestino de hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) inoculados 25-45 días antes mediante la administración oral de 8-10 cisticercos obtenidos previamente de la cavidad peritoneal de ratonas Balb/cJ infectados con cisticercos de *T. crassiceps* WFU. Los hámsters fueron pretratados durante cinco días con 40 mg/kg de albendazol (Zentel, suspensión oral, Smith, Kline, Beecham, México) y se les inyectó 2 mg de acetato de metil-prednisolona (Depomedrol, Upjohn, México) el día de la infección y cada dos semanas durante la duración de los experimentos. Después del tiempo de infección los animales se sacrificaron mediante la inyección de barbital de sodio (Anestosal, Cat. Q-0001-065 para uso veterinario, Pfizer, México) y se extrajo el intestino delgado para extraer las tenias, el intestino se abrió longitudinalmente para recuperar el gusano adulto (Willms *et al.*, 2003, Fernández Presas *et al.*, 2008). Las tenias extraídas fueron lavadas 10 veces con PBS estéril y

finalmente se precultivaron por 24 horas en medio de cultivo estéril DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía 0.1 % BSA, HEPES 25 mM y 1 % de antibiótico-antimicótico (penicilina G sódica, anfotericina y sulfato de estreptomina B) y suero bovino fetal al 10% por 48h, con un pH de 7.8.

## **2.6 Cultivo de las tenias con hormona tritiada y fría**

Las tenias preincubadas previamente fueron nuevamente lavadas con PBS estéril para eliminar el suero bovino fetal, en breve fueron colocadas de forma individual en cajas Petri para incubarlas de nuevo con medio DMEM, se le colocaron 50,000 cpm de precursor radioactivo de [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> y [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> u hormona fría (20 μM) de P<sub>4</sub> según el experimento a realizar, los tiempos de incubación fueron de 6, 12, 24 y 43 horas y terminado el tiempo se recuperó el medio para su posterior extracción de hormonas con éter.

## **2.7 Extracción de las hormonas**

### **2.7.1 Procedimiento**

El perfil esteroideo se evaluó mediante cromatografía en capa delgada (TLC) como se reportó previamente para cisticercos de *T. solium*, *T. crassiceps* ORF y WFU (Gómez y cols, 2000, Valdez y cols, 2006, Hinojosa y cols. 2011, Valdez y cols., 2012) y por UPLC-MS<sup>2</sup>. Se utilizó <sup>3</sup>H-progesterona como precursor para la síntesis de corticosteroides y <sup>3</sup>H-androstenediona para la síntesis de andrógenos y estrógenos. Por otro lado, otras muestras tratadas con P<sub>4</sub> fría se utilizaron para evaluar el perfil esteroideo de estrógenos, andrógenos y corticosteroides por UPLC-MS<sup>2</sup>. Después de cultivar los cisticercos y las tenias en presencia de los tratamientos correspondientes, el medio DMEM recuperado se le agregó éter para la extracción de las hormonas en una proporción de 1:5 v/v (por cada 1 ml de medio se le agregaron 5 ml de éter). Después de la adición del éter el vial fue mezclado en vortex durante un minuto y se esperó hasta que se separó la fase etérea y acuosa. Posteriormente el vial fue congelado en acetona fría más hielo seco para congelar la fase acuosa y en breve se recuperó la fase etérea en un nuevo vial, el éter fue evaporado a sequedad. Los esteroides se solubilizaron en etanol grado HPLC y se sembrarán para su análisis por cromatografía de capa fina (TLC) o se reconstituyó con metanol grado HPLC masas para su análisis e identificación de las hormonas por UPLC/MS<sup>2</sup>.

## **2.8 Identificación de las hormonas por Cromatografía de capa fina (TLC)**

### **2.8.1 Principio**

La cromatografía es un método de separación y análisis basado en el empleo de una fase estacionaria y una móvil. Los componentes de una muestra se hacen pasar por una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil de manera que las sustancias se distribuyen entre las dos fases. Aquellos solutos cuya relación de distribución sea favorable a la fase estacionaria quedan retenidos por ésta, mientras que los solutos que se encuentran preferentemente en la fase móvil serán los primeros en eluir. De esta forma los analitos son separados en orden creciente a sus coeficientes de partición entre las dos fases (Jeffery y col., 1989).

Para la cromatografía en capa fina se preparó la placa de silica gel (20 x 20 kieselgel 60 F<sub>254</sub>) rayándola verticalmente con una separación de 1.5 cm de separación, a cada columna generada del rayado se le depositaron 3 µl de los estándares a cuantificar, disueltos previamente en acetona grado HPLC, después de aplicar los estándares, se sembraron 20 µl de las muestras problemas solubilizadas en 60 µl de etanol, se utilizó nitrógeno gaseoso para secar el punto de la aplicación. Las placas se corrieron utilizando un sistema de solvente de Benceno-MeOH (9:1 v/v) para hormonas sexuales y de Tolueno-Acetona-MeOH (78:20:2 v/v) para glucocorticoides. Una vez que las muestras eluyeron sobre la placa, se retiró de la cámara y se dejaron evaporar los solventes a temperatura ambiente. Posteriormente, los estándares se identificaron en las placas por medio de luz U.V. y la región correspondiente a los mismos se recortó. Los estándares se revelaron con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 10 % seguido de la aplicación de calor a 120 °C, posteriormente se recortaron las placas teniendo en cuenta los estándares auténticos sembrados simultáneamente y se colocaron en viales con líquido de centelleo. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido. Se calculó el porcentaje de transformación del precursor a los metabolitos esperados según el precursor utilizado.

## 2.9 Análisis de estrógenos y sus metabolitos por cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC-MS<sup>2</sup>)

### 2.9.1 Condiciones cromatográficas

La determinación de los corticosteroides, andrógenos, estrógenos y sus metabolitos se realizó por UPLC-HESI-MS/MS, usando un equipo Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA), equipado con un inyector automático refrigerado y mantenido a 10 °C, el que está conectado a un detector de matriz de fotodiodos (PDA) y acoplado a un sistema de espectrometría de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Finnigan, San José, CA, EE. UU.). El aparato está equipado con una fuente de ionización por electro-spray calentada (HESI) en modo positivo con las siguientes condiciones: temperatura del vaporizador ajustada a 300 °C; temperatura del capilar establecida a 275 °C; 4.0 kV para la fuente; 9.0 V para el capilar; y 100 V para la lente del tubo; a una velocidad del flujo del gas nitrógeno establecida en 35.00 arb. Para la separación de los analitos se utilizó una columna Acquity BEH C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm con tamaño de partícula de 1,7 µm) (Waters, Milford, MA, USA) equipada con una precolumna. Los disolventes del sistema consistieron de un gradiente de agua y acetonitrilo (ACN) (a ambos solventes se les adicionó 0.1% de ácido fórmico). El proceso consistió de 5 etapas con un tiempo de duración de 10 min a un flujo de 0.6 ml/min. El análisis y procesamiento de los datos se hizo con el software Thermo Xcalibur versión 2.2 (ThermoFisher Scientific, San José, CA, EE. UU.) (Tabla 2, Figura 9). Esta parte del proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, Laboratorio 125, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Tabla 2. Programa de solventes para el análisis de los corticosteroides, andrógenos, estrógenos y sus metabolitos.

Etapas	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Proporción (%)	
			Agua (0.1 % AF)	ACN (0.1 % AF)
1	0	0.6	15	85
2	4	0.6	0	100
3	4.45	0.6	0	100
4	5	0.6	15	85
5	10	0.6	15	85



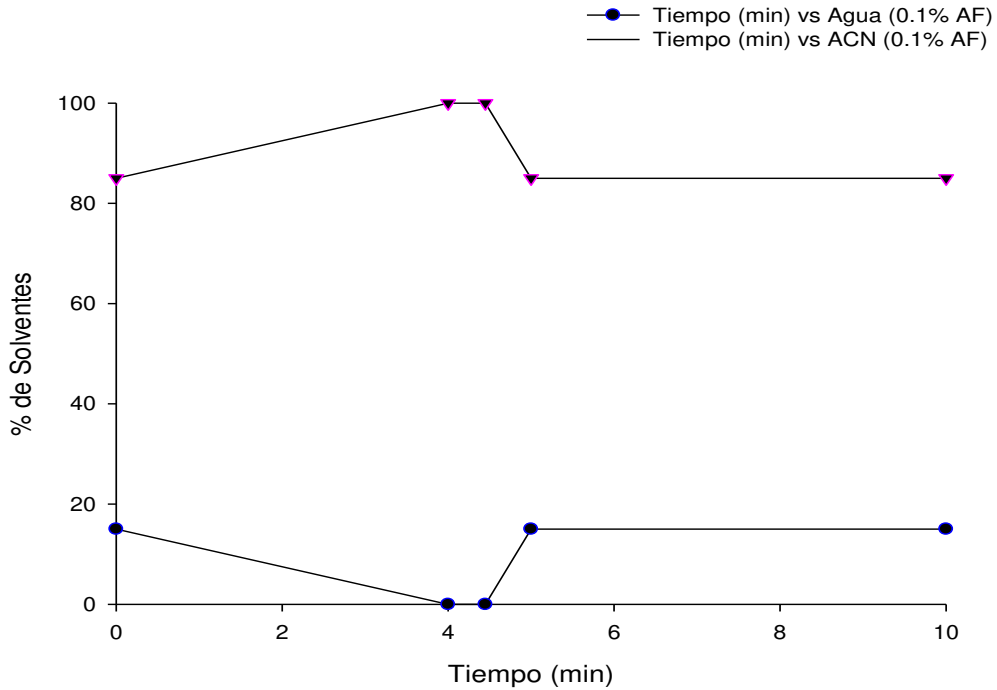


Figura 9. Diagrama del gradiente de solventes usados para el análisis de los corticosteroides, andrógenos, estrógenos y sus metabolitos.

## 2.10 Análisis estadístico

El análisis descriptivo de las variables analizadas se realizó con la medida de tendencia central, la media aritmética y se utilizó la desviación estándar como medida de dispersión. La diferencia entre las concentraciones de hormonas entre los periodos de infección de los diferentes estadios de desarrollo del cisticerco se evaluó mediante *t-student* o un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc*, según el caso. La significancia estadística se estableció a un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizará utilizando el programa GraphPad Prism 8. Se realizaron tres experimentos de forma independiente con una  $n=6$  para cada grupo diferente.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Metabolismo de corticosteroides en cisticercos invaginados y evaginados de *Taenia crassiceps* WFU

Los parásitos de *Taenia crassiceps* WFU obtenidos de la cavidad abdominal de ratones hembras Balb/c se clasificaron en invaginados y evaginados. En ambos grupos se determinó el metabolismo de corticosteroides en tres tiempos diferentes. La figura 10 presenta el porcentaje de transformación de los parásitos invaginados y evaginados incubados con el precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> por 12 horas. Ambos grupos transformaron la progesterona a diferentes metabolitos como se observa en la figura 10; en ambos grupos predominó el metabolito 11-desoxicorticosterona (DOC), pero fue significativamente mayor en el grupo de los parásitos evaginados.

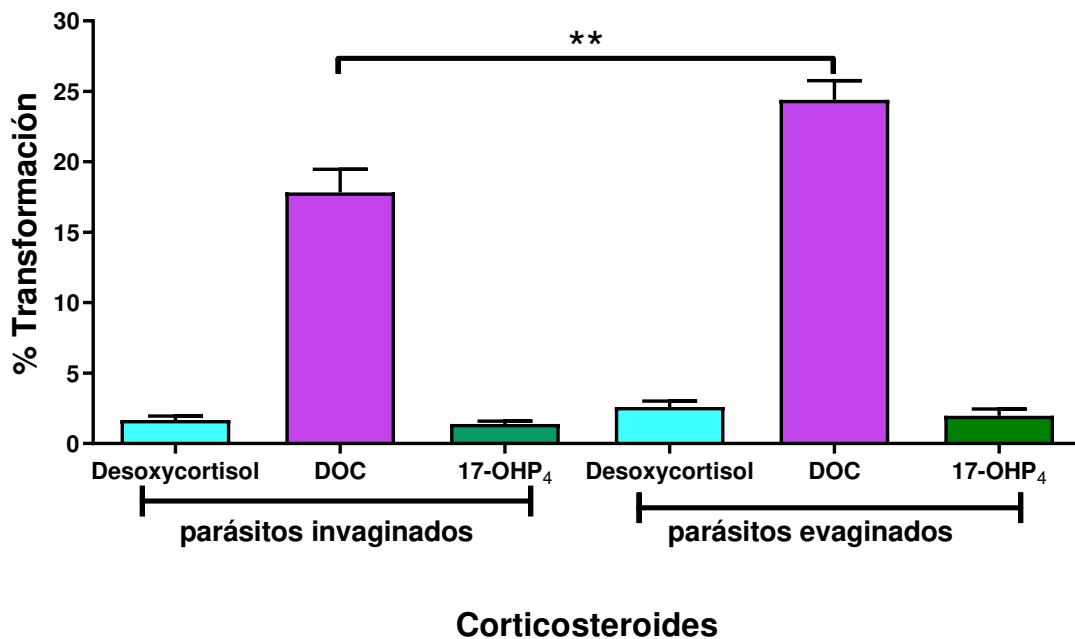


Figura 10. Metabolismo de corticosteroides por cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU. Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación del sustrato después de 12 horas de incubación con el precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> en dos grupos de parásitos, de acuerdo a su desarrollo (Invaginados y Evaginados). Cada valor representa la media ± DE con una n=6 pozos por estadio de los parásitos. El sistema de solventes empleado en la TLC fue Tolueno:Acetona:MeOH (78:20:2), *t-student* \* p < 0.05.

Por otro lado, cuando los cisticercos invaginados y evaginados se incubaron por tiempos más prolongados con el precursor  $[^3\text{H}]\text{-P}_4$  (24 horas), nuevamente se observó que los cisticercos evaginados producían cantidades significativamente mayores de DOC y también de desoxicortisol. Además, a este tiempo de incubación se observó biotransformación de  $[^3\text{H}]\text{-P}_4$  a corticosterona, metabolito que no se encontró a las 12 horas de incubación (Figura 11).

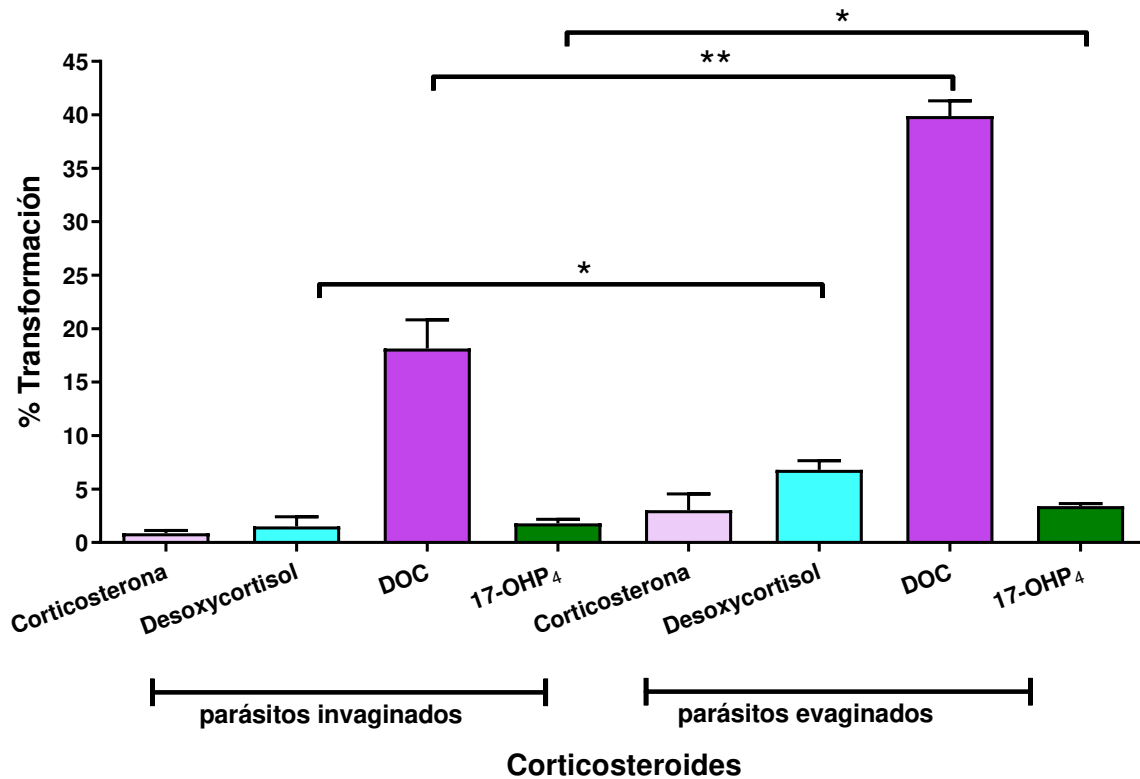


Figura 11. Metabolismo de corticosteroides por cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU. Metabolitos producidos a partir del precursor  $^3\text{H}\text{-P}_4$  durante 24 horas de incubación y expresados como el porcentaje de transformación, en dos grupos de parásitos de acuerdo a su desarrollo (Invaginados y Evaginados). Cada valor representa la media  $\pm$  DE con una  $n=6$  pozos por estadio de los parásitos. El sistema de solventes empleado en la TLC fue Tolueno:Acetona:MeOH (78:20:2), *t-student* \*  $p < 0.05$ .

Al incubar con el precursor  $[^3\text{H}]\text{-P}_4$  por 43 horas, la biotransformación se mantuvo constante en los dos grupos de desarrollo de los cisticercos, y apareció otro metabolito, el cortisol (Figura 12). En cuanto a la producción de DOC se encontró que los cisticercos evaginados continúan sintetizando más cantidad de este metabolito. La síntesis de DOC en los cisticercos

evaginados es tiempo-dependiente, mientras que en los cisticercos invaginados no difirió de la encontrada a las 24 h de incubación con el precursor, pero aumentó a las 43 h. (Tabla 3).

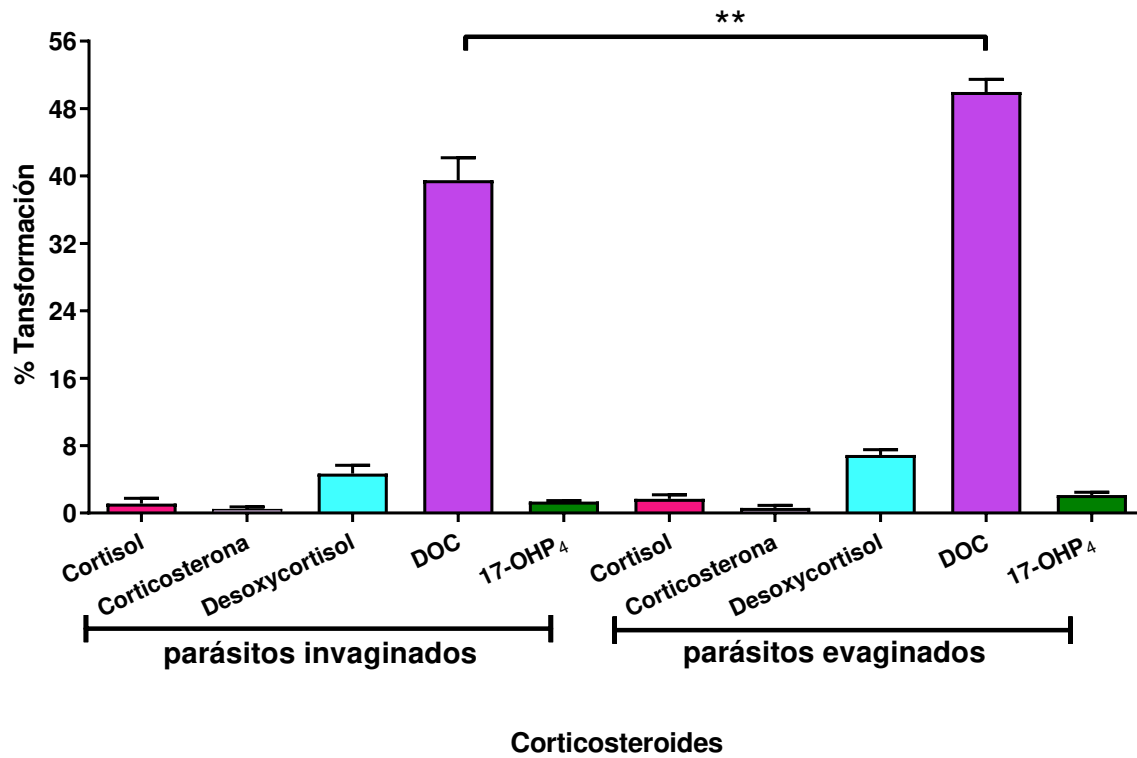


Figura 12. Metabolismo de corticosteroides por cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU. Porcentaje de transformación del sustrato a partir del precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> durante 43 horas de incubación en dos grupos de parásitos de acuerdo a su desarrollo (Invaginados y Evaginados). Cada valor representa la media ± DE con una n=6. El sistema de solventes empleado en la TLC fue Tolueno:Acetona:MeOH (78:20:2), *t-student* \* p < 0.05.

