



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

“Evaluación del efecto de la infección por cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica en ratonas Balb/c”

Tesis que presenta:

M. en C. Arlet Veloz Contreras

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias

En la especialidad de Fisiología Celular y Molecular

Directora de tesis:

Dra. Marta C. Romano Pardo

CÓMITE ACADÉMICO:

Directora de tesis

Dra. Marta C. Romano Pardo

Asesores internos

Dra. María Eugenia Del Carmen Mendoza Garrido

Dr. Arturo Ponce Balderas

Asesores externos

Dra. Emma S. Calderón Aranda

Dr. Raúl José Bobes Ruíz

Este trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), bajo la dirección de la Dra. Marta C. Romano Pardo. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo de la beca de Doctorado de Conacyt No. 407505.

RESUMEN

La infección en el modelo murino con el cisticerco de *Taenia crassiceps* WFU (*T. crassiceps* WFU) es ampliamente utilizado como modelo experimental para comprender mejor la cisticercosis humana producida por *Taenia solium*. Varios reportes indican que el ambiente hormonal del huésped determina la susceptibilidad y la gravedad de muchas infecciones parasitarias. Las hembras son más susceptibles a la infección con cisticercos de *T. crassiceps*, lo que sugiere que un ambiente rico en estrógenos facilita su reproducción. Los andrógenos y estrógenos en el ovario son sintetizados por las enzimas P450-aromatasa y 17 α -hidroxilasa/17, 20 liasa (P450c17). El objetivo de este estudio fue determinar utilizando ratones como modelo, efecto de la infección crónica intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps* WFU en el desarrollo folicular ovárico así como los cuerpos lúteos como indicadores de ovulación, la expresión en el ovario de las enzimas P450c17 y la P450-aromatasa, enzimas clave en la esteroidogénesis ovárica y la concentración de 17 β -estradiol y androstenediona en suero. Para realizar este estudio, los ovarios y el suero se obtuvieron de ratonas infectadas con cisticercos de *T. crassiceps* con dos, cuatro y seis meses post-infección, y fueron comparados con los de animales sanos. Los ovarios fueron fijados y procesados para histología o lisados con amortiguador RIPA para Western blot, utilizando anticuerpos específicos para P450c17 y P450-aromatasa. La medición de la concentración en suero de 17 β -estradiol y androstenediona se realizó por ELISA. Los resultados mostraron que la infección con cisticercos de *T. crassiceps* WFU redujo significativamente el número de folículos primordiales y primarios después de 2 meses de infección. Durante el curso de la infección, disminuyó el número de cuerpos lúteos, mientras que los folículos en atresia aumentaron. La expresión en el ovario de P450c17 y P450-aromatasa así como la concentración de estradiol y androstenediona sérica aumentó significativamente en el grupo de infección comparado con el control. Estos resultados muestran que la infección crónica con *T. crassiceps* WFU altera la función reproductiva de las hembras.

ABSTRACT

The murine infection with *Taenia crassiceps* WFU (*T. crassiceps* WFU) cysticerci has been widely used as an experimental model to better understand human cysticercosis. Several reports have established that the host hormonal environment determines the susceptibility and severity of many parasite infections. Female mice are more susceptible to infection with *T. crassiceps* cysticerci suggesting that a rich estrogen environment facilitates their reproduction. Ovarian androgens and estrogens are synthesized by key enzymes as P450-aromatase and 17 α -hydroxylase/17, 20 lyase (P450_{C17}). The aim of this study was to determine the effect of chronic intraperitoneal infection of *T. crassiceps* WFU cysticerci on mice ovarian follicular development, ovulation, the expression of ovarian P450-aromatase and P450_{C17}, and serum 17 β -estradiol, key enzymes of the ovarian steroidogenic pathway. To perform this study ovaries and serum were obtained at two, four and six months from *T. crassiceps* WFU cysticerci infected mice, and compared to those of healthy animals. The ovaries were fixed and processed for histology or lysed in RIPA buffer for Western blot using specific antibodies for P450_{C17} and P450-aromatase. 17 β -estradiol and androstenedione serum concentration, was measured by ELISA. The results showed that the infection with *T. crassiceps* WFU cysticerci significantly reduced the number of primordial and primary follicles after two months of infection. Through the course of the study, the corpus luteum number began to decrease, whereas atretic follicles increased. The expression of ovarian P450_{C17} and P450-aromatase as well as serum estradiol and androstenedione concentration were significantly increased in the infected group compared to control. These findings show that chronic infection with *T. crassiceps* WFU may alter the reproductive functions of the female mice host.

DEDICATORIAS

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional.

A mis tías que me apoyaron a lo largo de este periodo.

A Liliana Reyes.

AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño y respeto agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Marta C. Romano Pardo por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza, su tiempo, enseñanza, y dedicación durante el desarrollo de este trabajo, gracias por todo su apoyo, es una gran persona y gran tutora.

A la Dra. María Eugenia Mendoza Garrido por su apoyo, sus sugerencias y comentarios para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. José Luna Muñoz por su apoyo, sus consejos, sus platicas, por el asesoramiento para la realización de diversas técnicas empleadas, sus sugerencias y comentarios, así como el permitirme el acceso a su laboratorio para la realización de algunas técnicas. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Emma S. Calderón Aranda por sus comentarios y sugerencias para el desarrollo del proyecto, por todo el apoyo y confianza que me ha otorgado así como el permitirme trabajar en su laboratorio, por el asesoramiento para la realización de técnicas empleadas. Muchas gracias por hacerme sentir parte de su laboratorio.

Al Dr. Raúl José Bobes por sus consejos y comentarios para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Arturo Ponce por sus consejos y comentarios para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez por permitirme trabajar en su laboratorio así como sus sugerencias para el desarrollo de técnicas empleadas.

A Amparo Viramontes por sus sugerencias y asesoramiento para la realización de diversas técnicas empleadas.

Al Dr. Antonio Mondragón por el asesoramiento para la realización de diversas técnicas empleadas en este trabajo.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al CINVESTAV-IPN

A la unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) por proporcionarme los animales de laboratorio necesarios para la realización de este trabajo.

Al Auxiliar de Investigación Biol. Ricardo Valdéz por su apoyo en las metodologías.

A Marisol Bautista y Gabriel Vargas por su apoyo técnico en el laboratorio.

A Luz María Buendía por su apoyo secretarial y sus buenos consejos.

A mis compañeros de laboratorio por transmitirme sus conocimientos y buenos consejos.

A mis amigos del laboratorio: Martín Orozco, Toño y Brenda.

A mis amigos: Liliana, Yazmin, Chema y Beto por su compañía, consejos y buenos momentos.

A Liliana Reyes por sus consejos, opiniones, cariño y apoyo durante todo este tiempo, así como las enseñanzas en diversas técnicas, gracias por hacer más agradable esta etapa.

A mis padres que son un ejemplo a seguir, gracias por todo su apoyo y cariño. Por estar a mi lado en todos los momentos de mi vida.

A mi hermana Areli que es un ejemplo a seguir, gracias por tus consejos, el cariño y enseñanza, te quiero y admiro.

A mis tías Mary y Elvia que siempre estuvieron apoyándome.

A todas las ratonas que se utilizaron para la realización de este proyecto.