Tabla 3. Síntesis de <sup>3</sup>H-DOC tiempo-dependiente a partir del precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub>.

PRECURSOR	METABOLITO	Porcentaje de transformación evaluado en dos estadios de desarrollo del cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU	
		<i>Cisticercos invaginados</i>	<i>Cisticercos evaginados</i>
PROGESTERONA/DOC#	12 horas	18.1 ± 2.6	30.1 ± 3.4
	24 horas	18.1 ± 6.5	39.1 ± 3.4**
	43 horas	39.5 ± 6.4	50.0 ± 3.6**
PROGESTERONA/DESOXYCORTISOL	12 horas	1.6 ± 0.71	2.6 ± 1.0
	24 horas	0	6.8 ± 2.07*
	43 horas	4.68 ± 2.41	6.88 ± 1.57

#Desoxycorticosterona (DOC).

### 3.2 Metabolismo de esteroides sexuales en cisticercos invaginados y evaginados de *Taenia crassiceps* WFU

La incubación de parásitos invaginados y evaginados con el precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> mostró que los dos grupos de cisticercos metabolizan hacia esteroides sexuales. La síntesis de testosterona fue la más abundante a las 6 horas de incubación en los cisticercos evaginados y fue significativamente mayor comparada con la de los parásitos invaginados (Figura 13). Sin embargo, el porcentaje de transformación a estrona (E<sub>1</sub>) a partir del mismo precursor fue significativamente mayor en los parásitos invaginados, pero sin ser estadísticamente significativo para estradiol (E<sub>2</sub>).

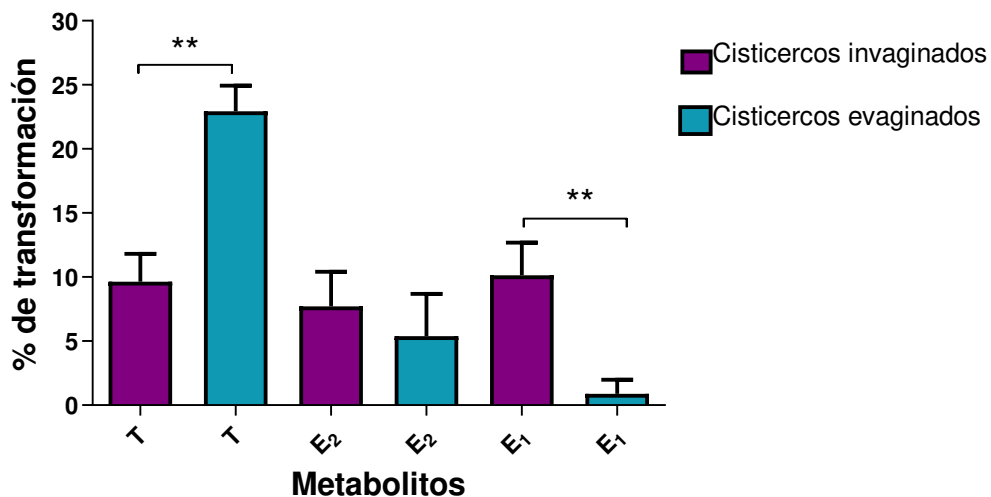


Figura 13. Metabolismo de esteroides sexuales en cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU. Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación de sustrato después de 6 horas de incubación con el precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> en dos etapas de desarrollo los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU, (invaginados y evaginados). Cada valor representa la media ± DE de 6 pozos. \*\*Indica la diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de cisticercos. *t*-Student, *p*<0.001.

Se incubaron los cisticercos con el precursor [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> para evaluar la existencia de la vía Δ<sub>4</sub> en los cisticercos. El tiempo de incubación con el precursor [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> fue de 6, 24 o 43 h. Se observó un notorio incremento en la síntesis de T comparando las 6 y 48 h de incubación en ambos grupos (Tabla 4). A las 6 h de incubación la síntesis de este andrógeno fue significativamente mayor en los últimos. Después de este periodo no se observaron diferencias entre grupos en las síntesis de esta hormona. No se encontraron diferencias en la síntesis de 17β-estradiol que se mantuvo constante en ambos grupos. Por otro lado, la producción de estrona fue indetectable a las 24 y 48 h de incubación. (Tabla 4).

Tabla 4. Evolución temporal de la síntesis de esteroides por dos etapas de desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU. Síntesis de [<sup>3</sup>H]-T, [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub> y [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub> a partir del precursor [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub>.

PRECURSOR METABOLITO	Porcentaje de transformación evaluado en dos estadios de desarrollo del cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU	
	<i>Cisticercos invaginados</i>	<i>Cisticercos evaginados</i>
[ <sup>3</sup> H]-A <sub>4</sub> /T <sup>#</sup>		
6 horas	9.6 ± 2.1	22.9 ± 1.9**
24 horas	71.4 ± 7.6	75.5 ± 4.5
43 horas	75.0 ± 4.7	74.1 ± 5.3
[ <sup>3</sup> H]-A <sub>4</sub> /E <sub>2</sub> <sup>&amp;</sup>		
6 horas	7.7 ± 2.7	5.3 ± 3.3
24 horas	4.7 ± 2.7	3.8 ± 4.3
43 horas	3.1 ± 2.5	0
[ <sup>3</sup> H]-A <sub>4</sub> /E <sub>1</sub> <sup>*</sup>		
6 horas	10.1 ± 2.5**	0
24 horas	0	0
43 horas	0	0

<sup>#</sup>Testosterona (T), <sup>&</sup>Estradiol (E<sub>2</sub>) y <sup>\*</sup>Estrona (E<sub>1</sub>).

Para comparar la síntesis de esteroides sexuales por la ruta Δ<sup>5</sup>-esteroidogénica, los parásitos de *Taenia crassiceps* WFU invaginados y evaginados también se incubaron durante 6 h con [<sup>3</sup>H]-DHEA como precursor (Figura 14). Los resultados mostraron que en ambas etapas de desarrollo los parásitos sintetizaron los andrógenos androstendiol, androstendiona y testosterona. La síntesis de androstendiol predominó después de 6 h de exposición a [<sup>3</sup>H]-DHEA, y la síntesis de androstendiona y testosterona fue significativamente mayor en los parásitos evaginados. También se detectaron estrógenos, pero no se encontraron diferencias significativas entre los cisticercos invaginados y evaginados.

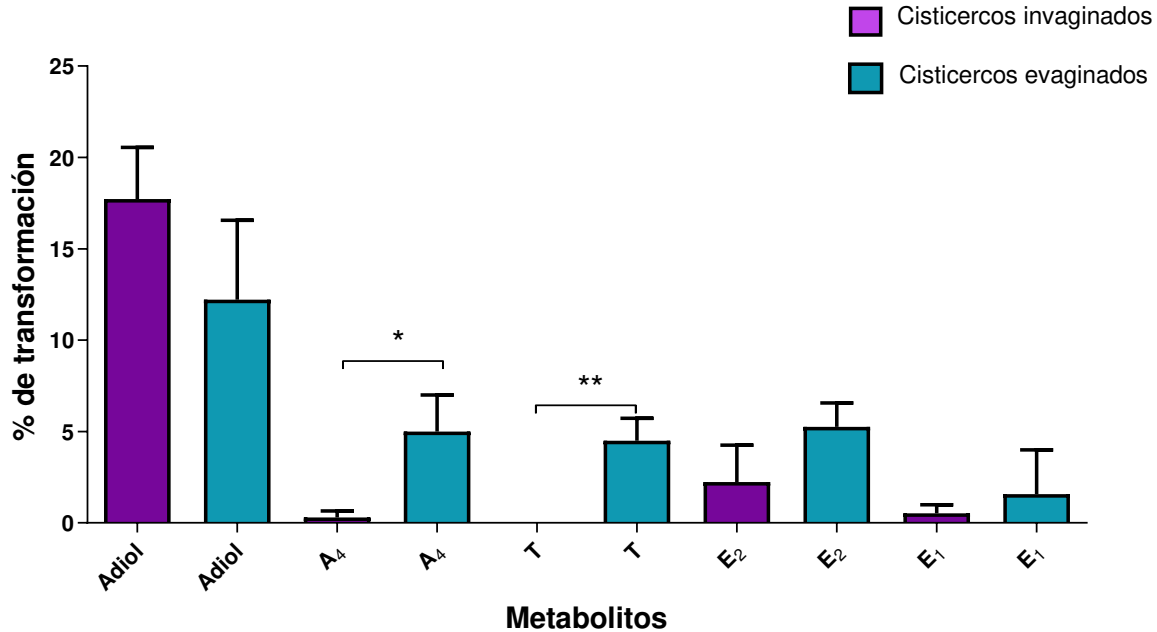


Figura 14. Metabolismo de esteroides sexuales por la ruta  $\Delta 5$ -esteroidogénica. Los resultados se expresan como el porcentaje de transformación de sustrato después de 6 horas de incubación con el precursor  $[^3\text{H}]$ -DHEA. Cada valor representa la media  $\pm$  DE con una n=6. t-Student, \*p<0.05 para A<sub>4</sub> y \*\* p<0.001 para testosterona.

### 3.3 Síntesis de esteroides sexuales por el gusano de *Taenia crassiceps* WFU

La figura 15 muestra la síntesis de testosterona y estrógenos por el gusano de *Taenia crassiceps* WFU. Después de 3 h de incubación con el precursor  $^3\text{H}$ -A<sub>4</sub>, se encontró abundante producción de testosterona y pequeñas cantidades de estrógenos, con predominio de estradiol.

La incubación de las tenias con  $^3\text{H}$ -P<sub>4</sub> por 24 h mostró que además de testosterona, estos parásitos también producen pequeñas cantidades de androstenediol y 17-OH-P<sub>4</sub> (Figura 16).

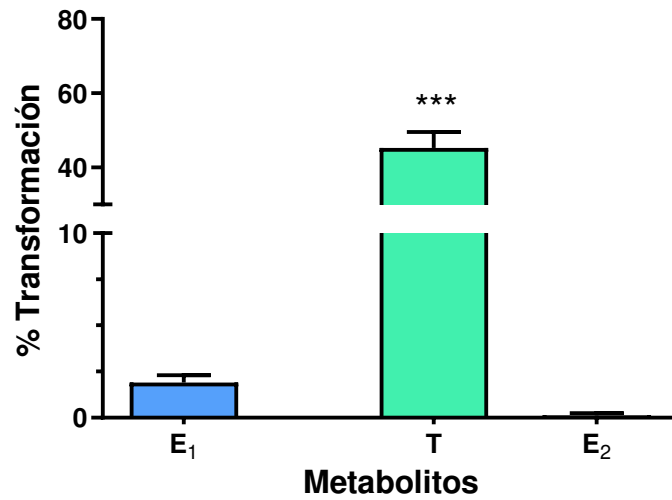


Figura 15. Síntesis de esteroides sexuales a partir de [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> por gusanos de *T. crassiceps* WFU. Las tenias se incubaron por 3 h en presencia del precursor. Media ± DE, n = 6 tenias cultivadas por separado. ANOVA seguida de Dunnett \*\* p<0.001.

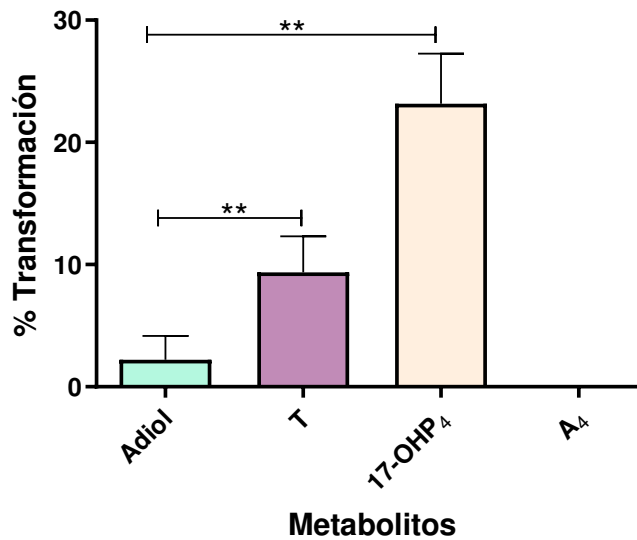


Figura 16. Síntesis de esteroides sexuales por gusanos de *T. crassiceps* WFU. Las tenias se incubaron por 24 h en presencia del precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub>. Experimento representativo de tres. Media ± DE, n = 6 tenias cultivadas por separado. ANOVA seguida de Dunnett \*\* p<0.001.



### 3.4 Síntesis de corticosteroides por gusanos de *Taenia crassiceps* WFU

La incubación de las tenias por 12, 24 o 48 h con [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> demostró que son capaces de sintetizar diferentes corticosteroides como DOC y pueden transformar en menor cantidad 11-deoxicortisol (11-DCSL). También se pudieron apreciar otros corticosteroides como cortisol (CSL) y corticosterona (CNA) (Figura 17).

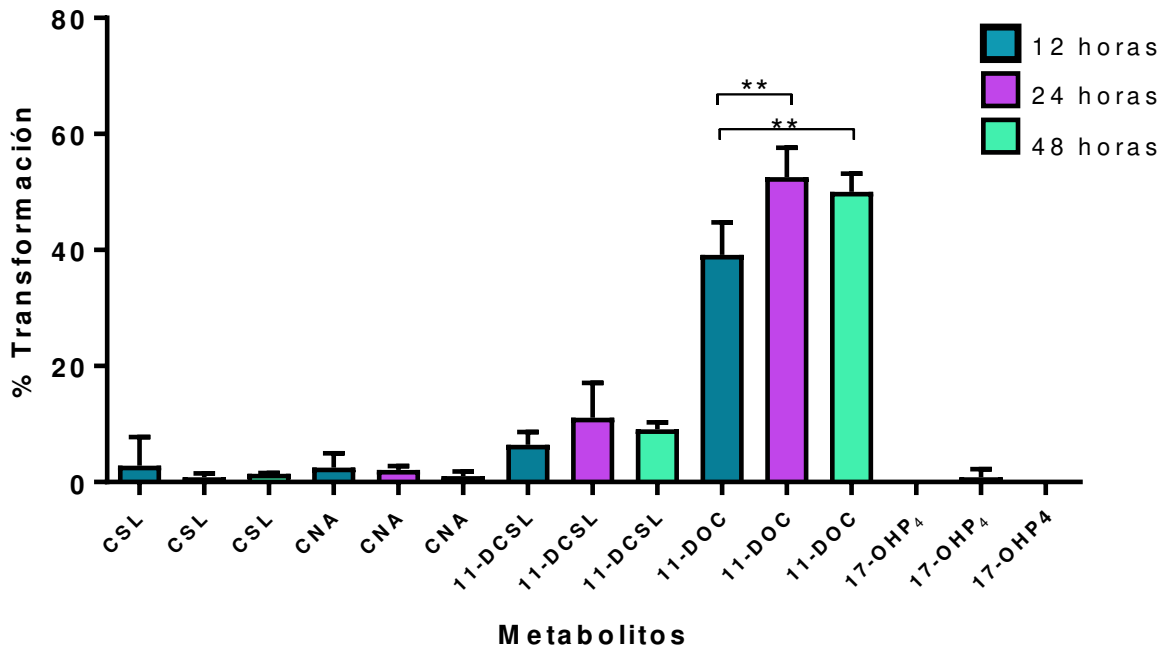


Figura 17. Curso temporal del metabolismo de [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> por gusanos de *T. crassiceps* WFU. Transformación del precursor a corticosteroides por tenias incubadas por 12, 24 o 48 h. Experimento representativo de 3 experimentos individuales. Los valores representan la media ± DE, n = 6 cultivadas por separado. \*\*Indica la diferencia estadísticamente significativa ANOVA seguida de Dunnett, \*\*p<0.001.

### 3.5 Evaluación de hormonas corticosteroides y hormonas sexuales por cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC-MS<sup>2</sup>)

Después de obtener los resultados antes mencionados en los cisticercos invaginados, evaginados y las tenias de *Taenia crassiceps* WFU utilizando la TLC, nos dimos a la tarea de investigar qué otras hormonas pudiera sintetizar el parásito mediante el uso de un método analítico de cromatografía líquida de ultra-resolución acopado a un detector de masas (UPLC-MS<sup>2</sup>). Como primer paso de esta segunda etapa, se establecieron las condiciones cromatográficas para la detección e identificación de los corticosteroides, hormonas sexuales y sus metabolitos en los medios de cultivo. Se incubaron cajas Petri con medio de cultivo más P<sub>4</sub> fría que conformaron el grupo llamado blanco; en otras cajas Petri fueron colocados cisticercos invaginados y evaginados más medio de cultivo, sin hormona, que conformaron al grupo control para evaluar el metabolismo *per se*. Por otro lado, en otras cajas Petri se colocaron los cisticercos invaginados, evaginados y tenias más medio de cultivo y 20 µM de P<sub>4</sub> fría incubándolos por 43 horas, los que conformaron el grupo tratado.

En la figura 18 y 18.1 y en la tabla 5 se presentan los patrones de ionización en modo positivo de cada uno de los estándares evaluados, mientras que en la figura 19 y 19.1 se presentan los cromatogramas típicos de los estándares obtenidos con el método propuesto y adaptado al análisis de hormonas esteroides en los diferentes estadios de *T. crassiceps* WFU (Paguigan et al., 2017). Se analizaron 26 analitos o compuestos para evaluar las hormonas precursoras e intermediarias, así como sus productos finales de la ruta  $\Delta$ 4 y  $\Delta$ 5-esteroidogénica, además de las hormonas de la ruta de los corticosteroides. De los 26 analitos evaluados, 24 estándares presentaron una buena resolución, mientras que los analitos 17-hidroxyprogesterona (17-OHP<sub>4</sub>) y la deoxicorticosterona (DOC) eluyen al mismo tiempo de retención ( $t_{ret}$ ) que fue de 4.42 y 4.42 respectivamente. El primer compuesto que eluye es el E<sub>3</sub> con un  $t_{ret}$  de 2.82 min y el último es la allopregnanolona con un  $t_{ret}$  de 5.97 min. El tiempo total para la elución de todos los compuestos fue de 10 min. A partir de corridas individuales de cada uno de los estándares se determinaron los  $t_{ret}$  UV,  $t_{ret}$  de la molécula protonada ( $m/z$ ) del ion y de la carga masa del ion molecular protonado ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>) de todos los analitos, mismos que sirvieron para construir una biblioteca digital para comprobar la identidad de los picos de cada una de las muestras (Tabla 5).

Con este método, y después de someter los medios de incubación a la extracción con éter y evaporación con sequedad, nuevamente se identificaron a los mismos metabolitos previamente reportados mediante el uso de la técnica de TLC en los tres estadios de desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU. Pero además, es importante destacar que con la nueva técnica se encontraron 13 metabolitos más que hasta estos momentos no han sido reportados en cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU ni en el parásito adulto. Su identificación se hizo por medio del  $t_{ret}$  UV,  $t_{ret}$  de la molécula protonada ( $m/z$ ) del ion y de la carga masa del ion molecular protonado ( $m/z$   $[M+H]^+$ ) (Tabla 6).

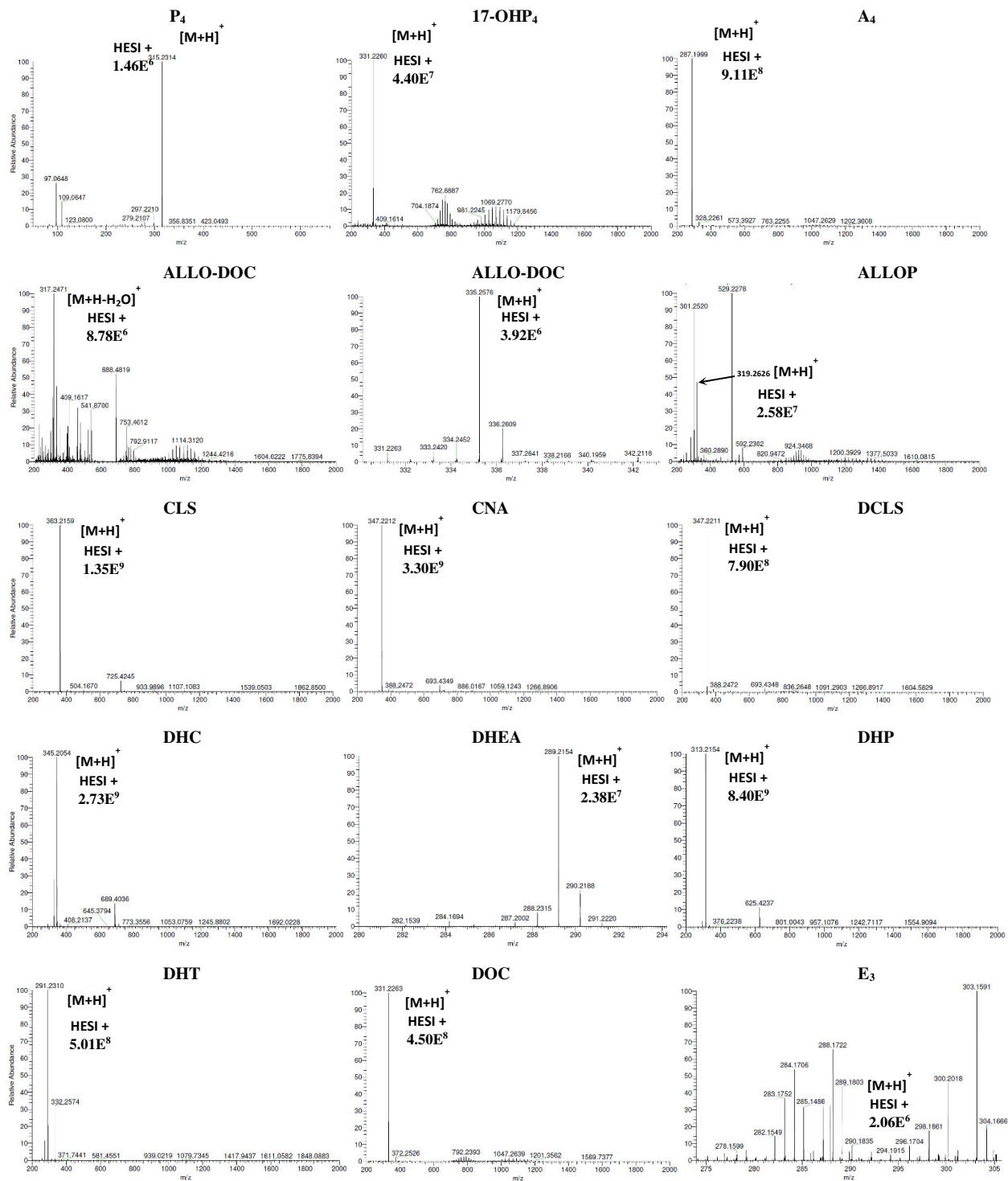


Figura 18. Patrones de fragmentación de los estándares de corticosteroides y hormonas sexuales. Se muestra el dato denominado la abundancia relativa por HESI de las hormonas progesterona (P<sub>4</sub>), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP<sub>4</sub>), Androstenediona (A<sub>4</sub>), Allotetrahydrocorticosterona (ALLO-DOC), Allopregnanolona (ALLOP), Cortisol (CLS), Corticosterona (CNA), Deoxycortisol (DCLS), Dihydrocorticosterona (DHC), Dehidroepiandrosterona (DHEA), Dihydroprogesterona (DHP), Dihydrotestosterona (DHT), Deoxycorticosterona (DOC) y Estril (E<sub>3</sub>). Ionización positiva (+). Relación carga/masa (m/z). Continúa en figura 18.1.

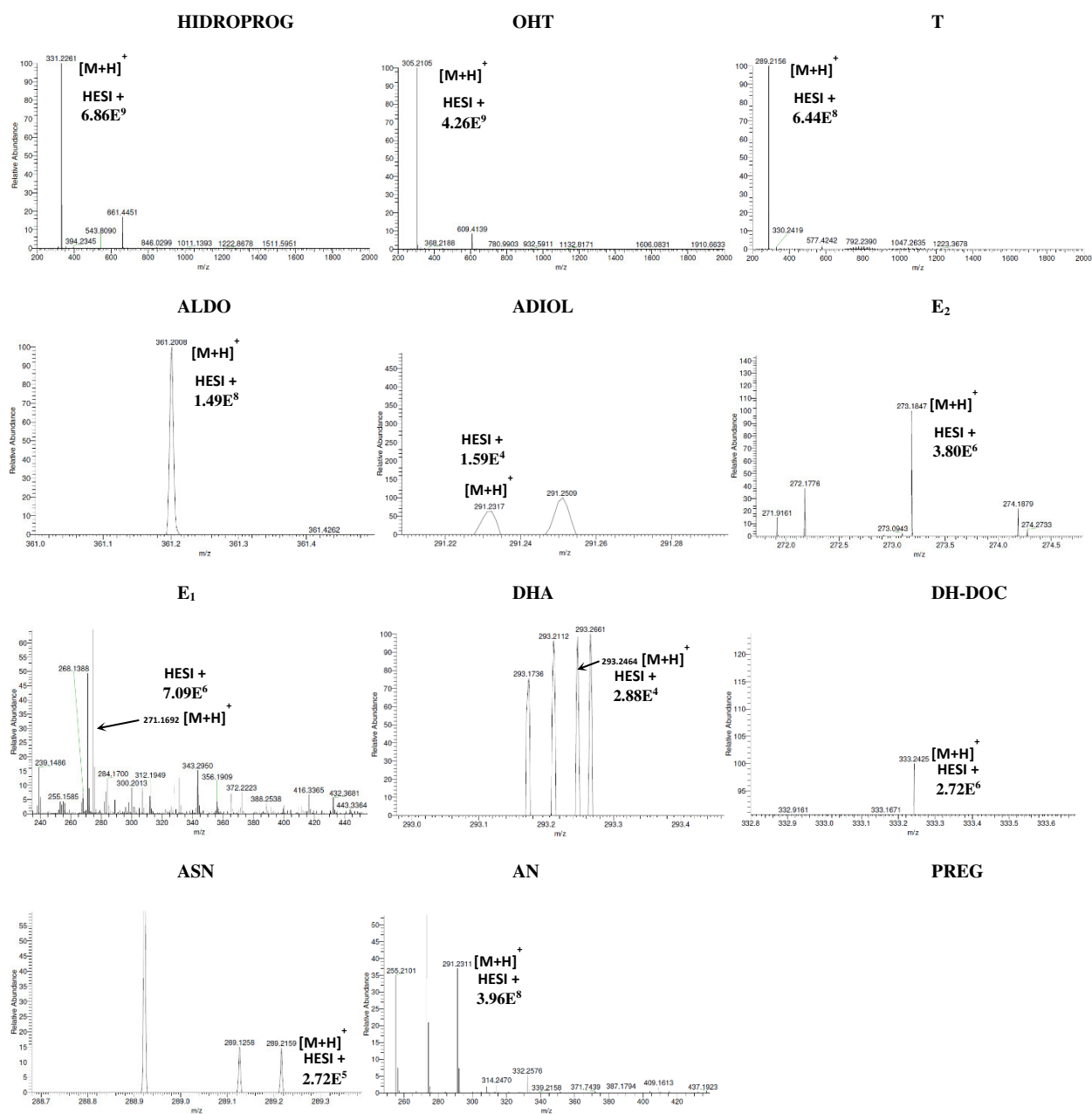


Figura 18.1 Patrones de fragmentación de los estándares de corticosteroides y hormonas sexuales. Se muestra el dato denominado abundancia relativa por HESI, de las hormonas Hidroxiprogestero (HIDROPROG), Hidroxitestosterona (OHT), Testosterona (T), Aldosterona (ALDO), Androstenediol (ADIOL), Estradiol (E<sub>2</sub>), Estrona (E<sub>1</sub>), Dihidroandrosterona (DHA), Dihidrodeoxicorticosterona (DH-DOC), Androstanediona (ASN), Androsterona (AN) y Pregnanolona (PREG). Ionización positiva (+). Relación carga/masa (m/z).

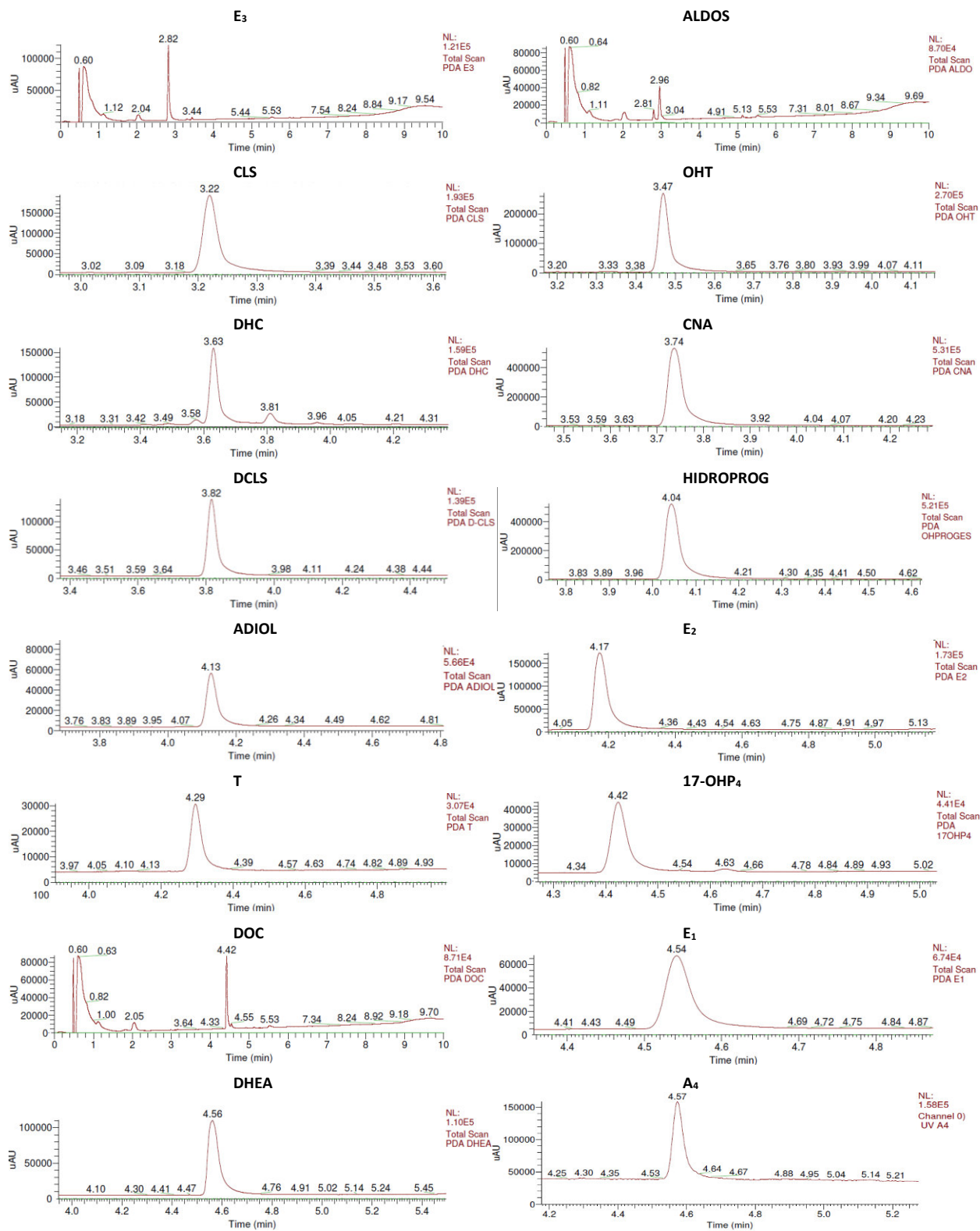


Figura 19. Cromatogramas individuales de los estándares analizados por UPLC-MS<sup>2</sup>. La secuencia de cada uno de los cromatogramas corresponde al orden de elución en los 10 minutos de corrida del método analítico. Se presenta buena resolución en 24 de los 26 analitos analizados, mientras que la hormona DOC y 17-OHP<sub>4</sub> eluyen en el mismo tiempo de 4.42 min. Continúa en figura 19.1.

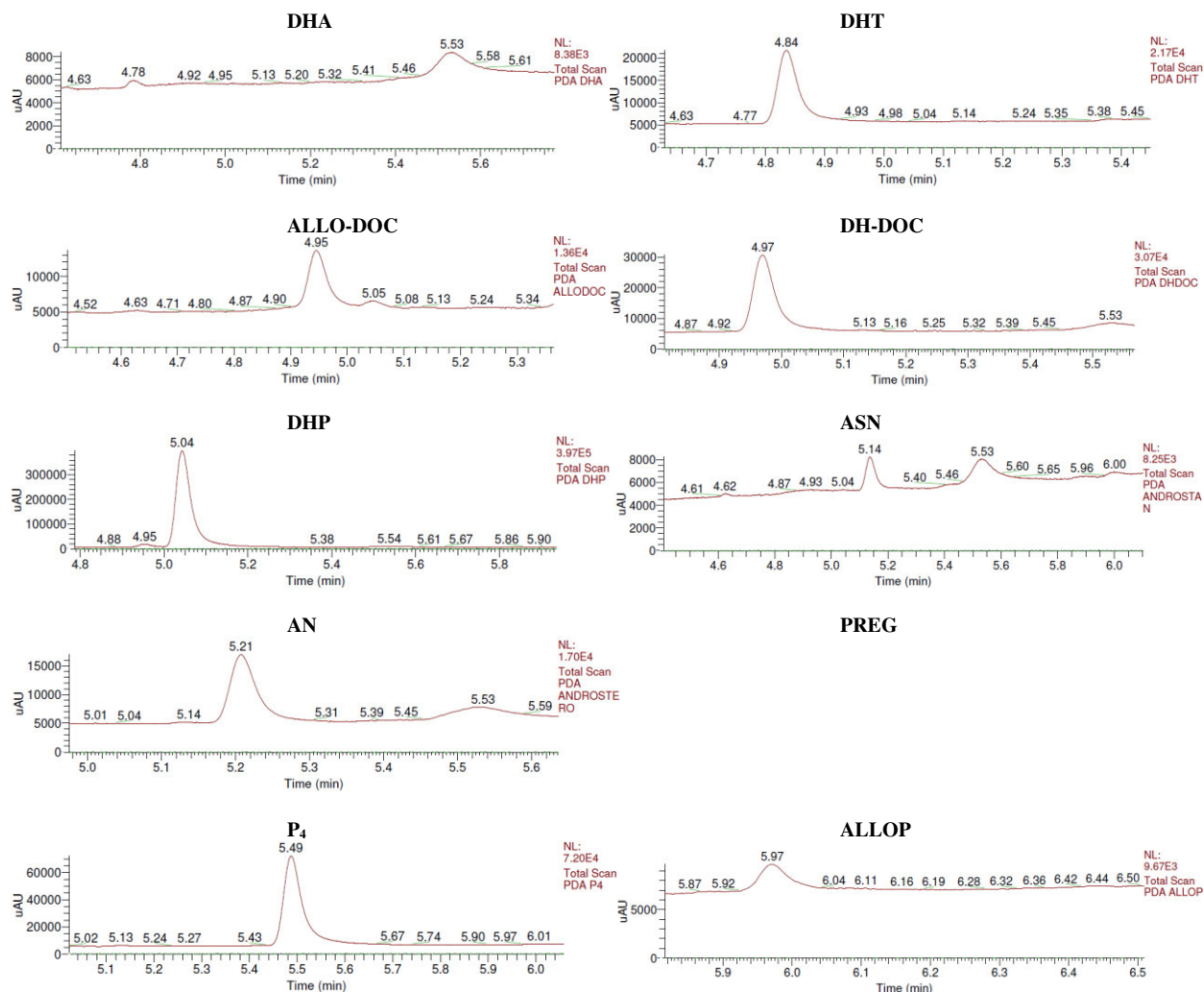


Figura 19.1 Cromatogramas individuales de los estándares analizados por UPLC-MS<sup>2</sup>. La secuencia de cada uno de las cromatogramas corresponde al orden de elución en los 10 minutos de corrida del método analítico. Presentan buena resolución en 24 de los 26 analitos analizados.

Por otro lado, es la primera vez que se reporta el metabolismo basal de cisticercos invaginados y evaginados, refiriéndose como producción basal lo que de forma *per se* secreta el cisticerco en los dos estadios larvarios sin que medie la administración de un precursor exógeno. El cisticerco invaginado secreta por sí mismo 17 hormonas (Figura 20A), de las cuales 10 se identifican por primera vez (Tabla 7), mientras que los cisticercos evaginados producen por sí solos 23 hormonas de las cuales 13 analitos producidos *per se* se describen por primera (Figura 20B) (Tabla 6 y 7).

Tabla 5. Tiempos de retención e ion molecular de los corticosteroides y hormonas sexuales.