Índice General

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIAS	v
A mis padres y hermana por su apoyo incondicional.	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cisticercosis	1
1.1.2 Biología del parásito	1
1.1.3 Mecanismos de infección.....	3
1.2 Epidemiología de la cisticercosis.....	5
1.2.1 Factores de riesgo	6
1.3 Taenia Crassiceps.....	7
1.4 Efectos en la reproducción por la infección con parásitos intestinales.....	9
1.4.1 Efectos en la reproducción por la infección con T.crassiceps	10
1.5 Síntesis de esteroides por parásitos.....	10
1.6 Ovario y oviducto	12
1.6.1 Anatomía y fisiología.....	12
1.6.2 Foliculogénesis	14
1.6.3 Ovulación y fertilización.....	15
1.6.4 Esteroidogénesis Ovárica.....	16
1.6.5 Enzimas clave en la esteroidogénesis ovárica	18
1.6.5.1 P450-aromatasa.....	18
1.6.5.2 P450c17.....	20
1.7. Justificación	22
1.8. Hipótesis	22
1.9. Objetivos.....	23
1.9.1 Objetivo general.....	23
1.9.2 Objetivos específicos	23
2. METODOLOGÍA.....	24
2.1 Reactivos.....	24
2.2 Diseño experimental	26
2.3 Modelo animal	27
2.4 Histología de tejidos	27
2.5 Evaluación histológica del ovario	28
2.5.1 Conteo de los folículos ováricos	28
2.6 Conteo de cuerpos lúteos y medición de las microvellosidades ciliadas del oviducto ..	29
2.7 Cuantificación de Hormonas sexuales por ELISA	29
2.8 Expresión de 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa y aromatasa por Western blot.....	30
2.9 Análisis de resultados.	31

3. RESULTADOS.....	31
3.1 La infección peritoneal con cisticercos de T.crassiceps WFU no afecta el peso corporal de las ratonas.....	31
3.2 La infección peritoneal con cisticercos de T.crassiceps WFU altera la foliculogénesis ovárica.....	32
3.3 La infección con cisticercos de T.crassiceps WFU disminuye el número de cuerpos lúteos.....	34
3.4 Efecto de la infección con cisticercos de T. crassiceps en el largo de los cilios de las células ciliadas del oviducto de la ratona.....	35
3.5 Efecto de la infección con T.crassiceps en la expresión de P450-aromatasa y P450 _{c17} en el ovario.....	36
3.6 La infección de las ratonas con T.crassiceps WFU incrementó significativamente la concentración sérica de estradiol y de androstenediona.....	38
4. DISCUSIÓN.....	40
5. CONCLUSIONES.....	47
6. PERSPECTIVAS.....	47
7. REFERENCIAS.....	48
ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cisticercos de <i>T. solium</i> de un cerdo infectado (Willms 2008).....	2
Figura 2. Escólex de la <i>T. solium</i>	2
Figura 3. Ciclo de vida <i>T.solium</i>	4
Figura 4. Mapa de las áreas donde la cisticercosis es endémica.....	5
Figura 5. Incidencia de Cisticercosis en México en el 2005.	6
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> . (Willms & Zurabian 2010).	8
Figura 7. Características del ovario (Carson 2014)	13
Figura 8. Estadios del desarrollo folicular (Hernández-Ochoa et al., 2010).	15
Figura 9. Regulación de la esteroidogénesis en el ovario (Drummond AE, 2006).	17
Figura 10. Evaluación del efecto de la infección por cisticercos <i>T.crassiceps</i> en ovarios de ratonas infectadas y no infectadas.....	27
Figura 11. Peso corporal y de la carcasa de ratones sanos e infectados con cisticercos de <i>T.crassiceps</i> durante el curso de la infección.....	32
Figura 12. Efecto de la infección con <i>T. crassiceps</i> WFU en el número de folículos ováricos.	34
Figura 13. Efecto de la infección con <i>T.crassiceps</i> WFU en el número total de cuerpos lúteos en el ovario.....	35
Figura 14. Efecto de la infección con <i>T.crassiceps</i> WFU en la longitud de los cilios las células ciliadas del oviducto.	36
Figura 15. Análisis por western blot de la expresión de P450-aromatasa en ovarios de ratonas del grupo control y grupo de infección.	37
Figura 16. Análisis por Western blot de la expresión de P450c17 en ovarios de ratonas del grupo control y grupo de infección.....	37
Figura 17. Concentración de estradiol en suero.....	38
Figura 18. Concentración de androstenediona en suero.	39
Figura 19. Resumen de resultados.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A₄	Androstenediona
BSA	Albúmina de suero bovino
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CICUAL	Comité interno para el cuidado y uso de los animales del laboratorio
EE	Error Estándar
E₂	Estradiol
ERKs	cinasas reguladas extracelularmente
FAD	Adenina Flavina
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FSHr	Receptor de la Hormona Folículo Estimulante
FMN	Mono nucleotido de Flavina
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
HRP	Peroxidasa de Rábano
LH	Hormona Luteinizante
LHr	Receptor de la Hormona Luteinizante
MAPKs	Cinasas Activadas por Mitogenos
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaF	Fluoruro de Sodio
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotido fosfato
NCC	Neurocisticercosis
PI3K	cinasa fosfatidilinositol-3
POR	P450 oxidoreductasa
PBS	Buffer Fosfata Salino
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno

SDS	Dodecilsulfato Sódico
SOP	Síndrome del Ovario Poliquístico
StAR	Proteína Esteroidogénica de Regulación aguda
<i>Tc</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
<i>Ts</i>	<i>Taenia Solium</i>
TLC	Cromatografía de Capa Fina
UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio
WFU	Wake Forest University
3b-HSD	3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa
17b-HSD	17 beta-hidroxisteroide deshidrogenasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Cisticercosis*

Cisticercosis es una enfermedad causada por la etapa larval de cestodos de la familia *Taenidae* que afecta varios huéspedes incluyendo el humano. La cisticercosis causada por *Taenia solium* (*T.solium*) es un importante problema de salud pública especialmente en México, Centroamérica y Sudamérica, y es endémica en muchos de los países subdesarrollados, en donde el saneamiento ambiental es deficiente, debido a que los parásitos se reproducen fácilmente produciendo miles de huevos que son infectivos en humanos y en el cerdo (principal huésped intermediario) (Willms, 2008). La Neurocisticercosis (NCC), definida como la infección inflamatoria crónica del sistema nervioso central, causada por la larva del parásito *T.solium* (Valdéz et al., 2006).

La teniasis es una infección intestinal provocada por la *Taenia* adulta. El agente causal de la cisticercosis humana y porcina es el metacestodo o cisticerco de la *T.solium*. Las infecciones humanas más importantes por cestodos *Taenia* son las causadas por *Ts* (*Taenia* del cerdo) y *Taenia saginata* (*Taenia* del vacuno) siendo esta última de menor repercusión en el ser humano. Las personas que ingieren carne de cerdo mal cocida desarrollan una teniasis intestinal y se convierten en huéspedes definitivos.

1.1.2 *Biología del parásito*

El cisticerco es una forma intermediaria o larvaria en el desarrollo del parásito, la que sigue al embrión hexacanto (con seis ganchos), antes de convertirse en el gusano adulto. El estadio larvario de *T.solium* es una vesícula translúcida llena de líquido, que llega a medir de 0.5 a 2.0 cm de diámetro (Figura 1), contiene un escólex invaginado, que posee 4 ventosas y un róstelo con dos filas de ganchos. En cultivo *In vitro* los cisticercos viables presentan continuos movimientos lentos de contracción y relajación, debido a la doble capa de fibras musculares, situadas debajo de la superficie del tegumento. La superficie de la larva es un tegumento sincitial cubierto con proyecciones digitiformes llamadas microtricas que son utilizadas por el parásito para tomar los nutrientes del tejido intersticial del huésped (Willms, 2008).

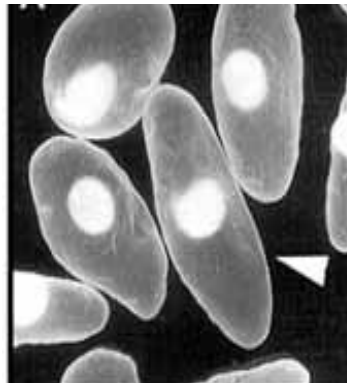


Figura 1. Cisticercos de *T. solium* de un cerdo infectado (Willms 2008)

En su forma adulta, *T. solium* como otras especies del género *Taenia* (familia tenidae orden Cyclophyllidea, clase Cestoda) son gusanos aplanados. En condiciones naturales la *T. solium* habita únicamente en el intestino delgado del ser humano, está constituida por un escólex o cabeza, que en su parte inferior se adelgaza para formar un cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos, la *T. solium* normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud; el escólex posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos (Figura 2), el número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 32. Tanto las ventosas como el róstelo son estructuras de fijación que capacitan a la *Taenia* para mantenerse anclada en la pared del yeyuno. El proceso de estrobilación (producción de proglótidos) ocurre en la región distal del cuello. Los proglótidos son segmentos independientes pero unidos entre sí; están recubiertos por un tegumento con microtricas en su superficie exterior, constituyendo un tejido sincitial con funciones de secreción y absorción (Larralde & Aluja 2007).

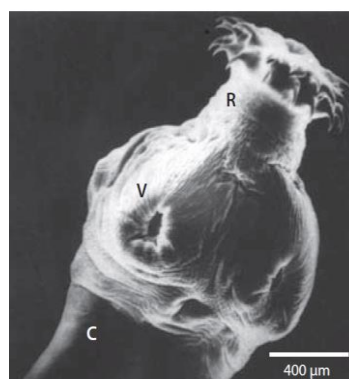


Figura 2. Escólex de la *T. solium*. C: cuello, R: rostelo, V: ventosas (Larralde & Aluja 2007).

Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados; a su vez, los más distantes están totalmente diferenciados y contienen un gran número de huevecillos (aproximadamente 50 000 cada uno), nombrados grávidos (Larralde & Aluja 2007). Los proglótidos grávidos, desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (en promedio de cuatro o cinco por día), son evacuados hacia el exterior en las heces del huésped. Cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad reproductora independiente, puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos.

Los genitales masculinos se desarrollan primero y están constituidos por un gran número de testículos (275 a 575) que confluyen en un ducto genital que a su vez desemboca por un costado del proglótido en el atrio (Willms & Robert 2007).

Los genitales femeninos están constituidos por un ovario trilobulado situado en la base del útero en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca a través de la vagina en el atrio genital. El útero de los proglótidos grávidos muestra de siete a 15 ramas laterales llenas de huevecillos. Cada una de las ramas puede presentar subramificaciones.

Los huevecillos de la *T.solium* son esféricos y miden 20-40 μm , son morfológicamente similares a los de otras especies de tenidos, poseen varias envolturas que posibilitan la supervivencia de la oncosfera en el medio. La envoltura más externa es el vitelo o cápsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio. La siguiente envoltura es el embrióforo, formado por pequeños bloques proteicos unidos entre sí. Esta envoltura, además de ser la más importante en la protección de la oncosfera, confiere a los huevecillos su apariencia estriada característica. A su vez, el embrióforo es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embriofoal. Finalmente, la membrana oncosferal rodea directamente al embrión hexacanto (Larralde & Aluja 2007).

1.1.3 Mecanismos de infección

La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevos de la *T.solium*, es propiciada por deficiente higiene personal, de alimentos y domiciliaria en el manejo de las excretas humanas y en particular por la convivencia con un portador del gusano adulto. Una vez en el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas proteolíticas y sales biliares proveen la señal para la activación del embrión hexacanto. Los embriones activados penetran la pared

intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos.

El ciclo se completa cuando el ser humano ingiere cisticercos vivos presentes en la carne cruda o insuficientemente cocida proveniente de un cerdo cisticercoso. Las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares del huésped, nuevamente participan en la activación, ahora del cisticerco, induciendo la evaginación del escólex y su fijación en la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una *Taenia* adulta productora de proglótidos gravidos (Figura 3) (Larralde & Aluja 2007). El gusano adulto se fija fuertemente a la mucosa de la pared intestinal, causando poca inflamación en el sitio de implantación sin causar daño al intestino. La teniasis se caracteriza porque el individuo presenta síntomas como dolor abdominal, distensión, diarrea, y náuseas; sin embargo no se atribuyen solamente a la infección con *T.solium* ya que frecuentemente cursa asintomáticamente. El tiempo de vida del gusano adulto de *T.solium* se estima de 20-25 años (García et al., 2003).

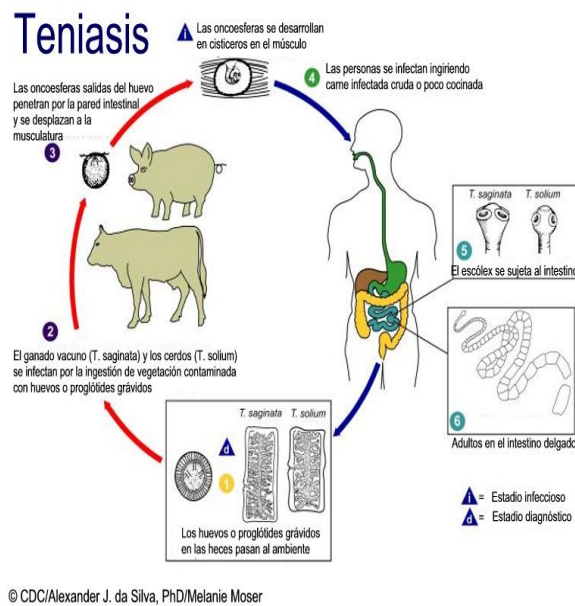


Figura 3. Ciclo de vida *Ts*. FUENTE: Centro de control y prevención de enfermedades CDC.

1.2 Epidemiología de la cisticercosis

NCC es la principal causa de la aparición de crisis epilépticas en personas mayores de 25 años en países donde *T.solium* es endémica, y también es una causa importante de convulsiones en grupos de edad pediátrica. La NCC se estima que causa al menos 50 000 muertes anualmente. La enfermedad es endémica en Sudamérica, Brasil, China, Indonesia, México y centro América (Figura 4) (OMS, 2010; Román et al. 2000).

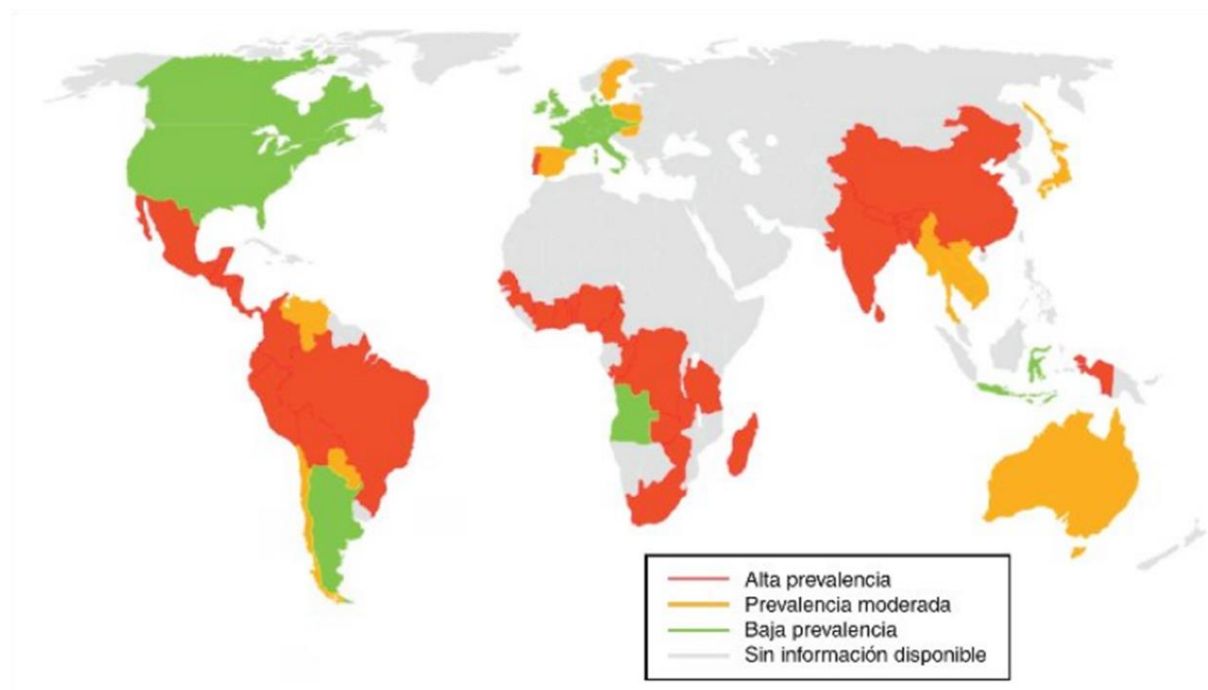
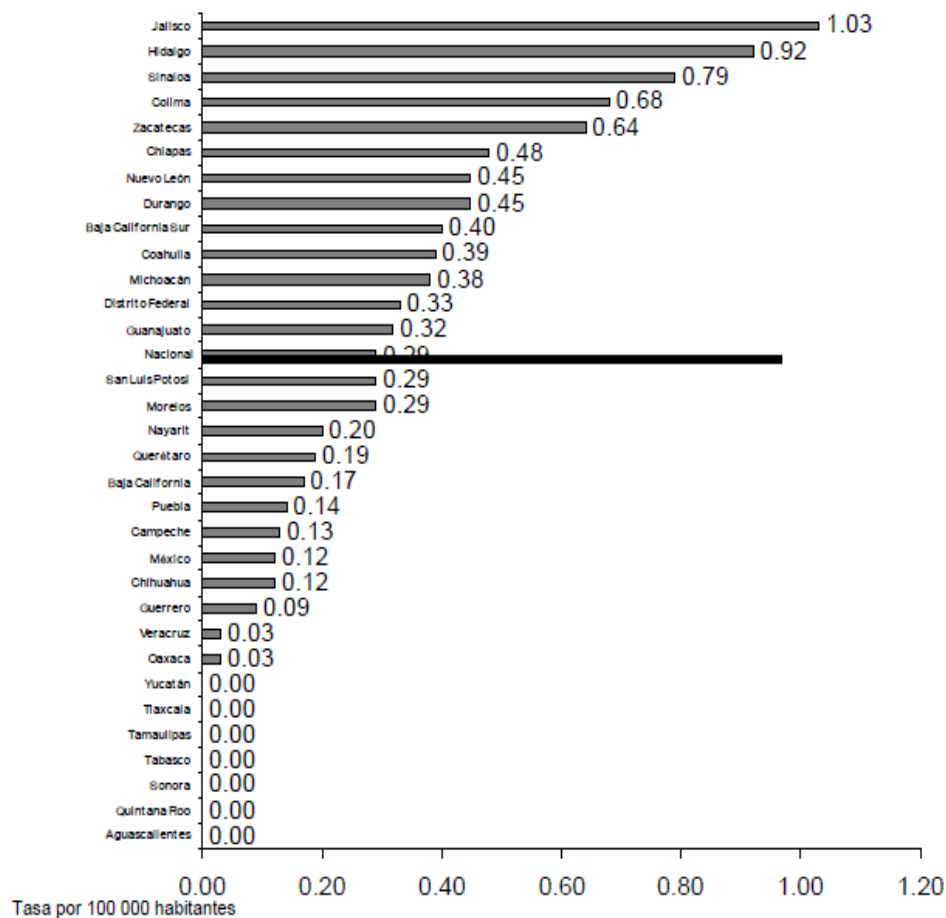


Figura 4. Mapa de las áreas donde la cisticercosis es endémica. Países que representan las zonas donde se han reportado casos de cisticercosis (OMS, 2010).

En México, la cisticercosis humana se convirtió en una enfermedad notificable en 1990. En 1993, 681 casos fueron notificados. La distribución por edad de los grupos con cisticercosis fue: entre 25-44 años (286 casos), 45-64 años (139 casos), y 15-24 años (110 casos); se notificaron 99 casos (15%) en niños menores de 15 años (Román et al., 2000).

En 13 estados de la república (40%) existe un registro de cisticercosis, por arriba de la incidencia nacional la cual es de 0.29 por cada 100 000 habitantes, los estados más afectados son: Jalisco, Hidalgo, Sinaloa, Colima, Zacatecas, Chiapas, Nuevo León, Durango, Baja California, Coahuila, Michoacán, Distrito Federal y Guanajuato. (Figura 5), aunque otros como Guerrero, Veracruz y Oaxaca también presentan casos reportados (Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, 2005).



FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología.

Figura 5. Incidencia de Cisticercosis en México en el 2005. FUENTE: sistema único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología.

La epilepsia causada por NCC consecuentemente representa gasto para el desarrollo del país en términos de sufrimiento humano, baja producción, el costo de anticonvulsivos y la utilización de recursos médicos. La NCC también causa hidrocefalia, pérdida de la visión, demencia y otros problemas neurológicos (Román et al., 2000).

1.2.1 Factores de riesgo

La cisticercosis debida a *T.solium* es una enfermedad en la que a pesar que la mayoría de los libros de parasitología se muestra el ciclo de vida, que incluye al ser humano como hospedero definitivo y el cerdo como hospedero intermediario, sólo en la última década, se identificó con precisión al principal factor de riesgo para adquirir la cisticercosis, que es el portador de

T.solium en casa o el ambiente cercano. Los factores de riesgo identificados son: la historia de liberación de proglótidis de tenia, consumo de carne de cerdo infectada, mala higiene personal, historia de crisis convulsivas de inicio tardío y fecalismo a ras de suelo (Larralde & Aluja 2007).

1.3 Taenia Crassiceps

Taenia crassiceps (*T.crassiceps*) es un parásito cuyo principales huéspedes son los zorros, lobos y perros. Se ha encontrado infección de *T.crassiceps* en el topo campesino, la marmota, así como en ratones de campo. En los animales infectados se ha encontrado el parásito en el tejido subcutáneo, el peritoneo y en la cavidad pleural.

Se ha reportado que *T.crassiceps* tiene una alta capacidad reproductiva, el ciclo de vida de este parásito comienza cuando un zorro o perro alberga el gusano adulto en el intestino delgado, de donde se liberan los huevos infectivos en las heces y cuando son ingeridos por roedores silvestres, las oncosferas atraviesan el epitelio intestinal de los mismos y se alojan en los tejidos diferenciándose en una larva o cisticerco (Figura 6). Estos cisticercos pueden ser obtenidos de la cavidad peritoneal de estos animales. Los cisticercos así obtenidos se pueden inyectar en la cavidad peritoneal de ratones de laboratorio en donde se reproducen por gemación y así mantenerse indefinidamente por sub-inoculación serial (Willms & Zurabian 2010).

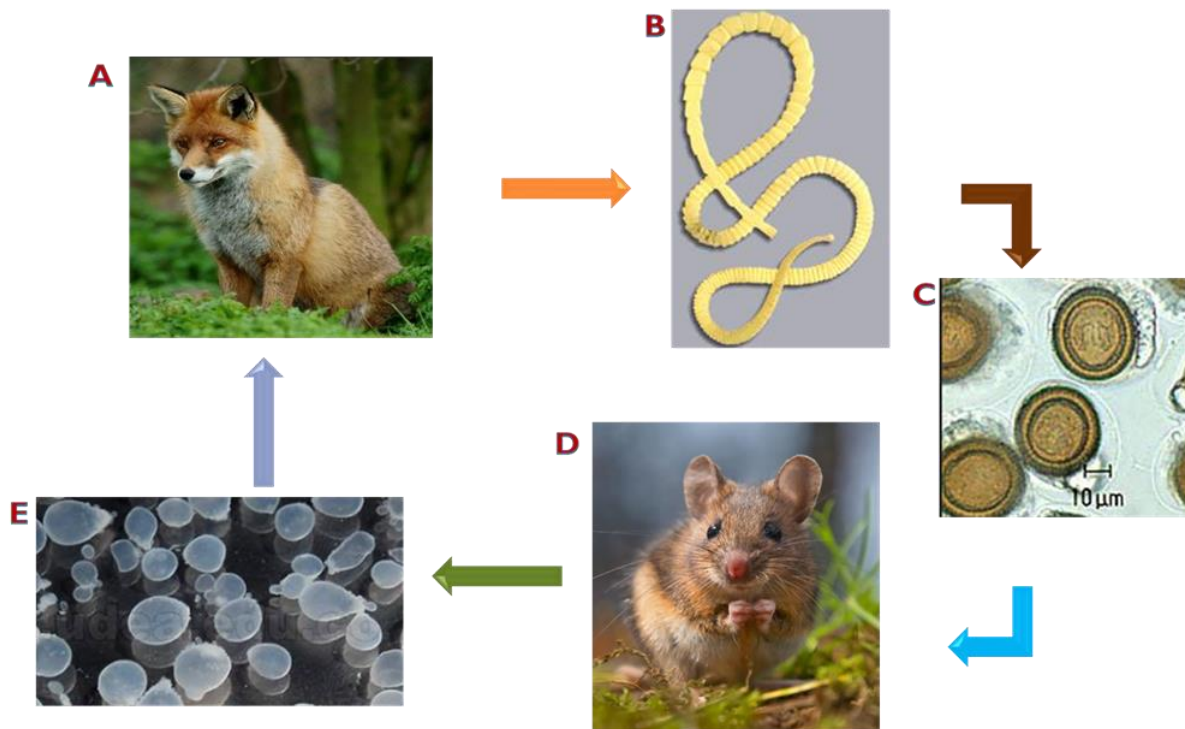


Figura 6. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. (A) Huésped definitivo; (B) Gusano adulto de *T.crassiceps*; (C) Huevecillos infectivos liberados en las heces; (D) Ingestión de huevecillos por huésped intermediario; (E) Desarrollo de la larva en el huésped intermediario, que si es ingerido por el huésped definitivo de desarrolla en gusano adulto en el duodeno del mismo. (Willms & Zurabian 2010).