Número	Estándar	Abreviatura	Peso Molecular	Molécula protonada m/z [M+H] <sup>+</sup>	<i>t</i> <sub>ret</sub> m/z (min)	<i>t</i> <sub>ret</sub> UV (min)
1	Estriol	E <sub>3</sub>	288.38	289.1803	2.91	2.82
2	Aldosterona	ALDO	360.44	361.2008	2.97	2.96
3	Cortisol	CLS	362.42	363.2159	3.28	3.22
4	Hidroxitestosterona	OHT	304.42	305.2105	3.54	3.47
5	Dihrocorticosterona	DHC	344.44	345.2054	3.69	3.63
6	Corticosterona	CNA	346.46	347.2212	3.80	3.74
7	Deoxicortisol	DCLS	346.46	347.2211	3.87	3.82
8	Hidroxiprogesterona	OHP	330.46	331.2261	4.16	4.04
9	Androstenediol	ADIOL	290.44	291.2317	4.16	4.13
10	Estradiol	E <sub>2</sub>	272.38	273.1847	4.25	4.17
11	Testosterona	T	288.42	289.2156	4.36	4.29
12	17-hidroxiprogesterona	17-OHP <sub>4</sub>	330.46	331.2260	4.46	4.42
13	Deoxicorticosterona	DOC	330.46	331.2263	4.48	4.42
14	Estrona	E <sub>1</sub>	270.37	271.1692	4.59	4.54
15	Dehidroepiandrosterona	DHEA	288.42	289.2154	4.62	4.56
16	Androstenediona	A <sub>4</sub>	288.42	287.1999	4.66	4.57
17	Dihidroandrosterona	DHA	292.46	293.2464	4.86	4.78
18	Dihidrotestosterona	DHT	290.44	291.2310	4.92	4.84
19	Allotetradexicorticosterona	ALLO-DOC	334.50	335.2576-317.2471	5.04	4.95
20	Dihidrodeoxicoticosterona	DH-DOC	332.48	333.2425	5.01	4.97
21	Dihidroprogesterona	DHP	312.45	313.2154	5.11	5.04
22	Androstanediona	ASN	288.42	289.2159	5.15	5.14
23	Androsterona	AN	290.44	291.2311	5.30	5.21
24	Pregnanolona	PREG	316.4	317.2471	5.32	5.27
25	Progesterona	P <sub>4</sub>	314.46	315.2314	5.56	5.49
26	Allopregnanolona	ALLOP	318.5	319.2626	6.03	5.97



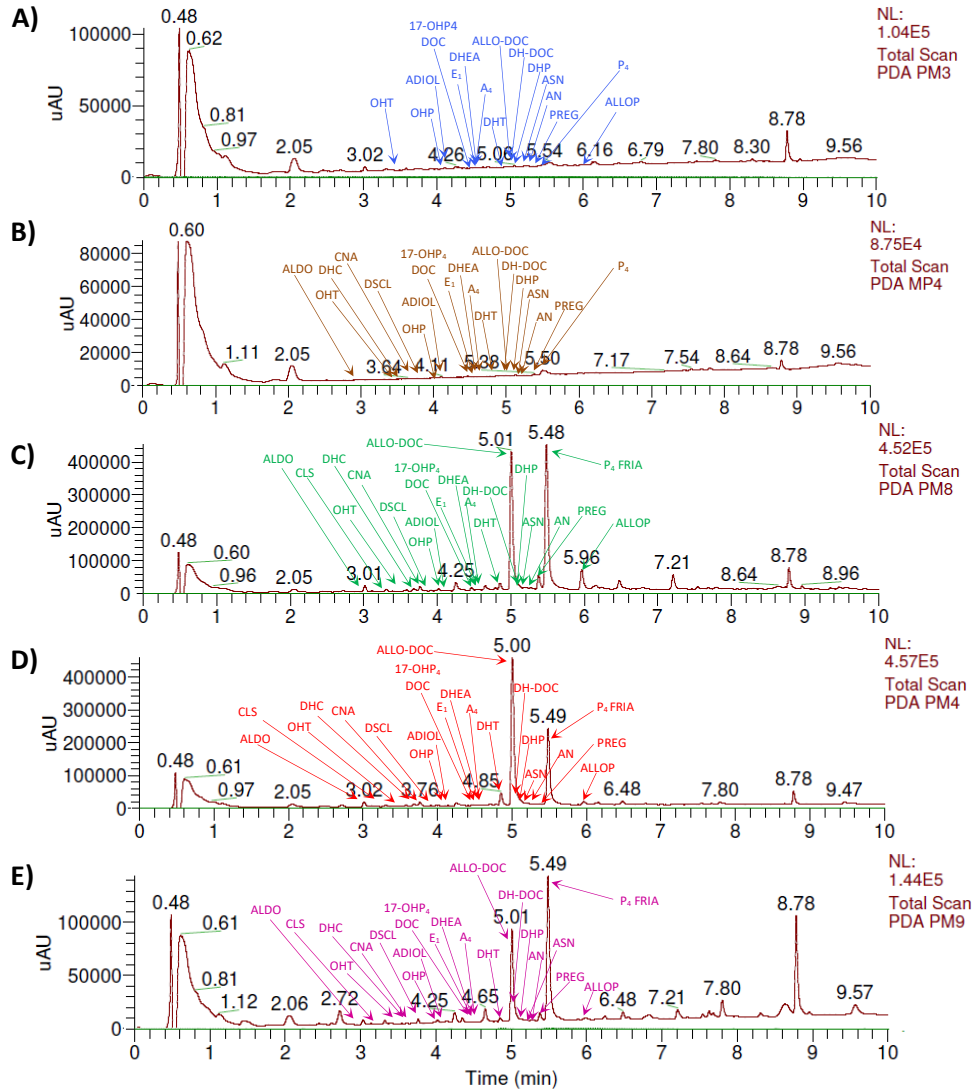


Figura 20. Cromatogramas de extractos de medios de cultivo con o sin cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU y del parásito adulto. A) Extracto de medio de cultivo de 43 horas de incubación de cisticercos invaginados (Control). B) Extracto de medio de cultivo de 43 horas de incubación de cisticercos evaginados (Control). C) Extracto de medio de cultivo de cisticercos invaginados incubados con 20  $\mu$ M de hormona fría ( $P_4$ ) durante 43 horas. D) Extracto de medio de cultivo de cisticercos evaginados incubados con 20  $\mu$ M de hormona fría ( $P_4$ ) durante 43 horas. E) Extracto de medio de cultivo del parásito adulto de *Taenia crassiceps* WFU incubados con 20  $\mu$ M de hormona fría ( $P_4$ ) durante 43 horas. Progesterona ( $P_4$ ), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP<sub>4</sub>), Androstenediona (A<sub>4</sub>), Allotetradecoxicorticosterona (ALLO-DOC), Allopregnanolona (ALLOP), Cortisol (CLS), Corticosterona (CNA), Deoxicortisol (DCLS), Dihidrocorticosterona (DHC), Dehidroepiandrosterona (DHEA), Dihidroprogesterona (DHP), Dihidrotestosterona (DHT), Deoxicorticosterona (DOC), Hidroxiprogesterona (OHP), Hidroxitestosterona (OHT), Testosterona (T), Aldosterona (ALDO), Androstenediol (ADIOL), Estradiol (E<sub>2</sub>), Estrona (E<sub>1</sub>), Dihidroandrosterona (DHA), Dihidrodeoxicorticosterona (DH-DOC), Androstanediona (ASN), Androsterona (AN) y Pregnanolona (PREG).

Tabla 6. Comparación del perfil metabólico en cisticercos invaginados y evaginados sin estimulación con P<sub>4</sub>, vs cisticercos estimulados con P<sub>4</sub> durante 43 horas y el parásito adulto de *Taenia crassiceps* WFU durante el mismo tiempo.

#	Estandar	Abreviatura	Cisticercos invaginados (control)	Cisticercos evaginados (control)	Cisticercos invaginados (P <sub>4</sub> )	Cisticercos evaginados (P <sub>4</sub> )	<i>Taenia crassiceps</i> WFU (P <sub>4</sub> )
1	Estriol	E <sub>3</sub>	----	----	----	----	----
2	Aldosterona	ALDO		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
3	Cortisol	CLS			SÍ	SÍ	SÍ
4	Hidroxitestosterona	OHT	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
5	Dihidrocorticosterona	DHC		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
6	Corticosterona	CNA		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
7	Deoxicortisol	DCLS		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
8	Hidroxiprogesterona	OHP	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
9	Androstenediol	ADIOL	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
10	Estradiol	E <sub>2</sub>		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
11	Testosterona	T		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
12	17-hidroxiprogesterona	17-OHP <sub>4</sub>	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
13	Deoxicorticosterona	DOC	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
14	Estrona	E <sub>1</sub>	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
15	Dehidroepiandrosterona	DHEA	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
16	Androstenediona	A <sub>4</sub>	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
17	Dihidroandrosterona	DHA		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
18	Dihidrotestosterona	DHT	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
19	Allotetradexicorticosterona	ALLO-DOC	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
20	Dihidrodeoxicorticosterona	DH-DOC	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
21	Dihidroprogesterona	DHP	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
22	Androstanediona	ASN	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
23	Androsterona	AN	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
24	Pregnanolona	PREG	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
25	Progesterona	P <sub>4</sub>	SÍ	SÍ	Hormona fría	Hormona fría	Hormona fría
26	Allopregnanolona	ALLOP	SÍ		SÍ	SÍ	SÍ

Tabla 7. Metabolitos nuevos secretados de forma *per se* por los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU. Ambos estadios larvarios del cisticerco secretan hormonas de forma basal, de las cuales algunas no han sido reportadas hasta estos momentos.

Cisticercos invaginados	Cisticercos evaginados
1.- Progesterona	1.- Progesterona
2.- Pregnanolona	2.- Pregnanolona
3.- Dihidroprogesterona	3.- Dihidroprogesterona
4.- Allopregnanolona	4.- Dihidrocorticosterona
5.- Dihidrodeoxicorticosterona	5.- Dihidrodeoxicorticosterona
6.- Allotetrahydrodesoxicorticosterona	6.- Allotetrahydrodesoxicorticosterona
7.- Androstanediona	7.- Androstanediona
8.- Androsterona	8.- Androsterona
9.- Dihidrottestosterona	9.- Dihidrottestosterona
10.-Hidroxitestosterona	10.- Hidroxitestosterona
	11.- Dihidroandrosterona
	12.- Dihidrocorticosterona
	13.- Aldosterona

Otro dato importante a destacar, es que de forma *per se*, los cisticercos invaginados sintetizan testosterona (T) y el andrógeno más potente la dihidrottestosterona (DHT) que no había sido reportado previamente, mientras que en los cisticercos evaginados no se encontró a la Testosterona, pero sí de DHT; esta diferencia en el metabolismo basal no ha sido descrita previamente.

Por otro lado, cuando los cisticercos invaginados, evaginados y las tenias fueron incubados con P<sub>4</sub> fría, para potenciar el metabolismo, los parásitos produjeron 24 hormonas, y de la misma manera que sucedió en el metabolismo *per se*, se detectaron hormonas pertenecientes al grupo de los mineralocorticoides como 11-deoxicorticosterona (DOC) y corticosterona (CNA) que ya habíamos reportado previamente por TLC en la síntesis hormonal de los cisticercos y gusano adulto de la *Taenia crassiceps* WFU. Pero ahora fueron identificadas otras hormonas producto del metabolismo de DOC y de la CNA como dihidrodeoxicorticosterona (DH-DOC), allotetrahydrodesoxicorticosterona (ALLO-DOC), dihidrocorticosterona (DHC) y Aldosterona (ALDO), hormonas que no habían sido descritas en el metabolismo de las tenias y cisticercos. Observamos que potenciando el metabolismo con P<sub>4</sub> fría, por la vía de síntesis de glucocorticoides, en los cisticercos invaginados, evaginados y en la tenia producen 17 $\alpha$ -OH-progesterone, 11-deoxicortisol y cortisol, que reportamos previamente usando TLC. Por la vía clásica  $\Delta$ 4 y después de potenciar el metabolismo con P<sub>4</sub> fría los cisticercos invaginados, evaginados y los gusanos

produjeron androstenediona ( $A_4$ ) y testosterona (T), así como metabolitos producto del metabolismo de estas hormonas. Por parte de la  $A_4$ , se encontró androstenediona (ASN), androsterona (AN) y el estrógeno Estrona ( $E_1$ ), y por el lado de la T, los metabolitos identificados a partir de ella fueron dihidrotestosterona (DHT), 17-dihidroandrosterona (DHA),  $11\beta$  – hidroxitestosterona (OHT) y el estrógeno estradiol ( $E_2$ ). Mientras que por la vía clásica  $\Delta 5$ , y después de incubar con  $P_4$  fría los cisticercos invaginados, evaginados y los gusanos sintetizaron dehidroepiandrosterone (DHEA) y androstenediol (ADIOL). Por otro lado, la  $P_4$  fue metabolizada a otras hormonas no descritas hasta estos momentos en parásitos, las hormonas se clasifican como neuroesteroides, como dihidroprogesterone (DHP), Pregnanolona (PREG) y Allopregnanolona (ALLOP) (Figura 20 y Tabla 6).

## 4 DISCUSIÓN

*Taenia crassiceps* WFU es un modelo biológico interesante porque permite estudiar las características de los diferentes estadios de desarrollo del parásito. Se pueden obtener abundantes metacestodos invaginados que tienen la capacidad de reproducirse por gemación en la cavidad abdominal de ratonas infectadas. Estos cisticercos tienen un escolex invaginado que puede evaginar bajo ciertas condiciones de cultivo y al ser administrados a hamsters pueden dar lugar a gusanos adultos (Zubarian and Willms, 2008). Nuestro laboratorio ha investigado la capacidad de esteroidogénesis de los cisticercos (Romano *et al.*, 2015), pero no se habían realizado estudios comparando la evolución de estas características en diversos estadios de desarrollo.

Se ha demostrado ampliamente en mamíferos y aves que la síntesis de esteroides por gonadas y suprarrenales está relacionada al estadio de desarrollo de los organismos; estas hormonas son fundamentales y se conoce bien que regulan las fases del desarrollo reproductivo. Sin embargo, se sabe poco sobre la síntesis y el impacto en el desarrollo de los invertebrados (Lafon, 2000), principalmente se ha estudiado en insectos (Swevers *et al.*, 1991; De Loof *et al.*, 2000).

Varios estudios enfatizan la importancia de los esteroides sexuales sobre el desarrollo de invertebrados. El papel de los estrógenos en el desarrollo del gusano de seda fue revisado por Das en el 2016. Se conoce también que el estradiol incrementa el número de células germinales en *Caenorhabditis elegans* (hoshi *et al.*, 2003) y que los esteroides sexuales influyen sobre la fertilidad del *Schistosoma mansoni* (Morrison *et al.*, 1986) al igual que la progesterona. Mientras que la progesterona, andrógenos y ecdisona incrementan el largo del parásito *Ascaris suum* y la primera estimula la evaginación de los cisticercos de *T. solium* (Fleming, 1985; Escobedo *et al.*, 2010). También se ha demostrado que P<sub>4</sub>, estradiol y testosterona aumenta el número de gametocitos de *Plasmodium falciparum* (Lingnau *et al.*, 1993) y que el agregado de testosterona al medio de cultivo aumenta la proliferación de cisticercos de *T. crassiceps* ORF (Romano *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que la secreción de andrógenos por el testículo fetal humano está relacionada con la diferenciación sexual de los ductos, así como de los genitales externos (Wilson and Davies, 2007). En el presente trabajo encontramos que los cisticercos evaginados de *T.*

*crassiceps* WFU sintetizan principalmente cantidades de testosterona lo que podría ser importante para el desarrollo de los órganos sexuales de la tenia. Asimismo, encontramos que el gusano sintetiza también abundante testosterona y sugiere que podría tener un papel relevante en el desarrollo de los órganos sexuales de las proglótidos. En este sentido, en *Caenorhabditis elegans* se demostró que aumenta la actividad de la enzima 17 $\beta$ -HSD, involucrada en la síntesis de esteroides sexuales, y una disminución de esta enzima reduce el crecimiento de la forma juvenil de esta especie (Desnoyers *et al.*, 2007). Por otro lado, los ensayos realizados en el laboratorio con timidina tritiada en presencia de diferentes dosis de flutamida, un antagonista del receptor de andrógenos, afectó significativamente la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina a cisticercos de *T. crassiceps* ORF, lo que sugiere que necesitan de los andrógenos para la proliferación celular y su desarrollo (Romano *et al.*, 2003).

La abundante síntesis de testosterona a partir de [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> que se encontró en los cisticercos evaginados podría explicarse por la diferenciación de células madre localizadas en el escólex lo que llevaría a un aumento de las células que expresan enzimas esteroideogénicas. Las células madre se han descrito en el escólex de cisticercos evaginados y en tenias (Merchant *et al.*, 1997; Willms *et al.*, 2001), asimismo se han descrito células madre en el escolex de otro parásito, *Echinococcus multilocularis* y *E. granulosus* (Reuter and Kreshchenko, 2004). Las células derivadas del cuello de cisticercos evaginados y tenias de *T. solium* proliferan continuamente, se diferencian y migran al tegumento donde dan origen a diferentes tipos celulares (Merchant *et al.*, 1997). Por otra parte, Guftaffson en 1990 demostró que algunas células madre de *Diphyllobothium dendriticum* se diferencia a células gonadales y otras a células somáticas.

Se ha encontrado además, que el estado “on/off” de algunos genes regula diferentes funciones durante el desarrollo de parásitos, como es el caso en *Echinococcus* donde algunos receptores que son producto de genes de receptores nucleares, están abundantemente expresados sólo en el estadio de metacestode (Brehm and Kosiol, 2014).

En este trabajo se observó que el estadio evolutivo influye en la síntesis de corticosteroides por los cisticercos y gusanos de *T. crassiceps* WFU. Los resultados del presente estudio muestran que la síntesis de DOC a las 24 h de incubación con P<sub>4</sub> por cisticercos evaginados duplica a la que producen en el estadio invaginado. Las tenias también producen abundantes cantidades de DOC. Se ha reportado que en vertebrados la DOC es un potente mineralocorticoide

que también funciona como glucocorticoide (Brookes *et al*, 2012). Se conoce que los cisticercos son altamente dependientes de glucosa, por lo que la DOC podría aumentar la disponibilidad de glucosa a través de la inducción de la gluconeogénesis por el mineralocorticoide. Por otra parte, se sabe que los cisticercos de *T. solium* expresan Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (Willms y cols, 2004) y nosotros encontramos que los cisticercos de *T. crassiceps* WFU también la expresan (Patricio *et al.*, 2014, Congreso 27<sup>th</sup> Conference of European Comparative Endocrinologists)<sup>1</sup>. Se conoce que 11-Deoxicorticosterona modula a la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en mamíferos y peces y por tanto este mineralocorticoide podría contribuir a la osmoregulación en los diferentes estadios de desarrollo del parásito.

Los resultados de este proyecto muestran que los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU evaginados son metabólicamente más activos que los invaginados en cuanto a la capacidad de transformar el precursor [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> a glucocorticoides y mineralocorticoides tales como 11-desoxicortisol, DOC y corticosterona. Este trabajo muestra por primera vez que la etapa en el desarrollo del cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU influye en la síntesis de los corticosteroides.

A pesar de que se conoce en profundidad la función de los MC en mamíferos y aves, la información disponible es más escasa en peces e invertebrados. La endocrinología clásica señala que los corticosteroides como el cortisol y la aldosterona ejercen una amplia gama de funciones fisiológicas en el metabolismo, el estrés, la osmoregulación y la función inmune, a través de dos receptores, para glucocorticoides (GR1 y GR2) y mineralocorticoides (MR). La función general osmoregulatoria del cortisol y la aldosterona está bien establecida en los teleósteos y en células renales, respectivamente (McCormick *et al.*, 2008). Sin embargo, la función de la DOC es en gran parte desconocida. La alta homología estructural y molecular con la hormona aldosterona en mamíferos, inmediatamente sugiere que tendría una función de mineralocorticoide en peces y posiblemente también en los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU.

Además, el metabolismo de [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> hacia la síntesis de hormonas sexuales muestra que a las 6 horas de incubación con el precursor tritiado los cisticercos invaginados sintetizan más estradiol y estrona, y se observó una tendencia a la disminución del porcentaje de producción conforme pasa el tiempo, alcanzando los niveles más bajos en la síntesis de estrona a las 43 horas

---

<sup>1</sup> 27th Conference of European Comparative Endocrinologists. Rennes (France) August 25-29, 2014. Memorias: Campus de Beaulieu of the University of Rennes. 195 p.

en ambos grupos. Este aumento en la producción de estrógenos en las primeras horas de cultivo se puede deber a que el cisticerco necesita modular el microambiente para la proliferación, con abundancia de estrógenos, ya que se ha propuesto por Larralde y col (1995), que la susceptibilidad a la infección por *Taenia crassiceps* ORF en ratones se asocia a alteraciones en la producción de los esteroides sexuales. En dichos experimentos y los de otros autores se observó que las hembras se infectan masivamente en periodos cortos y los machos requieren de periodos más largos. La colonización masiva tardía de ratones macho por el cisticerco, sugiere que hubo cambios en las hormonas sexuales del huésped, inducidos por el parásito. En dicho trabajo se especuló que el incremento lento en el número de parásitos en machos se asocia con un aumento en los niveles de estrógenos en la sangre del huésped y un decremento de la testosterona. El hecho de que los cisticercos invaginados fueran los que producen al inicio de incubación los niveles más altos de hormonas estrogénicas podría relacionarse con la necesidad de un ambiente rico en estrógenos para su desarrollo como el que se encuentra en la hembra.

Por otro lado, a las 6 h de incubación con el precursor [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> se sintetiza mayoritariamente testosterona en los cisticercos evaginados, y existe una clara evidencia que conforme transcurre el tiempo de incubación aumenta considerablemente la producción de este andrógeno en ambos grupos. Este hecho podría deberse a lo que ocurre en varios organismos que necesitan de andrógenos para el crecimiento y diferenciación durante el desarrollo fetal, y asimismo puede explicar porque en los parásitos aumenta la testosterona a las 24 y 43 horas de incubación con el precursor, ya que se encuentran en un estado de transición de desarrollo pasando de invaginados a evaginados, donde el escólex empieza a evaginar. Además, en nuestro grupo se observó que los cisticercos de *Taenia crassiceps* ORF que carecen de escólex también sintetizan testosterona a partir del precursor [<sup>3</sup>H]-A<sub>4</sub> (Gómez *et al.*, 2000), aunque a diferencia del presente estudio, nosotros utilizamos ahora cisticercos WFU que sí cuentan con escólex lo que permite clasificarlos de acuerdo a su desarrollo. Por otro lado, Romano y col., 2003, especularon que la testosterona podría estar involucrada en el desarrollo y/o diferenciación de las gónadas de *Taenia crassiceps*, ya que es bien sabido que la testosterona está involucrada en el desarrollo de las gónadas de mamíferos y aves. Por otro lado, los ensayos con timidina tritiada en presencia de diferentes dosis de flutamida que es un antagonista del receptor de andrógenos, afectó significativamente la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en los parásitos y a su vez el crecimiento del parásito, lo que sugiere que necesitan de los andrógenos para su desarrollo (Romano *et al.*, 2003).



Por otro lado, la gran variedad de hormonas sintetizadas por los cisticercos y tenias hasta ahora no descritas en el metabolismo de los cisticercos nos da una clara idea de que tienen enzimas que metabolizan las diferentes hormonas como son la  $5\beta$ -reductasa implicada en el metabolismo de la progesterona que forma productos como la dihidroprogesterona metabolito encontrado e identificado por UPLC-MS<sup>2</sup> en los cisticercos y en la tenia. Otra de las enzimas que pueden expresar es la  $3\alpha$ -HSD que está implicada en la transformación de la dihidroprogesterona a neuroesteroides como pregnanolona, allopregnanolona, y allotetrahidrodesoxicorticosterona a partir de su precursor dihidrodeoxicorticosterona, y en la transformación de dihidrotestosterona a 17-dihidroandrosterona, y de androstanediona a su metabolito androsterona, neuroesteroide que parece tener un papel importante en el estrés en humanos (Servatius *et al.*, 2016). Uno de los hallazgos interesantes de nuestro trabajo es la producción *per se* de allopregnanolona en los cisticercos invaginados, que no se observó en los cisticercos evaginados. Es importante destacar que cuando se potencia el metabolismo por la adición de 20  $\mu$ M de P4 fría, también los cisticercos evaginados y gusanos son capaces de sintetizar allopregnanolona. Estos resultados plantean la necesidad de investigar cuál es la función de dicha hormona en el parásito, en la relación huésped-parásito, e incluso el papel que podría tener en la neurocisticercosis. Hasta estos momentos no hemos encontrado otro reporte sobre la producción de neuroesteroides en invertebrados, ni de la función que pudieran tener en estos organismos si se los incubara con estos esteroides. Se ha descrito la producción de estas hormonas en el sistema nervioso central de vertebrados, principalmente en mamíferos, anfibios, aves y peces, donde este esteroide actúa como un modulador positivo endógeno del receptor GABA<sub>A</sub> (Hosie *et al.*, 2006; Guennoum *et al.*, 2015) alterando las emociones y participa en la etiología de algunos desórdenes efectivos como la depresión y la ansiedad (Majewska, 1992).

Otra de las enzimas que puede tener el cisticerco y el gusano adulto es la  $5\alpha$ -reductasa que participa en la conversión de la deoxicorticosterona, que fue el metabolito mayoritario evaluado por TLC, hacia dihidrodeoxicorticosterona. Esta enzima también transforma corticosterona hacia dihidrocorticosterona, y participa en la transformación de la testosterona y androstanediona hacia dihidrotestosterona (DHT) y androstanediona respectivamente lo que sugiere su presencia activa en los parásitos de este estudio. Con base a estos hallazgos se sugiere la existencia de la siguiente vía de transformación en los cisticercos y el gusano de *Taenia crassiceps* WFU (Figura 21).

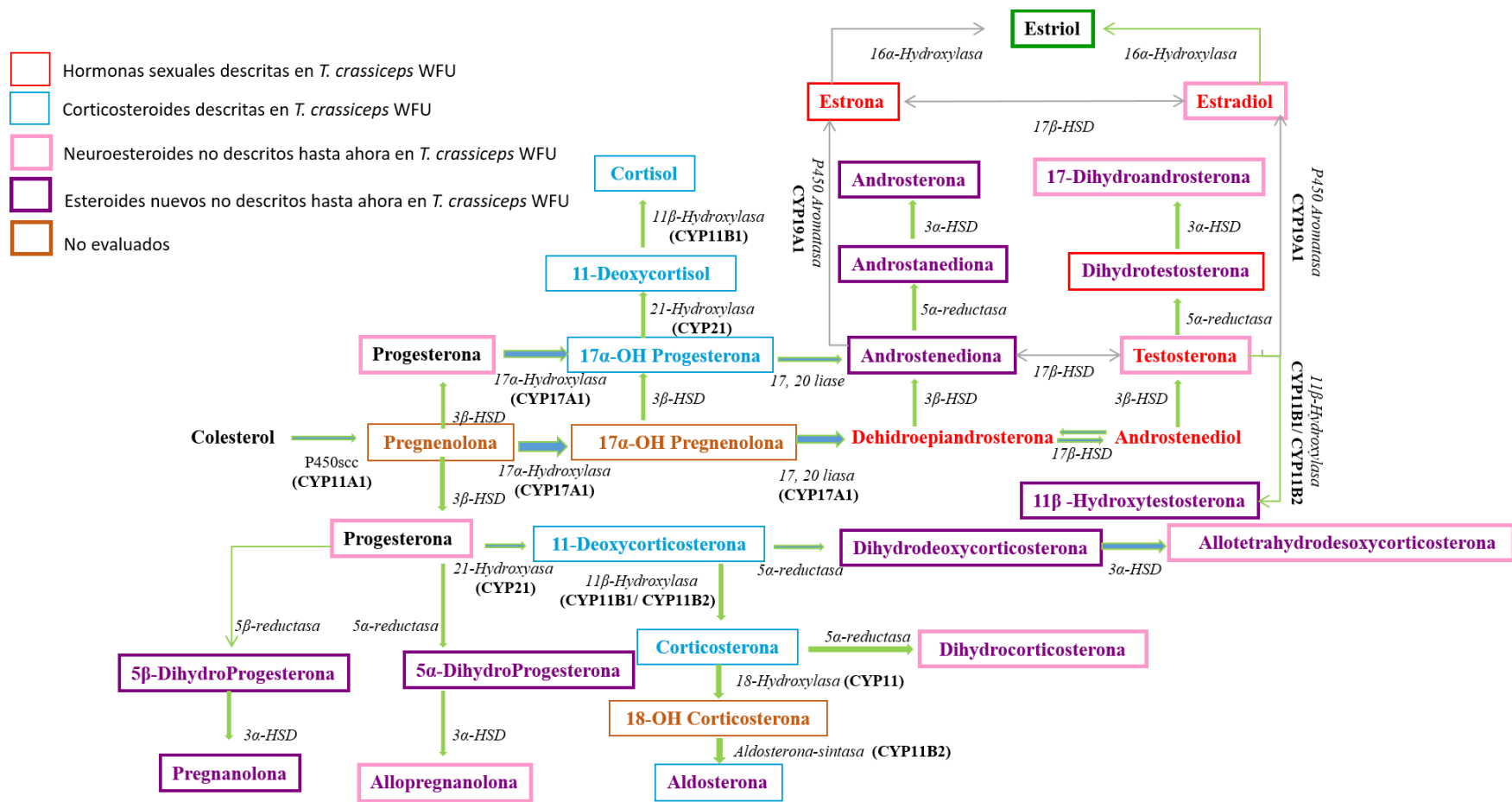


Figura 21. Resumen que propone las vías esteroidogénicas de *T. crassiceps* WFU. Se muestran los 5 grupos de hormonas secretados por los cisticercos y gusanos. El grupo de hormonas corticosteroides (mineralocorticoides y glucocorticoides) está indicado con la letra o recuadro azul, mientras que las hormonas sexuales están indicadas con la letra o recuadro rojo, y los neuroesteroides con el recuadro rosa. Los esteroides nuevos descritos en este trabajo están anotados con la letra o recuadro violeta, mientras que las hormonas no evaluadas están en recuadro y letra marrón.

El descubrimiento de una llamada "puerta trasera" en la síntesis de esteroides (Kamrath et al., 2012), que de acuerdo a nuestros resultados está presente en los cisticercos y gusanos *T. crassiceps* WFU, sugiere que en estos organismos los andrógenos también podrían sintetizarse a partir de corticosteroides, lo que aumentaría las vías dedicadas a sintetizar hormonas, que en última instancia servirían para el desarrollo del cisticerco, o bien podrían modificar la relación huésped-parásito y también participar en procesos patológicos como la neurocisticercosis. La participación de una ruta alternativa a la "clásica" en la síntesis de hormonas esteroideas que permite sintetizar andrógenos desde la vía de los corticosteroides (Kamrath et al., 2012; Pretorius et al., 2017), sugiere que los productos de  $5\alpha$ -reductasa serían posibles precursores de andrógenos o estrógenos, ya sea a través de los derivados de progesterona, o de la misma testosterona, un ejemplo de esto es la androstanodiona (Kamrath et al., 2012; Ishikawa et al., 2016). Las hormonas detectadas por UPLC/MS2 nos dan una clara idea de que el parásito puede sintetizar DHEA a partir de  $P_4$  en una vía alterna a la clásica, por lo que se propone que estas puertas traseras están presentes en el cisticerco y en el gusano de *Taenia crassiceps* WFU (Figura 22).

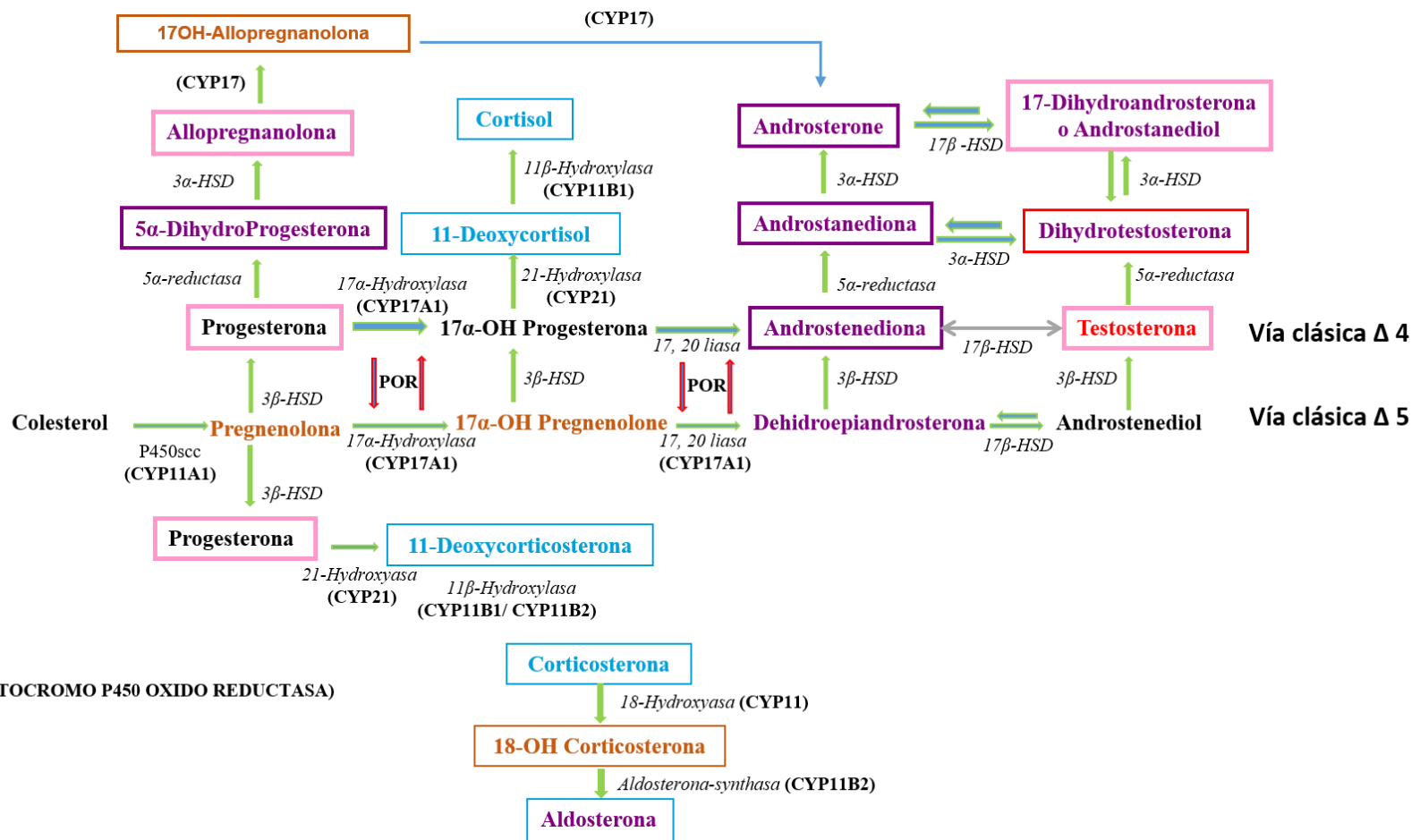


Figura 22. Puertas traseras de la síntesis de DHT y DHEA en el cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU. La ruta alternativa a la "clásica" en la síntesis de hormonas esteroides sugiere que desde la vía de los corticosteroides se pueden sintetizar el potente andrógeno DHT sin pasar por la testosterona, y que a partir de Progesterona puede formarse DHEA por acción de la POR (Citocromo P450 óxido reductasa).

## 5 CONCLUSIONES

- ✓ Los resultados de este estudio muestran por primera vez que el estadio de desarrollo de los cisticercos presenta perfiles esteroideos distintos.
- ✓ Se demuestra por primera vez que el gusano de *Taenia crassiceps* WFU puede sintetizar esteroides sexuales a partir de precursores tritiados.
- ✓ Los resultados sugieren que los cisticercos invaginados y evaginados, así como el gusano de *Taenia crassiceps* WFU tienen enzimas que involucran las vías de biosíntesis  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ .
- ✓ Se describe por primera vez que los cisticercos invaginados, evaginados y el gusano de *Taenia crassiceps* WFU sintetizan andrógenos más activos que la misma testosterona, como dihidrotestosterona (DHT), lo que sugiere la posibilidad de que el parásito tenga la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.
- ✓ Mediante el uso de técnicas analíticas como el UPLC/MS<sup>2</sup> se describe por primera vez la capacidad que tienen los cisticercos invaginados, evaginados y el gusano, de biotransformación *per se*, es decir sin aporte de precursores exógenos.
- ✓ Mediante el uso de técnicas analíticas como UPLC/MS<sup>2</sup> se describe por primera vez la capacidad que tienen los cisticercos invaginados, evaginados y el gusano de *Taenia crassiceps* WFU de sintetizar neuroesteroides como: dihidroandrosterona (DHA), allopregnanolona (ALLOP) y allotetradexocorticosterona (ALLO-DOC) a partir de P<sub>4</sub> fría, lo que además sugiere la posibilidad de que el parásito tenga la enzima 3 $\alpha$ -HSD.
- ✓ Se demuestra por primera vez que los cisticercos y el gusano de *Taenia crassiceps* WFU tienen una puerta trasera de síntesis de andrógenos a partir de corticoides y de progesterona.

## 6 PERSPECTIVAS

- ✓ Validar el método de UPLC/MS<sup>2</sup> para determinar los límites de detección y de cuantificación, así como la reproducibilidad, exactitud y precisión.
- ✓ Cuantificar las concentraciones de producción de las hormonas detectadas por UPLC/MS<sup>2</sup> en los tres estadios de desarrollo de *Taenia crassiceps* WFU.
- ✓ Caracterizar y clonar las enzimas que participan en la biotransformación de esteroides sexuales, corticosteroides y neuroesteroides descritos.
- ✓ Mediante inmunohistoquímica localizar *in situ* en cisticercos y tenias las enzimas que participan en la biotransformación de esteroides.
- ✓ Comprobar y detectar en *T. solium* las mismas hormonas descritas en *Taenia crassiceps* WFU.
- ✓ Estudiar la función de las nuevas hormonas en los diferentes estadios de desarrollo en *Taenia Crassiceps* WFU y *T. solium*.
- ✓ Estudiar la función de las nuevas hormonas en la relación huésped-parasito en *Taenia Crassiceps* WFU y *T. solium*.
- ✓ Estudiar la función de las nuevas hormonas en la neurocisticercos por *Taenia solium*.
- ✓ Probar inhibidores de las enzimas 5 $\alpha$ -reductasa, 3 $\alpha$ -HSD y de los citocromos sobre la viabilidad y desarrollo de *Taenia crassiceps* WFU en busca de blancos terapéuticos.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- ACEVES-RAMOS, A., DE LA TORRE, P., HINOJOSA, L., PONCE, A., GARCÍA-VILLEGAS, R., LACLETTE, J. P., BOBES, R. J. & ROMANO, M. C. 2014. Cloning, characterization and functional expression of *Taenia solium* 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *General and Comparative Endocrinology*, 203, 186-192.
- ACEVES-RAMOS, A., VALDEZ, R. A., GAONA, B., WILLMS, K. & ROMANO, M. C. 2013. Steroid synthesis by *Taenia crassiceps* WFU cysticerci is regulated by enzyme inhibitors. *General and Comparative Endocrinology*, 188, 212-217.
- AKUNNE HC, ZOSKI KT, WHETZEL SZ, CORDON JJ, BRANDON RM, ROMAN F, ET AL. 2001. Neuropharmacological profile of a selective sigma ligand, igmesine: a potential antidepressant. *Neuropharmacology* 41: 138-49.
- AKWA Y, BAULIEU EE. 1999. Neurosteroids: behavioral aspects and physiological implications. *J Soc Biol* 193: 293-8.
- BARON, R., NEFF, L., ROY, C., BOISVERT, A. & CAPLAN, M. 1986. Evidence for a high and specific concentration of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. *Cell*, 46, 311-20.
- BAULIEU EE & ROBEL P. 1990. Neurosteroids: a new brain function? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37 395-403.
- BAULIEU EE. 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23: 963-87.
- BEGUIN, P., WANG, X., FIRSOV, D., PUOTI, A., CLAEYS, D., HORISBERGER, J. D. & GEERING, K. 1997. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J*, 16, 4250-60.
- BELELLI D, LAMBERT JJ. 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6: 565-75.
- BELELLI D, PISTIS M, PETERS JA, LAMBERT JJ. 1999. The interaction of general anaesthetics and neurosteroids with GABA(A) and glycine receptors. *Neurochem Int*; 34: 447-52.
- BERGERON R, DE MONTIGNY C, DEBONNEL G. 1996. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci* 16: 1193-202.
- BERNARDI F, SALVESTRONI C, CASAROSA E, NAPPIRE, LANZONE A, LUISI S, ET AL. 1998. Aging is associated with changes in allopregnanolone concentrations in brain, endocrine glands and serum in male rats. *Eur J Endocrinol* 138: 316-21.
- BLANCO, G. & MERCER, R. W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*, 275, F633-50.
- BOJALIL, R., TERRAZAS, L. I., GOVEZENSKY, T., SCIUTTO, E. & LARRALDE, C. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*, 79, 384-9.
- BOWLBY MR. 1993. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 43: 813-9.
- BRIDGHAM, J. T., CARROLL, S. M. & THORNTON, J. W. 2006. Evolution of Hormone-Receptor Complexity by Molecular Exploitation. *Science*, 312, 97-101.
- BRODIE, A. 2002. Aromatase inhibitors in breast cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13, 61-65.