Es de particular interés para la investigación en la biología de los ténidos, la capacidad que tiene el estadio larval de *T.crassiceps* de multiplicarse asexualmente por gemación en el hospedero intermediario. Aproximadamente 11 de 45 especies de ténidos presentan reproducción asexual en el estadio metacestodo, y por lo tanto es un modelo experimental de gran utilidad en el laboratorio. La cepa ORF no presenta escólex, mientras que la cepa WFU lo tiene invaginado como sucede en la cisticercosis de *T. solium*.

Los cisticercos de la cepa *T. crassiceps* WFU, así como las tenias adultas son ampliamente utilizados como modelos experimentales para investigar características relacionadas con la cisticercosis porcina y humana debido a que la parasitosis con este cisticercos comparte propiedades inmunológicas y morfológicas con la parasitosis con *T.solium* (Willms & Zurabian 2010).

Diferentes vías metabólicas así como complejos enzimáticos se han estudiado en *T.crassiceps* WFU en modelos *in vivo* así como *in vitro* y son útiles para conocer la biología

del parásito y sobre todo en la caracterización de la relación huésped-parásito. De igual manera, los diseños experimentales que utilizan este modelo contribuyen a entender mejor las enfermedades causadas por los céstodos (Willms & Zurabian 2010).

1.4 Efectos en la reproducción por la infección con parásitos intestinales

La helmintiasis es una enfermedad frecuente en mujeres que viven en países en desarrollo. Las infecciones por parásitos intestinales, en especial las producidas por gusanos helmintos y por schistosomas, destacan por su efecto negativo en la salud reproductiva (Hotez and Whitham 2014). Se ha observado que la tasa de infección y la de reproducción de los parásitos dependen del sexo del huésped y del tipo de parásito. Estas diferencias en las infecciones parasitarias son un fenómeno biológico de gran importancia en la salud y enfermedad del huésped así como el de la evolución de las especies y éstas se han atribuido principalmente al ambiente hormonal del huésped.

En humanos, algunos helmintos pueden afectar directamente órganos reproductores, por ejemplo *Wuchereria bancrofti* puede causar elefantiasis en los genitales. En estudios en animales y en humanos se ha observado que la infección con parásitos puede tener una influencia negativa en la reproducción del huésped, como ejemplo, inducen alteraciones en el comportamiento sexual, así como menor tamaño de las crías o de la camada, disminución en la tasa de embarazo y pérdida del embarazo. En la mayoría de los casos, el parasitismo reduce la reproducción del huésped o compromete órganos reproductivos, debido a cambios inmunológicos, que pueden alterar la susceptibilidad del hospedero (Blackwell et al., 2015).

En un estudio realizado en 1990, se evaluó el efecto que tiene la infección por el parásito (*Taenia taeniaeformis*) en las funciones reproductivas de la rata hembra y macho: se determinó el ciclo estral por citología vaginal, el porcentaje de apareamiento exitoso y el número de sitios de implantación en el embarazo, así como las concentraciones de testosterona en suero y testículo, respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que después de 5 meses de infección los parámetros se redujeron significativamente, sugiriendo un efecto adverso en la fertilidad tanto de machos como en hembras, el mecanismo por el cual ocurren estas alteraciones no está descrito, sin embargo se puede especular que el parásito puede influir en el perfil endócrino del hospedero de manera directa o indirecta (Lin et al., 1990).

1.4.1 Efectos en la reproducción por la infección con *T.crassiceps*

Se ha observado que en machos infectados con cisticercos de *T.crassiceps* ORF los niveles de 17 β -estradiol en suero aumentan significativamente, mientras la testosterona y la dihidrotestosterona disminuyen aproximadamente el 90% (Larralde et al., 1995).

Se ha observado en hembras infectadas con cisticercos de *T.crassiceps* ORF una relación entre el aumento de la carga parasitaria con respecto al tiempo de infección y una disminución en el peso del útero. Así mismo se observó atrofia en tejido uterino, así como una interrupción del ciclo estral a partir de las 12 semanas de infección; además conforme avanza la infección se observó una disminución en el comportamiento sexual (Arteaga Silva et al., 2009). Se ha descrito que ratones hembras infectadas con cisticercos de *T.crassiceps* ORF por 45 días, presentan un incremento en la tasa de atresia folicular (degeneración de los folículos ováricos) predominantemente en el estadio antral del desarrollo, y un gran número de ovocitos degenerados (Solano et al., 2013). Por lo tanto, es posible que las alteraciones antes mencionadas, causadas por la infección de *T.crassiceps* ORF tengan una importante repercusión en la capacidad reproductiva.

1.5 Síntesis de esteroides por parásitos

La interacción entre el huésped y el parásito es clave para entender la supervivencia del mismo y permite investigar la forma de controlar las infecciones que causan enfermedad en el huésped.

Los parásitos secretan sustancias que causan cambios en los tejidos circunvecinos del hospedero e incluso pueden llegar a la circulación del huésped. Por otro lado el sistema inmune y hormonal del huésped afecta el desarrollo del parásito. Interesantemente, los parásitos pueden regular la respuesta inmune del huésped a través de los productos que secretan en su ambiente; en muchos casos, la presencia de parásitos en el huésped altera el equilibrio endocrino (Romano et al., 2015). En la infección con *T.crassiceps* ORF se observa un aumento de la concentración de IL-6, una citocina que es capaz de estimular la actividad de la P450-aromatasa aumentando así la aromatización de andrógenos a estrógenos. Se sugiere que la IL-6 puede estar relacionada con el mecanismo inmunoendocrino utilizado por el parásito para mantener un ambiente permisivo que facilita el rápido crecimiento en el

huésped, ya que se ha demostrado que los estrógenos favorecen la reproducción del parásito (Larralde et al., 1995).

Se ha demostrado que los cisticercos de *T.crassiceps* ORF y WFU tienen la capacidad de sintetizar esteroides sexuales *in vitro* cuando son cultivados con precursores marcados con tritio.

Se ha reportado que cisticercos de *T.solium* incubados *in vitro* con [H³] androstenediona tienen la capacidad de sintetizar andrógenos y estrógenos. El medio de cultivo de los parásitos así como del blanco (medio de cultivo con el precursor tritiado sin parásitos) se extrajo y fue analizado por cromatografía de capa fina (TLC) en dos sistemas de solventes diferentes. Los resultados muestran que cisticercos de *Ts* transforman [H³] androstenediona a [H³] testosterona de manera dependiente del tiempo de incubación así como a [H³] estrona y [H³] estradiol en menores cantidades (Valdéz et al., 2006, Jimenez et al, 2006).

Se ha observado la presencia de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) en tejidos del cisticercos y del gusano adulto de *T.solium* y *T.crassiceps* WFU utilizando una técnica histoquímica que detecta la actividad enzimática por la presencia de productos de azul de nitro tetrazolio después de ser incubados con el precursor, dehidroepiandrosterona, androstenediol o pregnenolona. Los productos son liberados al medio de cultivo e identificados por TLC. Se observó que los cisticercos y los gusanos adultos tienen la capacidad de sintetizar androstenediol, testosterona y 17β-estradiol. Estos resultados sugieren fuertemente la actividad de la enzima 3β-HSD en los parásitos, necesaria para la síntesis de estrógenos y andrógenos. (Fernández Presas et al., 2008). Asimismo, Valdéz y colaboradores mostraron que los gusanos de *Ts* sintetizan hormonas esteroides *in vitro* (Valdez et al, 2014) y Patricio et al, (2017) mostró que la síntesis de esteroides sexuales y corticosteroides depende de la etapa de desarrollo del *T.crassiceps* WFU.

También se ha demostrado la importancia de los andrógenos y estrógenos en el desarrollo del parásito por el efecto estimulante que tienen en la proliferación (Romano et al. 2008). Aceves Ramos et al., (2013) demostraron que la síntesis de esteroides sexuales así como de corticosteroides de *T.crassiceps* WFU puede bloquearse con la adición de inhibidores enzimáticos esteroideos, por lo tanto la inhibición de su síntesis es un buen comienzo para el desarrollo de nuevos tratamientos en situaciones en donde la inhibición de la esteroidogénesis podría ayudar a controlar la infección.

Se ha descrito que los cisticercos de *T. solium* poseen la enzima 17 β -HSD, que cataliza la transformación de androstenediona a testosterona, la que pertenece a la familia de deshidrogenasas/reductasa; mediante la clonación de la enzima se demostró que comparte características con la 17 β -HSD tipo 3 de otras especies (Aceves-Ramos et al., 2014).