- BROWN, J. W. & FISHMAN, L. M. 2000. Biosynthesis and metabolism of steroid hormones by human adrenal carcinomas. *Braz J Med Biol Res*, 33, 1235-44.
- BULUN, S. E., LIN, Z., IMIR, G., AMIN, S., DEMURA, M., YILMAZ, B., MARTIN, R., UTSUNOMIYA, H., THUNG, S., GURATES, B., TAMURA, M., LANGOI, D. & DEB, S. 2005. Regulation of Aromatase Expression in Estrogen-Responsive Breast and Uterine Disease: From Bench to Treatment. *Pharmacological Reviews*, 57, 359-383.
- BURY, N. R. & STURM, A. 2007. Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 153, 47-56.
- CAMPBELL, C. M., FOSTIER, A., JALABERT, B. & TRUSCOTT, B. 1980. Identification and quantification of steroids in the serum of rainbow trout during spermiation and oocyte maturation. *Journal of Endocrinology*, 85, 371-378.
- CARDENAS, G., VALDEZ, R., SAENZ, B., BOTTASSO, O., FRAGOSO, G., SCIUTTO, E., ROMANO, M. C. & FLEURY, A. 2012. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol*, 42, 171-6.
- CARRERO, J. C., CERVANTES, C., MORENO-MENDOZA, N., SAAVEDRA, E., MORALES-MONTOR, J. & LACLETTE, J. P. 2006. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. *Microbes and Infection*, 8, 323-331.
- CHAKRABORTI, P. K., WEISBART, M. & CHAKRABORTI, A. 1987. The presence of corticosteroid receptor activity in the gills of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Gen Comp Endocrinol*, 66, 323-32.
- CHARMANDARI, E., TSIGOS, C. & CHROUSOS, G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*, 67, 259-84.
- CLOSE, D. A., YUN, S. S., MCCORMICK, S. D., WILDBILL, A. J. & LI, W. 2010. 11-deoxycortisol is a corticosteroid hormone in the lamprey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13942-7.
- COMPAGNONE NA, MELLON SH. 1998. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4678-83.
- COMPAGNONE NA, MELLON SH. 1998. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95: 4678-83.
- CORPECHOT C, YOUNG J, CALVEL M, WEHREY C, VELTZ JN, TOUYER G, ET AL. 1993. Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 133: 1003-9.
- DARNAUDERY M, PALLARÉS M, PIAZZA PV, LE MOAL M, MAYO W. The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats. *Brain Res* 2002; 951: 237-42.
- DAVIES, E. & MACKENZIE, S. M. 2003. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30, 437-45.
- DEL BRUTTO, O. H., GARCIA, E., TALAMAS, O. & SOTELO, J. 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med*, 148, 544-6.
- DELVALLE, B. 1989. Larvae of *Taenia crassiceps* (Cestoda): host specificity and localisation. *Parasitology research*, 76, 181-2.



- DINKEL, K., OGLE, W. & SAPOLSKY, R. 2002. Glucocorticoids and central nervous system inflammation. *Journal of NeuroVirology*, 8, 513-528.
- DORAIS, F. J. & ESCH, G. W. 1969. Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental parasitology*, 25, 395-8.
- DUBROVSKY BO. 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 169-92.
- DUBROVSKY BO. 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 29: 169-92.
- ESCOBEDO, G., LARRALDE, C., CHAVARRIA, A., CERBON, M. A. & MORALES-MONTOR, J. 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J Parasitol*, 90, 1235-44.
- FASSNACHT, M., HAHNER, S., BEUSCHLEIN, F., KLINK, A., REINCKE, M. & ALLOLIO, B. 2000. New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *Eur J Clin Invest*, 30 Suppl 3, 76-82.
- FERNÁNDEZ PRESAS, A., VALDEZ, R., WILLMS, K. & ROMANO, M. 2008. The key steroidogenic enzyme 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU). *Parasitology Research*, 103, 847-852.
- FLEURY, A., DESSEIN, A., PREUX, P. M., DUMAS, M., TAPIA, G., LARRALDE, C. & SCIUTTO, E. 2004. Symptomatic human neurocysticercosis--age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol*, 251, 830-7.
- FREEMAN, R. S. 1962. STUDIES ON THE BIOLOGY OF TAENIA CRASSICEPS (ZEDER, 1800) RUDOLPHI, 1810 (CESTODA). *Canadian Journal of Zoology*, 40, 969-990.
- GEE KW. 1988. Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptorlinked chloride ionophore. *Mol Neurobiol* 2: 291-317.
- GEERING, K., BEGGAH, A., GOOD, P., GIRARDET, S., ROY, S., SCHAER, D. & JAUNIN, P. 1996. Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the beta subunit with the alpha subunit. *J Cell Biol*, 133, 1193-204.
- GOMES, L. G., HUANG, N., AGRAWAL, V., MENDONCA, B. B., BACHEGA, T. A. & MILLER, W. L. 2009. Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 89-95.
- GOMEZ, Y., VALDEZ, R. A., LARRALDE, C. & ROMANO, M. C. 2000. Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cisticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74, 143-147.
- GRIFFIN LD, MELLON SH.1999. Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96: 13512-7.
- GUAZZO EP, KIRKPATRICK PJ, GOODYER IM, SHIERS HM, HERBERT J. 1996. Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3951-60.
- GUENNOUM R, LABOMBARDA F, GONZALEZ DENISELLE MC, LIERE P, DE NICOLA A.F., SCUMACHER R. 2015. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem & Molecular Biology*. 146 48-61.
- HALL PF. 1995. The role of endozepine in the regulation of steroid synthesis. *Mol Neurobiol* 10: 1-17.

- HANNEN, R. F., MICHAEL, A. E., JAULIM, A., BHOGAL, R., BURRIN, J. M. & PHILPOTT, M. P. 2011. Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404, 62-67.
- HARRISON NL. 1984. Simmonds MA. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323: 287-92.
- HAWKINSON JE, ACOSTA-BURRUEL M, KIMBROUGH CL, GOODNOUGH DB, WOOD PL. 1996. Steroid inhibition of [3H]SR 95531 binding to the GABAA recognition site. *Eur J Pharmacol* 304: 141-6.
- HINOJOSA, L., VALDEZ, R. A., SALVADOR, V., RODRIGUEZ, A. G., WILLMS, K. & ROMANO, M. C. 2012. The effect of glucocorticoids on sex steroid synthesis in cultured *Taenia crassiceps* Wake Forest University (WFU) cysticerci. *J Helminthol*, 86, 465-9.
- HOSIE AM, WILKINS ME, DA SILVA HM, SMART TG. 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. 444 486-489.
- HUERTA, L., TERRAZAS, L. I., SCIUTTO, E. & LARRALDE, C. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol*, 78, 471-6.
- IRWIN RP, LIN SZ, ROGAWSKI MA, PURDY RH, PAUL SM. 1994. Steroid potentiation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca<sup>++</sup> responses: structure-activity studies. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 677-82.
- ISHIKAWA T, GLIDEWELL-KENNEY C, JAMESON JL. 2006. Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 alpha-reductase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98 133-138.
- JIMÉNEZ, P., VALDEZ, R. A. & ROMANO, M. C. 2006. Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 99, 203-208.
- KAGAWA, N. & WATERMAN, M. R. 1990. cAMP-dependent transcription of the human CYP21B (P-450C21) gene requires a cis-regulatory element distinct from the consensus cAMP-regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 11299-305.
- KAMRATH C, HOCHBERG Z, HARTMANN MF, REMER T, WUDY SA. 2012. Increased activation of the alternative "backdoor" pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 97 E3 67-75.
- KATZ, A. I. 1986. Distribution and function of classes of ATPases along the nephron. *Kidney Int*, 29, 21-31.
- KIILERICH, P., TIPSMARK, C. K., BORSKI, R. J. & MADSEN, S. S. 2011. Differential effects of cortisol and 11-deoxycorticosterone on ion transport protein mRNA levels in gills of two euryhaline teleosts, Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and striped bass (*Morone saxatilis*). *J Endocrinol*, 209, 115-26.
- KUMAR, S. & HEDGES, S. B. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 392, 917-920.
- LABRIE, F., LUU-THE, V., LIN, S., SIMARD, J., LABRIE, C., EL-ALFY, M., PELLETIER, G., Y BELANGER, A. (2000). Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 1-16.

- LAJIC, S., EIDSMO, L. & HOLST, M. 1995. Steroid 21-hydroxylase in the kidney: Demonstration of levels of messenger RNA which correlate with the level of activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 181-186.
- LAMBERT JJ, BELELLI D, HARNEY SC, PETERS JA, FRENGUELLI BG. 2001. Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37: 68-80.
- LAMBERT JJ, BELELLI D, HILL-VENNING C, PETERS JA. 1995. Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 16: 295-303.
- LANTHIER A, PATWARDHAN VV. 1986. Sex steroids and 5-en-3 beta-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *J Steroid Biochem*; 25: 445-9.
- LARRALDE, C., MORALES, J., TERRAZAS, I., GOVEZENSKY, T. & ROMANO, M. C. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 575-580.
- LINGNAU, A., MARGOS, G., MAIER, W. A. & SEITZ, H. M. 1993. The effects of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Appl Parasitol*, 34, 153-60.
- LINGREL, J. B. & KUNTZWEILER, T. 1994. Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Biol Chem*, 269, 19659-62.
- MAJEWSKA MD. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38:379-385.
- MASWOSWE, S. M., PETERS, W. & WARHURST, D. C. 1985. Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Ann Trop Med Parasitol*, 79, 607-16.
- MATHIS C, VOGEL E, CAGNIARD B, CRISCUOLO F, UNGERER A. 1996. The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice. *Neuropharmacology* 35: 1057-64.
- MAYO W, DELLU F, ROBEL P, CHERKAOUI J, LE MOAL M, BAULIEU EE, ET AL. Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res* 1993; 607: 324-8.
- MCCORMICK, S. D., REGISH, A., O'DEA, M. F. & SHRIMPSON, J. M. 2008. Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and isoform mRNA levels in *Atlantic salmon*. *General and Comparative Endocrinology*, 157, 35-40.
- MELCHIOR CL, RITZMANN RF. 1994. Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 48: 893-7.
- MELLON SH. 1994. Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1003-8.
- MIENVILLE JM, VICINI S. 1989. Pregnenolone sulfate antagonizes GABAA receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res* 489: 190-94.
- MILLA, S., TERRIEN, X., STURM, A., IBRAHIM, F., GITON, F., FIET, J., PRUNET, P. & LE GAC, F. 2008. Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermiation: implication with 17alpha, 20beta-dihydroxyprogesterone on the milt fluidity? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6, 19.
- MOFFAT SD, ZONDERMAN AB, METTER EJ, BLACKMAN MR, HARMAN SM, RESNICK SM. 2002. Longitudinal assessment of serum free testosterone concentration predicts

- memory performance and cognitive status in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5001-7.
- MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M. & MOON, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- MONOSTORY, K. & DVORAK, Z. 2011. Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr Drug Metab*, 12, 154-72.
- MONOSTORY, K., Y DVORAK, Z. (2011). Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr Drug Metab* 12, 154-172.
- MORALES, J., LARRALDE, C., ARTEAGA, M., GOVEZENSKY, T., ROMANO, M. C. & MORALI, G. 1996. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J Parasitol*, 82, 689-93.
- MORALES-MONTOR, J., HALLAL-CALLEROS, C., ROMANO, M. C. & DAMIAN, R. T. 2002. Inhibition of P-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int J Parasitol*, 32, 1379-1387.
- MORALES-MONTOR, J., MOHAMED, F., GHALEB, A. M., BAIG, S., HALLAL-CALLEROS, C. & DAMIAN, R. T. 2001. In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*, 87, 1132-9.
- MORROW AL, VANDOREN MJ, PENLAND SN, MATTHEWS DB. 2001. The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* 37: 98-109.
- NISWENDER, G. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 123, 333-339.
- ORENTREICH N, BRIND JL, VOGELMAN JH, ANDRES R, BALDWIN H. 1992. Longterm longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1002-4.
- PAGUIGAN N.D, EL-ELIMAT T, KAO D, RAJA H.A, PEARCE C. J AND OBERLIES N. H. 2017. Enhanced dereplication of fungal cultures via use of mass defect filtering. *The Journal of Antibiotics* 70, 553–561
- PALLARÉS M, DARNAUDERY M, DAY J, LE MOAL M, MAYO W. 1998. The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the nucleus basalis increases both acetylcholine release in the frontal cortex or amygdala and spatial memory. *Neuroscience* 87: 551-8.
- PALMER, L. G. & FRINDT, G. 1999. Regulation of apical K channels in rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake. *Am J Physiol*, 277, F805-12.
- PAPADOPOULOS V, BERKOVICH A, KRUEGER KE, COSTA E, GUIDOTTI A. 1991. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 129: 1481-8.
- PAPADOPOULOS V, BROWN AS. 1995. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:
- PAPADOPOULOS V, GUARNERI P, KREUGER KE, GUIDOTTI A, COSTA E. 1992. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5113-7.
- PAPADOPOULOS V. 1993. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14: 222-40.

- PARK-CHUNG M, WU FS, FARB DH. 1994. 3 alpha-hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* 46: 146-50.
- PARK-CHUNG M, WU FS, PURDY RH, MALAYEV AA, GIBBS TT, FARB DH. 1997. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* 52: 1113-23.
- PARK-CHUNG M, WU FS, FARB DH. 1994. 3 alpha-hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* 46: 146-50.
- PATRICIO-GÓMEZ J.M, VALDEZ A. R, RAMOS-ROBLES B, LÓPEZ-GONZÁLEZ M DE L, SIERRA-SANTOYO A, ROMANO P. M.C. August 25-29, 2014. Deoxycorticosterone increases *Taenia crassiceps* WFU cysticerci Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase expression and its synthesis is related to the developmental stage of the parasite. 27<sup>th</sup> Conference of European Comparative Endocrinologists. Congreso llevado a cabo en Rennes France.
- PAUL SM, PURDY RH. 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J* 6: 2311-22.
- PAZIRANDEH, A., XUE, Y., RAFTER, I., SJÖVALL, J., JONDAL, M. & OKRET, S. 1999. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *The FASEB Journal*, 13, 893-901.
- PRETORIUS E, ARLT W, STORBECK KH. 2017. A new dawn for androgens: Novel lessons from 11-oxygenated C19 steroids. *Mol Cell Endocrinol. Review*. 441 76-85.
- PUIA G, DUCIC I, VICINI S, COSTA E. 1993. Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABAA receptor subunit composition? *Receptors Channels*; 1: 135-42.
- REDDY DS, KAUR G, KULKARNI SK. 1998. Sigma (sigma1) receptor mediated anti-depressant-like effects of neurosteroids in the Porsolt forced swim test. *Neuroreport* 9: 3069-73.
- REDDY DS, KIM HY, ROGAWSKI MA. 2001. Neurosteroid withdrawal model of perimenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsia* 42: 328-36.
- REDDY DS, KULKARNI SK. 1998. The role of GABA-A and mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptors on the effects of neurosteroids on food intake in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 137: 391-400.
- ROMANO, M. C., VALDÉZ, R. A., CARTAS, A. L., GÓMEZ, Y. & LARRALDE, C. 2003. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85, 221-225.
- ROMANO, M. C., VALDEZ, R. A., HINOJOSA, L., GOMEZ, Y. & JIMENEZ, P. 2008. Are hormones relevant for the search and design of anti-parasitic drugs? *Curr Top Med Chem*, 8, 408-18.
- RUPPRECHT R, HOLSBOER F. 1999. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* 22: 410-6.
- RUPPRECHT R. 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 28: 139-68.
- SAPOLSKY, R. M., ROMERO, L. M. & MUNCK, A. U. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev*, 21, 55-89.
- SCIUTTO, E., FRAGOSO, G., DIAZ, M. L., VALDEZ, F., MONTTOYA, R. M., GOVEZENSKY, T., LOMELI, C. & LARRALDE, C. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research*, 77, 243-246.

- SCIUTTO, E., FRAGOSO, G., FLEURY, A., LACLETTE, J. P., SOTELO, J., ALUJA, A., VARGAS, L. & LARRALDE, C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*, 2, 1875-90.
- SERVATIUS RJ, MARX CE, SINHA S, AVCU P, KILTS JD, NAYLOR JC, PANG KC. 2016. Brain and Serum Androsterone Is Elevated in Response to Stress in Rats with Mild Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci*. 26 379. (doi: 10.3389/fnins.2016.00379)
- SIERRA A. 2004. Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *J Neuroendocrinol* 16: 787-93.
- SMITH SS, GONG QH, HSU FC, MARKOWITZ RS, FRENCH-MULLEN JM, LI X. 1998. GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* 392: 926-30.
- SMITH SS. 2002. Withdrawal properties of a neuroactive steroid: implications for GABA(A) receptor gene regulation in the brain and anxiety behavior. *Steroids* 67: 519-28.
- SOCCIO, R. E., Y BRESLOW, J. L. (2003). StAR-related Lipid Transfer (START) Proteins: Mediators of Intracellular Lipid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22183-22186.
- STELL BM, BRICKLEY SG, TANG CY, FARRANT M, MODY I. 2003. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14439-44.
- STOCCO, D. M. & CLARK, B. J. 1996. Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endocr Rev*, 17, 221-244.
- STOLTE, E. H., VAN KEMENADE, B. M. L. V., SAVELKOUL, H. F. J. & FLIK, G. 2006. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *Journal of Endocrinology*, 190, 17-28.
- STURM, A., BURY, N., DENGREVILLE, L., FAGART, J., FLOURIOT, G., RAFESTIN-OBLIN, M. E. & PRUNET, P. 2005. 11-Deoxycorticosterone Is a Potent Agonist of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mineralocorticoid Receptor. *Endocrinology*, 146, 47-55.
- TERRAZAS, L. I., BOJALIL, R., GOVEZENSKY, T. & LARRALDE, C. 1994a. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*, 80, 563-8.
- TERRAZAS, L. I., BOJALIL, R., GOVEZENSKY, T. & LARRALDE, C. 1994b. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of parasitology*, 80, 563-8.
- THORNTON, J. W. 2001. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 5671-5676.
- TOENJES, S. A., SPOLSKI, R. J., MOONEY, K. A. & KUHN, R. E. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology*, 118 ( Pt 6), 623-33.
- TOLEDO, A., CRUZ, C., FRAGOSO, G., LACLETTE, J. P., MERCHANT, M. T., HERNANDEZ, M. & SCIUTTO, E. 1997. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *The Journal of parasitology*, 83, 189-93.
- TSUTSUI K, UKENA K, USUI M, SAKAMOTO H, TAKASE M. 2000. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res* 36: 261-73.

- TUSIE-LUNA, M. T., TRAKTMAN, P. & WHITE, P. C. 1990. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 20916-22.
- VALDEZ, R. A., HINOJOSA, L., GOMEZ, Y., WILLMS, K. & ROMANO, M. C. 2012. *Taenia crassiceps* WFU cysticerci synthesize corticosteroids in vitro: metyrapone regulates the production. *Gen Comp Endocrinol*, 176, 409-14.
- VALDÉZ, R. A., JIMÉNEZ, P., CARTAS, A. L., GÓMEZ, Y. & ROMANO, M. C. 2006. *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens in vitro. *Parasitology Research*, 98, 472-476.
- VALERA S, BALLIVET M, BERTRAND D. 1992. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9949-53.
- WEILL-ENGERER S, DAVID JP, SAZDOVITCH V, LIERE P, EYCHENNE B, PIANOS A, ET AL. 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 5138-43.
- WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev*, 77, 591-625.
- WETZEL CH, HERMANN B, BEHL C, PESTEL E, RAMMES G, ZIEGLGANSBERGER W, ET AL. 1998. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol* 12: 1441-51.
- WHITE, A. C., JR., ROBINSON, P. & KUHN, R. 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol*, 66, 209-30.
- WHITE, P. C. & SPEISER, P. W. 2000. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*, 21, 245-91.
- WHITING PJ, MCALLISTER G, VASSILATIS D, BONNERT TP, HEAVENS RP, SMITH DW, ET AL. 1997. Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABAA receptor subunit conferring atypical functional properties. *J Neurosci* 17: 5027-37.
- WILLIAMSON J, MTCHEDLISHVILI Z, KAPUR J. 2004. Characterization of the convulsant action of pregnenolone sulfate. *Neuropharmacology* 46: 856-64.
- WILLMS, K., SHOEMAKER, C. B., SKELLY, P. J. & LANDA, A. 2004. Cloning and expression of a Na(+), K(+)-ATPase alpha-subunit from *Taenia solium* (TNaK1alpha). *Mol Biochem Parasitol*, 138, 79-82.
- WU FS, GIBBS TT, FARB DH. 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40: 333-6.
- WU FS, GIBBS TT, FARB DH. 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40: 333-6.
- XIE, Z. & ASKARI, A. 2002. Na+/K+-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, 269, 2434-2439.

## 8 ANEXOS

### Artículo publicado:

PATRICIO-GÓMEZ. J.M, VALDEZ R.A, VELOZ A, AGUILAR-VEGA L, ZURABIAN R & ROMANO M.C. 2018. The synthesis of steroids by *Taenia crassiceps* WFU cysticerci and tapeworms is related to the developmental stages of the parasites. *General and Comparative Endocrinology*. 259, 154-160.