Desde el punto de vista endocrinológico, en el modelo murino el sexo del huésped es importante en la tasa de reproducción de *T. crassiceps*. En una infección temprana, las hembras tienen mayor carga de parásitos en comparación con los machos, pero cuando la infección se vuelve crónica, en los machos aumenta la carga parasitaria. La razón por la que en infecciones tempranas el parásito prefiere el microambiente de la hembra es desconocida. Acerca de este punto se ha reportado que la inhibición de la P450-aromatasa, utilizando fadrozole previene la feminización de los machos, disminuye la producción de estradiol en hembras y machos, disminuye aproximadamente el 70% de la carga parasitaria y protege durante la cisticercosis murina (Morales-Montor *et al*, 2002.) Las interacciones inmunoendocrinas que involucran a las hormonas sexuales, podría ser una explicación a la mayor susceptibilidad observada en las hembras infectadas con *T. crassiceps* (Romano et al., 2003).

1.6 Ovario y oviducto

1.6.1 Anatomía y fisiología

Los ovarios y las tubas uterinas u oviductos de los mamíferos forman un complejo funcional destinado a la producción y transporte de los óvulos. El oviducto se caracteriza por un revestimiento interno muy complejo, con una alta densidad de prominentes pliegues longitudinales en la porción distal o ampolla. El oviducto juega un papel esencial en el transporte de gametos y embriones. El epitelio de revestimiento del oviducto contiene células ciliadas que contribuyen al transporte de los gametos, y células secretoras que producen un fluido que nutre al embrión en los estadios iniciales de su desarrollo. El oviducto sufre cambios en la morfología y actividad ciliar en respuesta a las hormonas ováricas. Las microvellosidades son dependientes principalmente de progesterona y estradiol, los estrógenos estimulan la hipertrofia celular del epitelio y la pérdida de cilios está asociada con altos

niveles de progesterona sérica. Cualquier alteración en estas hormonas se verá reflejado en la longitud de las micro-vellosidades ciliadas del oviducto.

Las células son más cortas en cuanto a su longitud durante el ciclo estral, aumentando su tamaño en la fase proliferativa hasta alcanzar la longitud máxima en el periodo periovulatorio (Lyons et al., 2006).

Los ovarios son dos cuerpos ovalados que se encuentran alojados en la pelvis, fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario. Están constituidos por folículos y células de estroma (Figura 7). El folículo es la unidad estructural del ovario que contiene células germinales (ovocitos) y células somáticas (células de la granulosa y células de la teca). La función del ovario adulto está regulada por la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), hormonas secretadas por la glándula hipófisis anterior, bajo el control pulsátil de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) proveniente del hipotálamo. Para ejercer sus efectos, la LH se une a su receptor (LHr) localizado en las células de la teca, mientras que la FSH se une a su receptor (FSHr) localizado en las células de la granulosa (Richards & Pangas 2010).

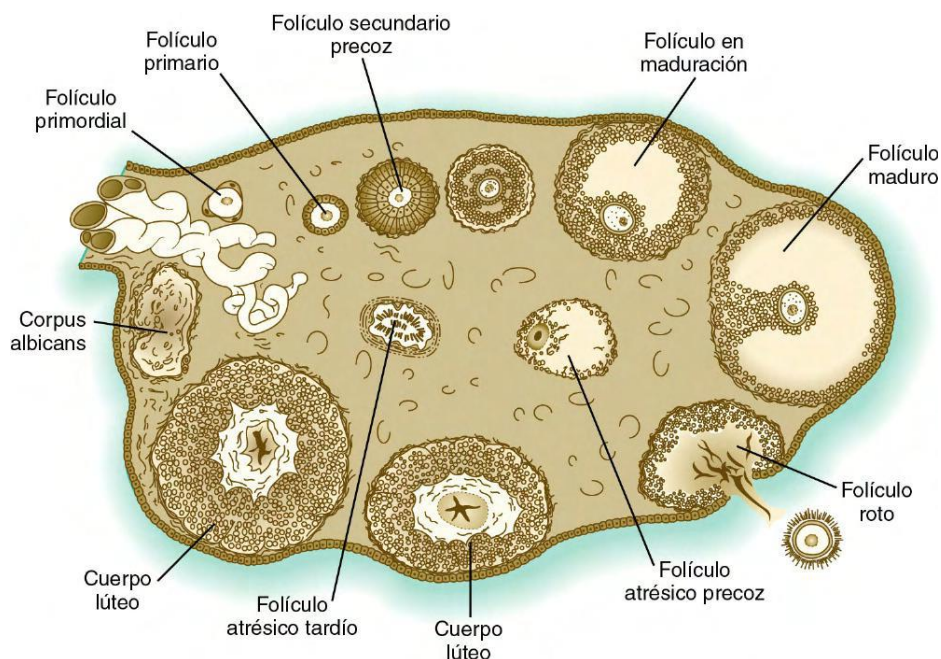


Figura 7. Características del ovario (Carson 2014).

1.6.2 Foliculogénesis

En el ovario, la foliculogénesis se divide en dos fases: la fase folicular antes de la ovulación y la fase lútea, después de la ovulación. El proceso inicial consiste en la proliferación mitótica de células germinales u ovogonias, proceso que da como resultado la formación de nidos de ovogonias debido a la citocinesis incompleta. Al mismo tiempo, las células somáticas conocidas como células pre-granulosa se alinean alrededor de los nidos de ovogonias. Las divisiones mitóticas de las ovogonias se detienen alrededor del día 13.5 de gestación en el ratón e inmediatamente estas células inician la meiosis para formar los ovocitos. La meiosis de los ovocitos se arresta en la primera división meiótica durante el estado de diploteno de la profase y luego se inicia la ruptura del nido de ovogonias. Esta ruptura es favorecida por la muerte celular programada (fenómeno conocido como atresia folicular) de aproximadamente 70% de los ovocitos que conforman los nidos de ovogonias. La atresia de los ovocitos favorece la formación de folículos primordiales (Hirshfield, 1991).

La foliculogénesis comienza con el reclutamiento de un pool de folículos primordiales en crecimiento, después del reclutamiento, estos folículos crecen y se convierten en folículos primarios que contienen un ovocito ligeramente más grande rodeado por una capa de células de la granulosa con forma de cubo. Los folículos primarios evolucionan al estado preantral, el cual es caracterizado por un ovocito rodeado de 2 a 4 capas de células de la granulosa y una capa de células de la teca. Los folículos preantrales crecen a folículos antrales y tienen la característica de poseer más de 4 capas de células de la granulosa, un espacio antral formado por el fluido folicular y una capa de células de la teca que delimita el folículo (Figura 8). Los folículos antrales sintetizan estradiol que estimula la secreción de la FSH por parte de la hipófisis, la cual a su vez aumenta aún más la síntesis de estradiol en la granulosa. A su vez, por el efecto de retroalimentación positiva sobre la secreción de GnRH por la adenohipófisis, se produce un pico de LH lo que promueve el crecimiento del folículo antral a folículo preovulatorio. Este folículo es similar al antral, con la diferencia de que posee mayor tamaño y unas células alrededor del ovocito conocidas como células de la cúmula, las cuales son funcionalmente importantes durante el proceso de fertilización (Tresguerres & Castillo, 2010) (Hawkins & Matzuk 2010).

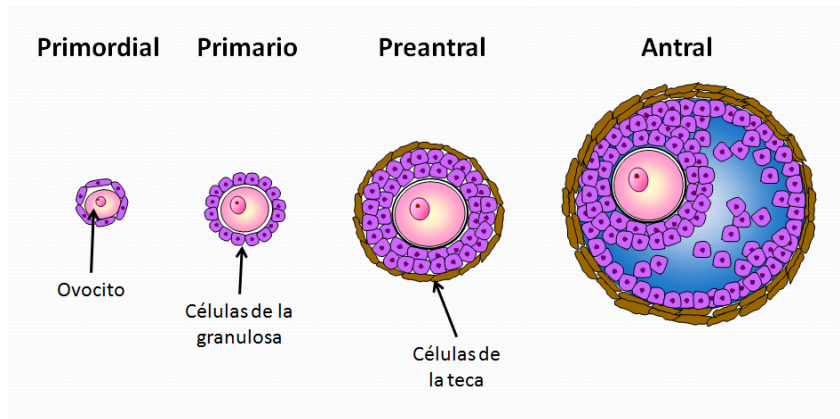


Figura 8. Estadios del desarrollo folicular (Hernández-Ochoa et al., 2010).

1.6.3 Ovulación y fertilización

Una vez que se alcanza la maduración total del folículo, se presenta el pico de LH que posteriormente va a producir la ruptura del mismo con liberación del ovocito rodeado del cúmulo de células de la granulosa. Tras la ruptura del folículo, tanto los capilares como los fibroblastos de la teca interna proliferan y penetran la lámina basal. Las células murales de la granulosa experimentan cambios morfológicos, que en su conjunto determinan el proceso de luteinización. Todas estas células granulosas transformadas, más las células de la teca y los vasos, se entremezclan para dar lugar al cuerpo lúteo, el cual es un indicativo de que la ovulación ha ocurrido. El cuerpo lúteo tiene la capacidad enzimática para producir progesterona durante la fase post-ovulatoria del ciclo y si se produce la fecundación y la implantación, se mantiene activo mediante la estimulación producto de la hormona gonadotrofina coriónica humana (Tresguerres & Castillo, 2010).

El ovocito es liberado al oviducto en donde puede ser fertilizado por un espermatozoide (previamente capacitado en su fase terminal ya que la capacitación del espermatozoide inicia antes en el tracto genital femenino). El espermatozoide se une a la zona pelúcida (capa externa del ovocito) y ocurre la reacción acrosomal, que consiste en la liberación de enzimas del acrosoma que permiten su paso a través de la zona pelúcida. A continuación, el espermatozoide se fusiona con el ovocito e induce la entrada de calcio al mismo, la que culmina con la reacción cortical del ovocito, en la cual los gránulos corticales liberan su contenido alterando la zona pelúcida. Esto conduce a una despolarización eléctrica rápida de la membrana plasmática del óvulo en la cual el potencial de membrana en reposo cambia

desde unos -70 mV hasta + 10 mV en 2 o 3 segundos evitando que otro espermatozoide pueda penetrar. Después de la fusión y la penetración del espermatozoide en el ovocito, el núcleo del espermatozoide se descondensa y se inicia la remodelación de la cromatina del macho y de la hembra en pronúcleos coordinados; el desarrollo del cigoto comienza después de la unión de los pronúcleos (Alberts et al., 2008).

1.6.4 Esteroidogénesis Ovárica

Las hormonas sexuales producidas en el ovario de los mamíferos son fundamentalmente el estradiol y la progesterona, aunque también se producen cantidades menores de estrona, androstenediona, testosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, la relaxina y algunos factores de crecimiento. Todos los esteroides ováricos se producen fundamentalmente en las estructuras foliculares y en el cuerpo lúteo. Estos esteroides derivan del colesterol, que se obtiene a partir de tres fuentes principales: el que circula en la sangre en forma de lipoproteínas, el que se sintetiza de *novo* dentro del ovario a partir de acetilcoenzima A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Tresguerres & Castillo 2010). La proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) es la enzima que transporta el colesterol del exterior de la mitocondria al interior de la membrana mitocondrial, donde se localizan la mayoría de las enzimas esteroidogénicas. Ambas, células de la granulosa y teca expresan la StAR, el citocromo p450_{scc}, y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -hsd). Estas dos células tienen la capacidad de sintetizar pregnenolona y/o progesterona a partir de colesterol (Jamnongjit & Hammes 2006).

Tanto las células de la teca como el cuerpo lúteo son capaces de sintetizar elevadas concentraciones de andrógenos, mientras que la células de la granulosa no pueden hacerlo. El último paso para la biosíntesis de estrógenos es la aromatización del anillo A de los andrógenos utilizando la enzima P450-aromatasa (Cyp19A1), que está presente en grandes cantidades en las células de la granulosa, por lo que estas células son capaces de transformar los andrógenos en estrógenos (Tresguerres & Castillo, 2010).

La expresión del gen de la aromatasa en el ovario tiene un papel importante en el progreso normal del ciclo menstrual/estro. En roedores, la aromatasa se expresa en las gónadas y el cerebro. En los ovarios de animales sexualmente maduros, la expresión de la aromatasa se

limita a los folículos y el cuerpo lúteo. En estas estructuras la expresión del gene se controla de manera específica, temporal y espacial, lo cual limita la producción de estradiol sólo a las células de la granulosa del folículo antral sano y a las células lúteas, sin embargo la expresión de aromatasa también se ha reportado en los ovarios fetales (Stocco, 2009).

El modelo denominado de las “dos células” plantea la necesidad de interacción entre las células de la teca interna y las de la granulosa para conseguir la biosíntesis de estrógenos. Las células de la teca, disponen de los sistemas enzimáticos capaces de transformar la pregnenolona en andrógenos, pero no tienen las enzimas aromatizantes para llegar a la biosíntesis de estradiol. Por su parte, las células de la granulosa son capaces de sintetizar cantidades elevadas de estrógenos, siempre y cuando los andrógenos precursores les sean suministrados por otro tipo celular, concretamente las células de la teca (Figura 9). La colaboración entre estas dos células permite el proceso de biosíntesis del estradiol tal y como ocurre en el ovario durante el crecimiento folicular (Tresguerres & Castillo 2010).

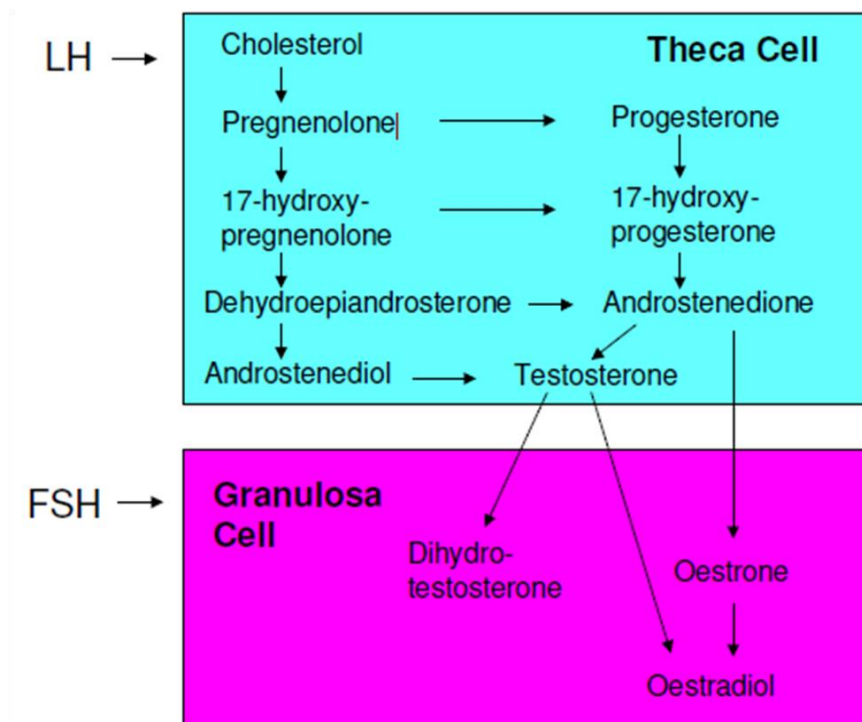


Figura 9.Regulación de la esteroidogénesis en el ovario (Drummond AE, 2006).

1.6.5 Enzimas clave en la esteroidogénesis ovárica

1.6.5.1 P450-aromatasa

La P450-aromatasa es una proteína microsomal producto del gen CYP19A1. Es miembro de la familia de los citocromos P450, se compone de un grupo hemo y la flavoproteína ubicua NADPH (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato) citocromo P450 reductasa, es responsable de la conversión de esteroides C₁₉ (androstenediona, testosterona y 16 α -hidroxiandrostenediona) a estrona, 17 β -estradiol y estriol, está localizada en el retículo endoplásmico liso de las células donde se expresa. Se clasifica como una reacción de oxidación mixta, tanto NADPH como oxígeno son requeridos para esta conversión, se consumen 3 moles de cada uno por mol de estrógeno. Los equivalentes reductores de NADPH se transfieren a través de la flavoproteína al citocromo P450-aromatasa, que une el sustrato de andrógenos e inserta oxígeno en la molécula, la cual resulta en tres hidroxilaciones secuenciales. En el curso de la reacción, el grupo metilo C-19 se pierde como ácido fórmico, concomitante con la aromatización del anillo A a una estructura de anillo fenólico (Lephart & Simpson 1991).