## Research paper

# The synthesis of steroids by *Taenia crassiceps* WFU cysticerci and tapeworms is related to the developmental stages of the parasites

J.M. Patricio-Gómez<sup>a</sup>, R.A. Valdez<sup>a</sup>, A. Veloz<sup>a</sup>, L. Aguilar-Vega<sup>b</sup>, R. Zurabian<sup>b</sup>, M.C. Romano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV del I.P.N., México CdMx, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México CdMx, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 August 2017

Revised 20 November 2017

Accepted 21 November 2017

Available online 22 November 2017

## Keywords:

*Taenia crassiceps* WFU

Cysticerci

Tapeworms

Developmental stages

Steroid synthesis

## ABSTRACT

Taeniids tapeworms are hermaphroditic helminths that gradually develop testis and ovaries in their reproductive units. The larval stage of the tapeworms named cysticercus is a vesicle that contains the scolex and proliferates asexually in the abdominal cavity of mice. Once in the host, they evaginate, attach to the gut and develop into an adult organism, the tapeworm. We have previously reported that *T. crassiceps* ORF and *solium* cysticerci transform steroid precursors to androgens and estrogens. *Taenia crassiceps* WFU cysticerci can also synthesize corticosteroids. The aim of the present work is to investigate the relationship between steroid synthesis ability and the developmental stage of the parasite *T. crassiceps* WFU. To this purpose, cysticerci were obtained from the abdominal cavity of female mice, manually separated in invaginated (IC) and evaginated parasites (EC) and preincubated for 24 h in DMEM plus antibiotics/antimycotics. Next step consisted in incubation for different periods in the fresh media added with tritiated androstenedione (<sup>3</sup>H-A<sub>4</sub>) or progesterone (<sup>3</sup>H-P<sub>4</sub>) and incubated for different periods. *Taenia crassiceps* WFU tapeworms were recovered from the intestine of golden hamsters that had been orally infected with cysticerci. The worms were pre-cultured in DMEM plus FBS and antibiotics, and then incubated without FBS for different time periods, in the presence of <sup>3</sup>H-A<sub>4</sub> or <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub>. At the end of the experiments the media from cysticerci and tapeworms were analyzed by thin layer chromatography. Results showed that testosterone synthesis was significantly higher in the evaginated cysticerci and increased with time in culture. The invaginated and evaginated cysticerci also synthesized small quantities of 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) and estrone. The evaginated cysticerci synthesized twice more <sup>3</sup>H-deoxycorticosterone (<sup>3</sup>H-DOC) than the invaginated parasites, the production increased significantly with time in culture. *Taenia crassiceps* WFU tapeworms synthesized significant quantities of <sup>3</sup>H-testosterone and small amounts of estrone after only 3 h of culture in the presence of <sup>3</sup>H-A<sub>4</sub>. The tapeworms also transformed <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> to <sup>3</sup>H-DOC and increased its synthesis after 24 h in culture. In summary, our data show the pathways that *T. crassiceps* WFU cysticerci use to synthesize sexual steroids in both larval developmental stages and reveals the steroidogenic capacity of the tapeworms.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human and porcine cysticercosis is caused by the larval stage of the *Taenia solium* (Cestoda) tapeworm. Parasite localization in human brain, known as neurocysticercosis, is the most common parasite disease of the central nervous system worldwide (García et al., 2007). During the last two decades considerable advances in the understanding of cysticercosis have been achieved using a murine model for cysticercosis, which is based on *Taenia crassiceps* WFU (*T. crassiceps* WFU). This cestode naturally infects arctic and

red foxes, wolves and dogs as definitive hosts, and small rodents including mice as intermediate hosts (Willms and Zurabian, 2010). The metacestode stage of this parasite, called cysticerci, develops in the peritoneal cavity of mice and asexually reproduces by budding. The WFU *T. crassiceps* cysticercus is a vesicle that contains an invaginated scolex at the early developmental stage, which become more prominent during longer intraperitoneal rearing in mice (Zurabian et al., 2008). The inverted scolex-neck from which the tapeworms develop, evaginates after special stimulus; evagination was linked to the cysticerci capacity to develop a tapeworm.

In the laboratory, the tapeworms can be obtained from the hamster gut previously infected with *T. crassiceps* WFU cysticerci. Once ingested by the host, the invaginated cysticerci (IC) evaginate

\* Corresponding author at: Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV del I.P.N., México City, Mexico.

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

from the bladder scolex, attaches to the gut of the definitive host and develops into the adult organism, a tapeworm. *Taeniid* tapeworms are hermaphroditic helminths that gradually develop testis and ovaries within each reproductive units.

Human infections by *T. crassiceps* have been reported, involving both immunocompromised and immunocompetent patients has been reported in France and other European countries, especially Germany and Norway, as well as in North America and Eastern and Northern Asia (François et al., 1998; Stien et al., 2010).

The maintenance of normal reproductive development, function, and bodily homeostasis is dependent on steroid hormones. Although the steroid hormones are diverse, they are synthesized from a common precursor substrate, cholesterol, which can be derived from a number of sources, i.e., *de novo* synthesized cellular cholesterol, lipoprotein-derived cholesteryl esters, and hydrolysis of cholesterol esters stored in lipid droplets (Azhar and Reaven, 2002; Kraemer et al., 2004; Manna et al., 2009). Moreover, the conversion of cholesterol esters into free cholesterol, is as a crucial step in controlling cholesterol availability for steroidogenesis.

Steroid hormones are essential for life. They are essential for homeostasis of key physiological functions and regulate critical phases of development (Tremblay, 2015). Progesterone, androgens and estrogens have critical roles in the vertebrate reproduction and metabolism, but the influence and occurrence of steroid hormones in invertebrates had received less attention. The exception is insect endocrinology that has been extensively studied (Swevers et al., 1991, De Loof et al., 2013). On the other hand, the interplay between parasite and the host defines the intensity of infections and disease. In many cases, the parasite's infection, changes the host endocrine equilibrium due to the activation of the immune system response, which affects the endocrine system through the influence of cytokines and growth factors released by the immune cells. It is now widely accepted that corticosteroids and sex-related hormones influence the immune response (Craig et al., 2001; Coutinho and Chapman, 2011, Reyes et al., 2013). Thereafter, any endocrine related changes initiated by an infection, will change the neuroendocrine equilibrium (Romano et al., 2015). These hormonal changes resulting from spontaneous or experimental infection, affect the parasitic charge, the course of the infection and the parasite's survival (Barthelemy et al., 2004).

Corticosteroid hormones are critical for metabolism, growth, reproduction, immunity, and ion homeostasis in vertebrates, and are an important part of the coping mechanisms in stress responses (Charmandari et al., 2005). Corticosteroids primarily act by binding to cytosolic receptors, which are then transported to the nucleus, where they act as positive and negative transcription factors. Their activity leads to the expression or repression of various regulatory proteins that counteract the effects of external stressors, thus maintaining homeostasis (Sapolsky et al., 2000).

We have previously shown that *T. solium* cysticerci transform steroid precursors to androgens and estrogens and have cloned an active 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (Valdez et al., 2006; Aceves-Ramos et al., 2014). Using the laboratory model of *T. crassiceps* WFU cysticerci, we have reported that these parasites transformed various tritiated precursors to sex steroids and  $^3\text{H-P}_4$  to corticosteroids, being 11-deoxycorticosterone (DOC) the most abundant metabolite (Jimenez et al., 2006; Valdez et al., 2012). Transformation of  $^3\text{H-DHEA}$  to androstenediol suggested the presence of an enzyme of the  $\Delta 5$  steroidogenic pathway in *T. crassiceps* WFU worms (Fernández-Presas et al., 2008). However, neither the sex steroid synthesis in the  $4\Delta$  pathway nor the corticosteroid synthesis capacity of *T. crassiceps* WFU worms, had been investigated.

Our laboratory has been interested in the capacity of cysticerci and tapeworms to synthesize corticosteroids and sex steroids. Besides their probable role in the parasite's development, steroids may be involved in the host-parasite relationship as well. It is well

known that corticosteroids and sex steroids participate in differentiation, protein synthesis, in essential metabolic pathways and in the immune system function of vertebrates and invertebrates. However, the influence of the developmental stage on the steroidogenic capacities of *T. crassiceps* WFU cysticerci had not been investigated. Moreover, there are no information on the capacity of *T. crassiceps* worms to synthesize corticosteroids. To the best of our knowledge there is little information on the relationship of steroid synthesis and the helminth developmental stages.

## 2. Material and methods

### 2.1. *T. Crassiceps* WFU cysticerci

Cysticerci from the WFU strain of *Taenia crassiceps* were collected from the peritoneal cavity of female Balb/c mice 4–6 months postinfection and rinsed five times in phosphate-buffered-saline, pH 7.2 (PBS). Cysticerci were pre-incubated for 24 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and air, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), plus 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 25 mM of N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES; Sigma) and 1% antibiotic-antimycotic solution (penicillin at 10,000 U/ml, plus streptomycin at 10,000  $\mu\text{g/ml}$ , amphotericin 25  $\mu\text{g/ml}$ ; GIBCO) (Valdez et al., 2006).

Following the pre-incubation period, the parasites were manually separated in invaginated cysticerci (IC) and evaginated cysticerci (EC), were washed with DMEM and 250  $\mu\text{L}$  cysticerci corresponding to  $28.8 \pm 1.6$  cysticerci were transferred to each well in a multiwall plate. After 24 h of incubation in culture, freshly media containing 0.1  $\mu\text{Ci}$  of  $^3\text{H}$ -Progesterone (1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$  progesterone 93.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.), or  $^3\text{H}$ -androstenedione ( $^3\text{H-A}_4$ ) (1, 2, 6, 7- $^3\text{H}$  androstenedione, 98.1 Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston MA, U.S.A.) was added and the parasites incubated for 12, 24 or 43 h.

Blanks containing the culture media plus the tritiated precursors were simultaneously incubated. Culture media were recovered, mixed with 5 ml of anhydrous ethyl ether (Merck, Darmstadt, Germany) and immediately frozen. The organic phase was transferred to new vials and evaporated to dryness (Valdez et al., 2006,2012). The samples were reconstituted in 100  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol and analysed by thin layer chromatography.

### 2.2. Viability of cysticerci

Two criteria were used to define cysticerci viability after treatments: a) assessment of metacystode morphology and movements and evagination of the scolex using a stereoscopic microscope (Nikon SMZ-2B, Japan), and b) incubation with 1% Trypan blue for 10 min, an exclusion colorant that stains dead parasites. Metacystodes were considered viable if they exhibited characteristic movements of the cyst, an intact wall, a semitransparent membrane, active movements of the neck and scolex within the vesicle, transparent cyst fluid and complete or incomplete evagination of the scolex.

### 2.3. Thin layer chromatography

Thin layer chromatography (TLC) was carried out using Silica gel 60 F<sub>254</sub> pre-coated sheet plates (Merck, Darmstadt, Germany) as described previously (Valdez et al., 2006,2012). Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  of the ethanolic samples were supplemented with standard steroids (progesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, deoxycorticosterone, cortisol, corticosterone, DHEA, androstenediol, androstenedione, testosterone, estradiol, estrone, from

**Table 1**

Time course of the steroid synthesis by two developmental stages of *Taenia crassiceps* WFU cysticerci.  $^3\text{H}$ -androstenedione was used as the precursor.

RADIOACTIVE PRECURSOR METABOLITES	TRANSFORMATION RATE EVALUATED IN TWO DEVELOPMENTAL STAGES OF <i>Taenia crassiceps</i> WFU CYSTICERCI	
	Invaginated cysticerci	Evaginated cysticerci
$^3\text{H-A}_4$ / TESTOSTERONE		
6 h	9.6 ± 2.1	22.9 ± 1.9**
24 h	71.4 ± 7.6	75.5 ± 4.5
43 h	75.0 ± 4.7	74.1 ± 5.3
$^3\text{H-A}_4$ / ESTRADIOL		
6 h	7.7 ± 2.7	5.3 ± 3.3
24 h	4.7 ± 2.7	3.8 ± 4.3
43 h	3.1 ± 2.5	0.1 ± 0.5
$^3\text{H-A}_4$ / ESTRONE		
6 h	10.1 ± 2.5**	0.8 ± 1.1
24 h	0.2 ± 0.8	0.1 ± 0.5
43 h	nd	nd

Steraloids, Wilton, NH, USA) and further separated in a TLC system. The TLC plates were developed in two different solvent systems benzene:methanol 9:1 v/v for sex steroids and toluene:acetone:methanol 78:20:2 v/v for corticosteroids (Solvents were purchased in Merck, Darmstadt, Germany). Steroids were detected by UV absorption after plates were exposed to 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  followed by heating at 120 °C. Regions corresponding to authentic standards were cut and placed in vials containing scintillation liquid and radioactivity was counted in a liquid scintillation spectrometer (Beckman LS 6000 TA). The recovered radioactivity was estimated by comparing the difference between initial and final cpm. Results were expressed as the percentage of substrate transformation for each metabolite, after the corresponding incubation periods in the presence of the precursor. Since the recovery of the radioactivity of each precursor was higher than 85%, no corrections were made.

#### 2.4. Growth of tapeworms in hamster's intestine

Adult *T. crassiceps* WFU tapeworms were recovered from the intestine of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculated 25–45 days before by oral administration of 8–10 cysticerci obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice infected with the WFU strain of *T. crassiceps*. Hamsters were pretreated for five days with 40 mg/kg of albendazole (Zentel Smith Kline, Beecham, Mexico) and injected with 2 mg/kg of methyl-prednisolone acetate (Depomedrol, Upjohn, Mexico) on the day of infection and every two weeks for the duration of the experiments. Animals were kept on commercial food pellets and water under controlled conditions and killed by injection of sodium barbital (Anestesal, Pfizer, Mexico) The small intestine was opened longitudinally to recover complete strobilae of *T. crassiceps* WFU from the duodenal cavity of infected hamsters (Willms et al., 2003, Fernández Presas et al., 2005).

#### 2.5. Steroid synthesis by tapeworms

The tapeworms were thoroughly rinsed in PBS, and then washed with culture media as mentioned in Valdez et al. (2006). The worms were then transferred to new wells and pre-

incubated with the same media plus 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 h in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  and air. Thereafter, the worms were incubated for 12, 24 or 48 h in DMEM without FBS in the presence of  $^3\text{H-P}_4$  or  $^3\text{H-A}_4$ . After incubation, the parasites were removed and steroids were extracted with 2 volumes of cold anhydrous ether. The organic phase was transferred to new vials and evaporated in a nitrogen atmosphere at 37 °C. The samples were reconstituted in 100  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol. Metabolites synthesized from the precursors were identified by TLC as described above.

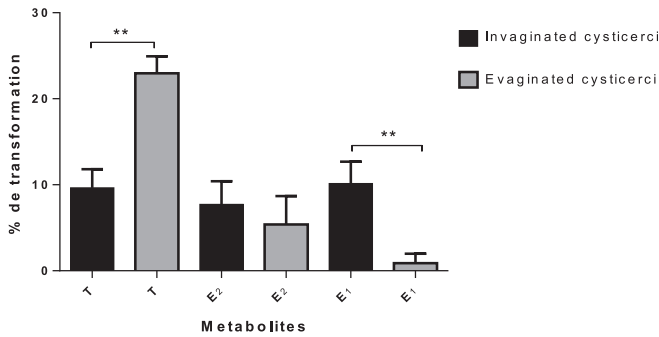
#### 2.6. Statistics

Statistical analysis was performed using Prism version 4. 2003 (GraphPad Software Inc.). Data were presented as means ± SD. Probability values of  $p < .05$  were considered as statistically significant. Normality was investigated using the Kolmogorov Smirnov test. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison post-test, or ANOVA and unpaired Student's *t*-test, were used to investigate statistical differences between groups. The cysticerci experiments were performed each time with six wells per group and repeated at least three times.

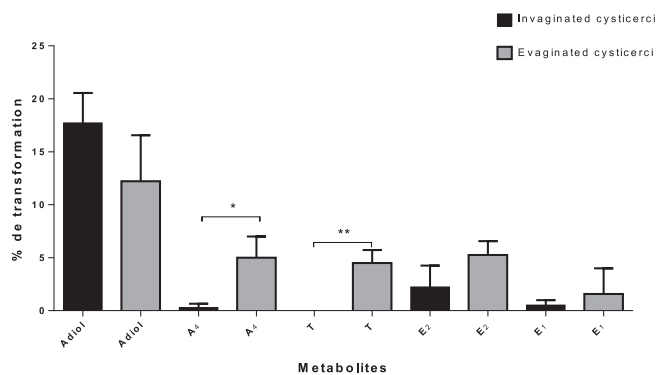
### 3. Results

#### 3.1. Sex steroid synthesis from evaginated and non-evaginated cysticerci

Table 1 shows the IC and EC steroid transformation of  $^3\text{H-A}_4$  after different periods in culture. The incubation of IC or EC parasites with  $^3\text{H-A}_4$  for 6 h resulted in the synthesis of testosterone and estrogens. Interestingly EC cysticerci doubled the synthesis of testosterone compared to the IC parasites. Likewise, the estrone synthesis was significantly higher for the EP after 6 h of culture but rapidly decayed to non-detectable levels, while  $17\beta$ -estradiol synthesis, although in a small percentage, was present till the end of the study. Both developmental stages significantly increased testosterone synthesis over time and reached a plateau after 43 h of culture.



**Fig. 1.** Metabolism of sexual steroids from <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> by invaginated and evaginated cysticerci. The results express percent transformation of the tritiated steroid precursor after 6 h of incubation. Representative experiment repeated 3 times. Each value indicates media ± SD of 6 wells. *t*-Student, *P* < .0069.



**Fig. 2.** Metabolism of sexual steroids from <sup>3</sup>H-DHEA by invaginated and evaginated cysticerci. The results express percent transformation of the tritiated steroid precursor after 6 h of incubation. Representative experiment repeated 3 times. Each value indicates media ± SD of 6 wells. *P* < .05 for A<sub>4</sub> and 0.001 for testosterone.

Each value indicates media ± SD of 6 wells. *t*-Student, *p* < 0 Non rejected is OK, I cannot change my mistaken change.001.n.d. non determined.

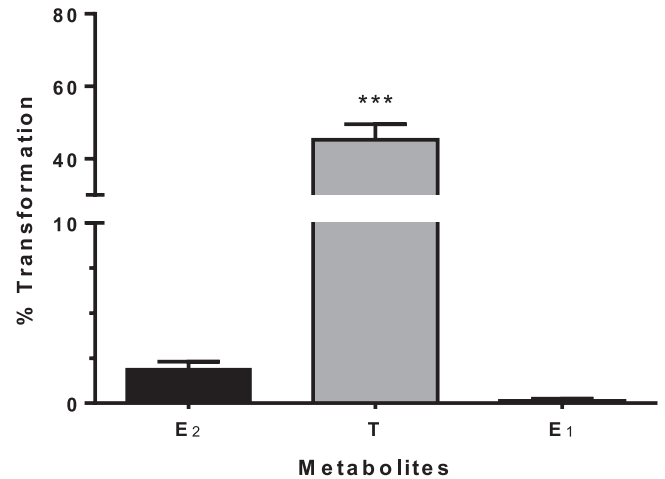
Invaginated and evaginated cysticerci exposed to <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> for 6 h synthesized essentially androstenedione and testosterone. Transformation of tritiated progesterone to testosterone was statistically higher in the evaginated parasites (Fig. 1).

To compare the synthesis of sex steroids by the Δ<sup>5</sup>-steroidogenic pathway, IC and EC parasites were also incubated for 6 h with <sup>3</sup>H-DHEA as the precursor (Fig. 2). Results showed that in both developmental stages the parasites synthesized the androgens androstendiol, androstendione and testosterone. Androstendiol synthesis predominated after 6 h of exposition to tritiated DHEA, and androstendione and testosterone synthesis was significantly higher in the EC. Estrogens were also detected, but no significant differences were found between developmental stages Fig. 3.

### 3.2. Corticosteroid synthesis from evaginated and non-evaginated cysticerci

Table 2 shows the time course transformation of <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> to corticosteroids by IC and EC. DOC was the main metabolite in both developmental stages and increased with time in culture. Interestingly, EC doubled the synthesis of DOC at 12 and 24 h as compared to IC. Furthermore, at 24 h of culture EC synthesized more 11-deoxycortisol than IC (Table 2).

Each value indicates media ± SD of 6 wells. *t*-Student, *p* < .001.



**Fig. 3.** <sup>3</sup>H-Androstenedione metabolism by *Taenia crassiceps* WFU tapeworms. The worms were incubated for 3 h with <sup>3</sup>H-A<sub>4</sub>. Each value represents the mean ± SD *n* = 6 tapeworms individually cultured. Testosterone was the most abundant metabolite synthesized by the worms.

### 3.3. Synthesis of sexual steroids by *T. Crassiceps* tapeworms

Fig. 3 shows the synthesis of testosterone and estrogens by the adult parasite. The production of tritiated testosterone and 17β-estradiol is appreciated after 3 h of incubation in the presence of <sup>3</sup>H-A<sub>4</sub>. The worms synthesize greater quantities of testosterone after only 3 h of incubation compared to cysticerci.

*Taenia crassiceps* WFU tapeworms also synthesized tritiated testosterone, small amounts of androstendiol (Adiol), as well as 17-hydroxy progesterone (17-OH-P<sub>4</sub>) when the parasites were incubated with tritiated progesterone for 24 h (Fig. 4).

### 3.4. Synthesis of corticosteroids by *T. Crassiceps* tapeworms

The incubation of *T. crassiceps* tapeworms for 24 h in the presence of <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> yielded significant quantities of DOC and lesser amounts of 11-deoxycortisol (11-DCSL). Reduced transformation rates to cortisol and corticosterone were also evident (Fig. 5).

## 4. Discussion

*Taenia crassiceps* WFU is a good biological model to study the development of the parasite due to the availability of at least three of the parasite developmental stages. Using *in vivo* rodent systems, metacercariae with an invaginated, or else well developed, evaginated scolex, and also adult cestodes can be obtained and, maintained *in vitro* for further studies.

Previous to this study, a comprehensive information about steroid hormone synthesis comparing three different stages of *T. crassiceps* WFU, was lacking.

As stated in the Introduction, steroid hormones are essential for life because they regulate critical phases of development and are essential for homeostasis of key physiological functions in mammals (Tremblay, 2015; Bondesson et al., 2015). It has been extensively shown that in mammals the steroid synthesis is related to the determined stage of development. However, few is known about general invertebrate endocrinology and development related to the steroid synthesis (LaFon, 2000). Nevertheless, the function of steroid hormones in the development of invertebrates is an important matter that had been widely investigated in insects (Swevers et al., 1991; De Loof et al., 2013). However, further studies are necessary to clarify their function and the pathways involved in steroid synthesis in other invertebrate species.

**Table 2**  
Corticosteroid synthesis by invaginated and evaginated cysticerci. The cysticerci were incubated in the presence of  $^3\text{H-P}_4$  for different periods. Data compare the influence of developmental stage on this process. Evaginated parasites doubled the synthesis of this steroid at 12 and 24 h when compared to IC.

RADIOACTIVE PRECURSOR  METABOLITES	TRANSFORMATION RATE EVALUATED IN TWO DEVELOPMENT STAGES OF <i>Taenia crassiceps</i> WFU	
	Invaginated cysticerci	Evaginated cysticerci
$^3\text{H-P}_4$ / DOC		
6 h	0.6 ± 0.1	3.0 ± 0.8**
12 h	18.1 ± 2.6	30.1 ± 3.4**
24 h	18.1 ± 6.5	39.1 ± 3.4**
43 h	39.5 ± 6.4	50.0 ± 3.6**
$^3\text{H-P}_4$ / 11-DEOXYCORTISOL		
6 h	0.25 ± 0.07	0.01 ± 0.2
12 h	1.7 ± 0.7	2.6 ± 1.0
24 h	1.5 ± 2.1	5.0 ± 2.4*
43 h	4.7 ± 2.4	6.9 ± 1.6
$^3\text{H-P}_4$ / CORTICOSTERONE		
6 h	0.1 ± 0.09	0.03 ± 0.06
12 h	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.4
24 h	0.8 ± 0.6	2.5 ± 3.6
43 h	0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.7
$^3\text{H-P}_4$ / 17-OHP <sub>4</sub>		
6 h	0.3 ± 0.2	1.5 ± 0.8*
12 h	1.4 ± 0.5	2.0 ± 1.2
24 h	1.8 ± 0.9	2.2 ± 0.4
43 h	1.4 ± 0.3	2.1 ± 0.7
$^3\text{H-P}_4$ / CORTISOL		
6 h	0.03 ± 0.03	0.18 ± 0.16
12 h	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.2
24 h	0.1 ± 0.7	0.2 ± 0.9
43 h	1.1 ± 1.0	1.7 ± 1.1

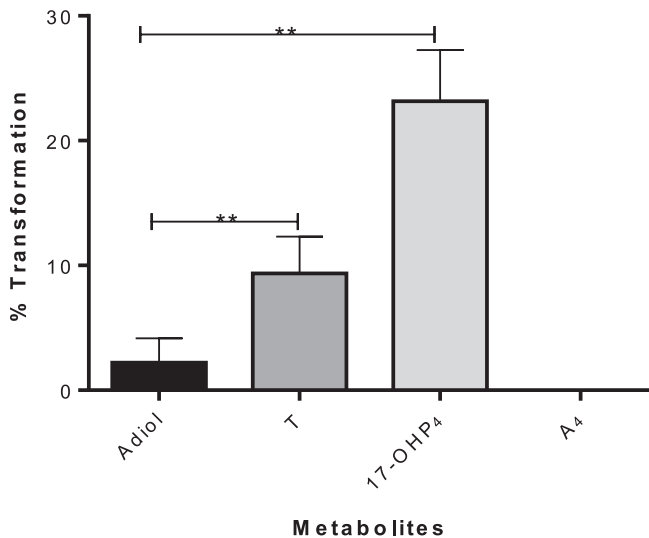
The role of estrogens on the development of silkworm has been reviewed by Das (2016). In *Caenorhabditis elegans*,  $\text{E}_2$  increases the number of germ cells (Hoshi et al., 2003). It has been shown that sex steroid hormones influence the fertility of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and can be prevented by steroid synthesis inhibitors (Morrison et al., 1986). Also, that progesterone, androstenedione and ecdysone increase the length of the swine parasite *Ascaris suum* (Fleming, 1985) and, progesterone stimulates the evagination in *T. solium* cysticerci (Escobedo et al., 2010). It was also shown that progesterone, 17beta-estradiol and testosterone enhanced the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes (Lingnau et al., 1993) and, the addition of testosterone to the culture media enhanced the proliferation of *T. crassiceps* ORF cysticerci (Romano et al., 2003). These data show the importance of sex steroid hormones on invertebrate development, and the increased sex steroid production by EC may be necessary to facilitate the larval-adult tapeworm development.

In mammals, androgens seems to be required for the maturational acquisition of steroidogenic enzymes in the later steps of

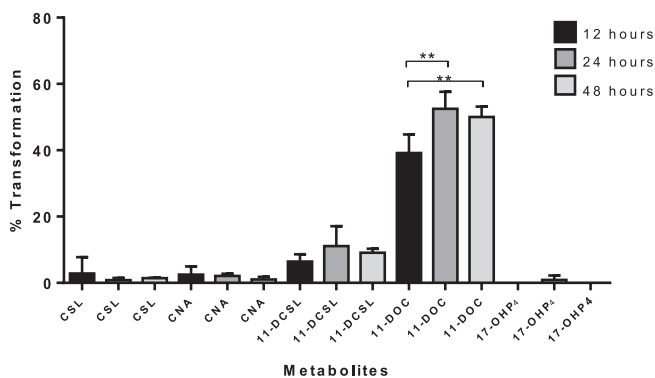
the Leydig cell lineage (Chamindrani Mendis-Handagama and Siril Ariyaratne, 2001) and testosterone is the principal androgen synthesized by the mammalian fetal testis at the time of sexual differentiation and closely correlated to this process (Siiteri and Wilson, 1974). In addition, it has been shown that androgen secretion by the fetal testis is directly involved in sexual differentiation of the genital ducts and external genitalia (Jost, 1970; Wilson and Davies, 2007).

Thereafter, the increase in the amount of testosterone synthesized by EC, could be an important factor for differentiation of worm testis. In addition, androgens as precursors in the estrogen synthesis are important for further development, transiting from IC of *T. crassiceps* WFU toward EC and then, growing into the tapeworms. After 43 h of culture, the transformation was similar in both cysticerci developmental stages, probably due to the evagination of some metacestodes in the IC group.

In support of the possibility that tapeworm steroids can play a critical role for gonad maturation, it is demonstrated that *Caenorhabditis elegans* can reduce the growth of the juvenile size



**Fig. 4.**  $^3\text{H}$ -progesterone ( $^3\text{H-P}_4$ ) metabolism by *Taenia crassiceps* WFU tapeworms. Transformation of  $^3\text{H}$ -Progesterone to sexual steroids by tapeworms incubated for 24 h in the presence of the precursor. Representative experiment repeated 3 times. Each value represents the mean  $\pm$  SD.  $n = 6$  tapeworms individually cultured.



**Fig. 5.** Synthesis of corticosteroids by *Taenia crassiceps* WFU tapeworms. Transformation rate evaluated in *Taenia crassiceps* WFU tapeworms incubated with  $^3\text{H-P}_4$  for 12, 24 or 48 h. Representative experiment repeated 3 times. Data shows mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  tapeworms) \* $P < .05$  of one representative experiment repeated 3 times.

due to mutations in the homologue let-767 and modifications in the steroidogenic enzyme 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) (Desnoyers et al., 2007).

The significant high production of testosterone found in the EC incubated with  $^3\text{H-A}_4$  could be the result of differentiation of stem cells located in the scolex, leading to an increased quantity of cells expressing steroidogenic enzymes. Similarly can explained results obtained from EC incubation in the presence of tritiated progesterone. Stem cells have been described in the scolex of *T. solium* evaginated cysticerci and in adult worms by Merchant et al. (1997), Willms et al. (2001), and, in the scolex of *Echinococcus* (for a review on stem cells in flatworms see Reuter and Kreshchenko, 2004). In *T. solium* evaginated cysticerci and in tapeworms, the neck-derived stem cells proliferate continuously, differentiate and migrate to the tegument and give rise to various cell types (Merchant et al., 1997). Gustaffson (1990) had shown that seven stem cells of *Diphyllobothium dendriticum* differentiate into somatic cells and only one to the gonad cells.

Different functions regulated by the on/off gen stages could be found during the parasite development. For example, in taenid parasite *Echinococcus* some receptors derived from nuclear hormone receptors genes are highly expressed only in the

metacystode and not in all other developmental stages (for a review see Brehm and Kosiol, 2014).

The progressive increase in testosterone production by EC can be explained in part by an increase in the activity of enzymes that synthesize testosterone, and a decrease in the activity of an enzyme that metabolizes testosterone and its precursors, as described by Shan et al., (1993) for the rat testis.

We have previously shown that the addition of corticosteroids to the culture media enhanced estrogen synthesis by *T. crassiceps* WFU cysticerci (Hinojosa et al., 2011). Our current data indicates that EC almost double the DOC synthesis as compared to the invaginated parasites, and that the tapeworms synthesize even more DOC than EC. Reported in the literature referred DOC as a potent mineralocorticoid and also as a glucocorticoid present in mammals and other vertebrates (Brookes et al., 2012). Cysticerci are highly dependent on glucose availability; therefore the greater synthesis of this steroid in EC and adult worms could be important for the parasite development. In addition, DOC modulates the ion exchange through  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in mammals and fishes, and therefore can fulfill requirements in the worm osmoregulation. As shown by Willms et al. (2004) *T. solium* cysticerci do express a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. The glucocorticoid activity of DOC could be also useful to control the host immune response and, therefore facilitate the survival of parasites in the host tissues (Romano et al., 2015).

The present study describes for the first time the capacity of *T. crassiceps* WFU worms to synthesize sex steroids. Results of this study using tritiated progesterone and androstenedione as precursors, strongly suggest that the parasite has the enzymes involved in the  $\Delta 4$  and  $\Delta 5$  biosynthetic pathways from the progesterone to androgens, as well as an aromatizing enzyme similar to that of the vertebrates. Results presented here also show for the first time that *T. crassiceps* WFU tapeworms synthesize corticosteroids when incubated in the presence of tritiated progesterone and use the  $\Delta 4$  steroidogenic pathway to synthesize sex steroids. The more abundant corticosteroid found in the three development stages was DOC, a steroid that could have mineralocorticoid and glucocorticoid functions in the parasites.

## Acknowledgments

M. Patricio received a PhD fellowship from CONACyT, Mexico. We thank MVZ Enrique Pinzón Estrada for supervision in handling of laboratory animals.

## Conflict of Interest statement

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

- Aceves-Ramos, A., de la Torre, P., Hinojosa, L., Ponce, A., García-Villegas, R., Bobes, R., J. Romano, M.C., 2014. Cloning, characterization and functional expression of *Taenia solium* 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 186–192.
- Azhar, S., Reaven, E., 2002. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 195, 1–26.
- Barthelemy, M., Gabrion, C., Petit, G., 2004. Reduction in testosterone concentration and its effect on the reproductive output of chronic malaria-infected male mice. *Parasitol. Res.* 93 (6), 475–481.
- Bondesson, M., Hao, H., Yo-Lin, Ch., Williams, C., Gustaffson, J.A., 2015. Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 142–151.
- Brehm, K., Kosiol, U., 2014. On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development. *Parasite*, 21–72.
- Brookes, J.C., Galigniana, M.D., Harker, A.H., Stonehan, A.M., Vinson, G.P., 2012. System among the corticosteroids: specificity and molecular dynamics. *J. R. Soc. Interface* 9 (66), 43–53.

- Chamindrani Mendis-Handagama, S.M.L., Siril Ariyaratne, H.B., 2001. Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.* 65 (3), 660–671.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 259–284.
- Coutinho, A.E., Chapman, K.E., 2011. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* 335 (Issue 1), 2–13.
- Craig, W.R., William, W., James, A., 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (3), 476–488.
- Das, S., 2016. Vertebrate hormones in insect: the role of estrogen in silkworm – a review. *Turk. J. Zool.* 40, 297–302.
- De Loof, A., Boerjan, B., Ernst, U.R., Schoofs, L., 2013. The mode of action of juvenile hormone and ecdysone: towards an epi-endocrinological paradigm? *Gen. Comp. Endocrinol.* 188, 35–45.
- Desnoyers, S., Pierre-Gilles, B., St-Laurent, J.F., Gagnon, S.N., Baillie, D.L., Luu The, V., 2007. *Caenorhabditis elegans* LET-767 is able to metabolize androgens and estrogens and likely shares common ancestor with human types 3 and 12 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Endocrinol.* 195, 271–279.
- Escobedo, G., Camacho-Arroyo, I., Hernández-Hernández, O.T., Ostoa-Saloma, P., García-Varela, M., Morales-Montor, J., 2010. Progesterone induces scolex evagination of the human parasite *Taenia solium*: Evolutionary implications to the host–parasite relationship. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 591079.
- Fernández Presas, A., Robert, M.L., Jiménez, J.A., Willms, K., 2005. Apoptosis patterns in experimental *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* strobilae from golden hamsters. *Parasitol. Res.* 96, 1–5.
- Fernández-Presas, A.M., Valdez, R.A., Willms, K., Romano, M.C., 2008. The key steroidogenic enzyme 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU). *Parasitol. Res.* 103 (4), 847–852.
- Fleming, M.W., 1985. *Ascaris suum*; role of ecdysteroids in molting. *Exp. Parasitol.* 60, 207–210.
- Francois, A., Favennec, L., Cambon-Michot, C., Gueit, I., Biga, N., Tron, F., Brasseur, P., Hemet, J., 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *Am. J. Surg. Pathol.* 22, 488–492.
- Garcia, H.H., Moro, P.L., Schantz, P.M., 2007. Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20, 489–494.
- Gustaffson, M.K.S., 1990. The cells of a cestode. *Diphyllobothrium* as a model in cell biology. *Acta Acad. Abo. Ser. B* 50, 13–44.
- Hinojosa, L., Valdez, R.A., Salvador, V., Rodriguez, A.G., Willms, K., Romano, M.C., 2011. The effect of corticosteroids on sex steroid synthesis in cultured *Taenia crassiceps* Wake Forest University (WFU) cysticerci. *J. Helminthol.* 86, 465–469.
- Hoshi, H., Kamata, Y., Uemura, T., 2003. Effects of 17 $\beta$ -estradiol, bisphenol A and tributyltin chloride on germ cells of *Caenorhabditis elegans*. *J. Vet. Med. Sci.* 65 (8), 881–885.
- Jimenez, P., Valdez, R.A., Romano, M.C., 2006. Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99, 203–208.
- Jost, A., 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 259, 119–130.
- Kraemer, F.B., Shen, W.J., Harada, K., Patel, S., Osuga, J., Ishibashi, S., Azhar, S., 2004. Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesterol ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol. Endocrinol.* 18, 549–557.
- LaFon, R., 2000. The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology* 9 (1–2), 41–57.
- Lingnau, A., Margos, G., Maier, W.A., Seitz, H.M., 1993. The effects of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Appl. Parasitol.* 34, 153–160.
- Manna, P.R., Dyson, M.T., Stocco, D.M., 2009. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 321–333.
- Merchant, M.T., Corella, C., Willms, K., 1997. Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *J. Parasitol.* 83 (3), 363–367.
- Morrison, D.D., Vandee, W.a.E., Bennett, J.L., 1986. Effects of steroids and steroid synthesis inhibitors on fecundity of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J. Chem. Ecol.* 12, 1901–1908.
- Reuter, M., Kreshchenko, N., 2004. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can. J. Zool.* 82, 334–356.
- Reyes, H., Jose-Luis, Leung, G., McKay, D.M., 2013. Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *Int. J. Parasitol.* 43 (3–4), 233–243.
- Romano, M.C., Jiménez, P., Miranda-Brito, C., Valdez, R.A., 2015. Parasites and steroid hormones: corticosteroid and sex steroid synthesis, their role in the parasite physiology and development. *Front. Neurosci.* 9, 224.
- Romano, M.C., Valdez, R.A., Cartas, A.L., Gómez, Y., Larralde, C., 2003. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 221–225.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Shan, L.X., Phillips, Bardin, C.W., Hardy, M.P., 1993. Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology* 133 (5), 2277–2283.
- Siitleri, P.K., Wilson, J.D., 1974. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38 (1), 113–125.
- Stien, A., Voutilainen, L., Haukialmi, V., Fuglei, E., Mørk, T., Yoccoz, N.G., Ims, R.A., Henttonen, H., 2010. Intestinal parasites of the Arctic fox in relation to the abundance and distribution of intermediate hosts. *Parasitology* 137, 149–157.
- Swevers, L., Lambert, J.G., De Loof, A., 1991. Synthesis and metabolism of vertebrate-type steroids by tissues of insects: a critical evaluation. *Experientia* 47 (7), 687–698.
- Tremblay, J.J., 2015. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103, 3–10.
- Valdez, R.A., Jiménez, P., Cartas, A.L., Gómez, Y., Romano, M.C., 2006. *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens in vitro. *Parasitol. Res.* 98, 472–476.
- Valdez, R.A., Hinojosa, L., Willms, K., Romano, M.C., 2012. *Taenia crassiceps* WFU cysticerci synthesize corticosteroids in vitro: Metirapone regulates the production. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 409–414.
- Willms, K., Merchant, M.T., Gómez, M., Robert, L., 2001. *Taenia solium*: germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. *Archives of Medical Research. Arch. Med. Res.* 32 (1), 1–7.
- Willms, K., Shoemaker, C.B., Skelly, P.J., Landa, A., 2004. Cloning and expression of a Na(+), K(+)-ATPase alpha-subunit from *Taenia solium* (TNaK1alpha). *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 79–82.
- Willms, K., Zurabian, R., 2010. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* 137, 335–346.
- Willms, K., Caro, J.A., Robert, L., 2003. Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidae, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitol. Res.* 90 (6), 479–488.
- Wilson, C.A., Davies, D.C., 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 133, 331–359.
- Zurabian, R., Aguilar, L., Jiménez, J.A., Robert, L., Willms, K., 2008. Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. *J. Parasitol.* 94 (1), 1–6.