En la mayoría de los mamíferos, el mecanismo que controla la expresión de la P450-aromatasa a nivel transcripcional está bajo el control de dos promotores distintos, un promotor específico de gónadas y un promotor específico de cerebro, mientras que la regulación postraducciona es poco conocida. Se ha demostrado que las fosfatasa modulan la actividad de P450-aromatasa en el cerebro; se ha sugerido también la participación de la fosforilación de proteínas en la regulación de la actividad de P450-aromatasa en diferentes tipos celulares (Barone et al., 2012).

Los estrógenos son importantes para la fertilidad de la mujer y del hombre, se han observado graves defectos reproductivos cuando la síntesis de estrógenos o su acción son bloqueadas. El estradiol modula la estructura y función de los tejidos reproductivos, como el útero y el oviducto. En el ovario el estradiol producido localmente actúa junto con las gonadotrofinas hipofisarias para proporcionar una foliculogénesis y producción de esteroides exitosos. En el humano, el estradiol también participa en procesos patológicos, es por eso que se ha prestado mucha atención a la regulación del gen de aromatasa y su implicación en el desarrollo y progresión de enfermedades.

En los roedores la aromatasa se restringe a las gónadas, el cerebro y en tejido graso. En los ovarios de animales sexualmente maduros, la expresión de aromatasa se limita al folículo y cuerpo lúteo. En estas estructuras, la expresión de este gen se controla de una manera específica, temporal y espacial que limita la producción de estradiol sólo a las células de la granulosa y a las células lúteas.

El principal inductor de la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa es la FSH, sin embargo el efecto de la estimulación con FSH está sujeto a modulaciones por el estradiol. El estradiol aumenta la acción de FSH en células de la granulosa, actuando de manera autócrina; se ha observado que uno de los efectos de estradiol es aumentar la expresión de la aromatasa por la estimulación con FSH (Stocco 2012).

Los andrógenos también aumentan el efecto de la FSH en la expresión de la aromatasa. Se ha demostrado que la testosterona es más efectiva que el estradiol en potenciar el aumento de la expresión de la aromatasa por la inducción con la FSH, esto indica que los andrógenos provenientes de las células de la teca, no solo actúan como sustrato en la síntesis de estrógenos, también modulan a la FSH mediante la activación del receptor a andrógenos (Fitzpatrick & Richards, 1991).

Estudios recientes han establecido que el cAMP es el principal mensajero intracelular que modula la expresión de la aromatasa. La FSH activa otras vías de señalización intracelulares, como la cinasa regulada extracelularmente (ERKs), y la fosfatidilinositol-3 (PI3K). De estas vías la PI3K activa la proteína cinasa B (PKB) que también participa en activación de la aromatasa inducida por la FSH (Stocco 2008).

Por otro lado la aromatasa puede sobre-expresarse en muchos tejidos humanos ubicuamente en el síndrome de exceso de aromatasa, esto da lugar a un aumento del estrógeno circulante y efectos tanto locales como sistémicos, como la ginecomastia e hipogonadismo en hombres y desarrollo prematuro de mamas así como anovulación en mujeres (Bulun et al., 1997).

Se ha reportado que un promotor distal (1.4) dirige la expresión de aromatasa en tejido adiposo y fibroblastos en piel, en estos tejidos el promotor 1.4 es regulado por acción combinada de glucocorticoides y un miembro de la familia de citocinas de la clase 1 como IL6 (Bulun et al., 2005).

1.6.5.2 P450c17

Es una enzima microsomal que se localiza en el retículo endoplásmico liso que tiene doble función y está codificada por el gen CYP17A1. Es una enzima clave en la biosíntesis de andrógenos, la cual tiene actividad de 17 α -hidroxilasa y 17, 20 liasa; esta enzima controla un importante punto de ramificación en la esteroidogénesis entre los glucocorticoides y la biosíntesis de hormonas sexuales (Bhatt et al., 2017). En humanos la P450c17 es necesaria para la producción principalmente de glucocorticoides como el cortisol y para la producción de andrógenos, sin embargo en los roedores esta enzima no se expresa en las glándulas adrenales, se expresa principalmente en las gónadas.

La regulación de la actividad de esta enzima depende en gran medida de tres factores postraduccionales. Primero, la actividad de 17,20 liasa es especialmente sensible a la abundancia molar de la proteína de transferencia de electrones. Como todas las enzimas P450 microsomales, la P450c17 recibe electrones de la NADPH a través de la flavoproteína P450 oxidoreductasa (POR) y media la catálisis a través del átomo de hierro en su anillo hemo. La POR recibe dos electrones de NADPH y los transfiere uno a la vez al P450. El modelado computacional muestra que la POR es una proteína con forma de mariposa: un ala contiene un dominio de dinucleótido de adenina flavina (FAD) y la otra contiene un dominio de mononucleótido de flavina (FMN), estos dos dominios están separados por una región flexible en forma de bisagra; cuando el dominio FAD de POR recibe dos electrones del NADPH se presenta un cambio conformacional en la región de la bisagra uniendo las dos alas y alineando los anillos del FAD y FMN, permitiendo que los electrones fluyan desde el dominio FAD al dominio FMN. La POR vuelve a su conformación inicial, más abierta permitiendo que el dominio FMN se asocie con el sitio de unión del P450 por interacciones electrostáticas: la superficie del dominio FMN, donador de electrones tiene numerosos residuos ácidos, mientras que el sitio de unión de la P450 contiene numerosos residuos básicos. Los electrones del dominio FMN fluyen al átomo del grupo hemo del P450 (donde la catálisis es mediada) y la POR se separa del P450 (Miller & Tee 2015).

Segundo, el citocromo b5 promueve fuertemente la actividad de 17,20 liasa. Este citocromo es una pequeña hemo-proteína unida a la membrana que se expresa en adrenales y gónadas. Estudios sugieren que el citocromo principalmente actúa como un factor alostérico que promueve la interacción de P450c17 con la proteína de transferencia de electrones (POR); y

en tercer lugar, la fosforilación de serina / treonina del propio P450c17 promueve la actividad 17, 20 liasa (Miller & Tee, 2015). La presencia del citocromo b5 aumenta la actividad de 16 α -hidroxilasa de P450c17, esta actividad se ha atribuido al efecto alostérico del citocromo b5 que cambia la conformación del P450c17 de manera que el sustrato pueda alinearse favoreciendo la reacción (Bhatt et al., 2015).

1.7. Justificación

- La cisticercosis es una enfermedad causada por la etapa larval de *Ts* que afecta varios huéspedes incluyendo el humano y es un importante problema de salud pública en varios países, incluido México.
- Se ha demostrado que estos ténidos pueden alterar el ambiente hormonal del huésped y tienen la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas.
- Las hembras son más susceptibles a la infección con *T.crassiceps*, sugiriendo que los estrógenos tienen un papel importante en el desarrollo del parásito.
- Existen estudios que muestran aumento de la atresia folicular en el ovario de ratonas infectadas con cisticercos de *T.crassiceps* ORF a los 45 días de infección.
- Por lo tanto es necesario estudiar en detalle la evolución de la foliculogénesis de las ratonas infectadas, así como la expresión de enzimas encargadas de la síntesis de estrógenos y andrógenos, e investigar los mecanismos fisiopatológicos y moleculares que provocan estas alteraciones.

1.8. Hipótesis

La infección con cisticercos de *T. crassiceps* WFU disminuirá el número de folículos en desarrollo, aumentará la atresia folicular e incrementará en el ovario la expresión de las enzimas clave involucradas en la síntesis de estrógenos y andrógenos: 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa y aromatasa.

1.9. Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Investigar si la infección de ratonas con cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU altera el desarrollo folicular, la histopatología del oviducto, y si modifica aspectos endocrinos del ovario.

1.9.2 Objetivos específicos

- Cuantificar durante el curso de la infección (2, 4 y 6 meses) los diferentes tipos de folículos de hembras infectadas por *T. crassiceps* WFU y no infectadas, en cortes seriados de tejido ovárico.
- Evaluar la ovulación mediante el conteo de cuerpos lúteos y folículos preovulatorios en hembras infectadas por *T. crassiceps* WFU y no infectadas.
- Investigar en el ovario de hembras infectadas y controles los niveles de proteína de enzimas esteroideogénicas involucradas en la síntesis de estrógenos y andrógenos: Aromatasa y P450c17
- Evaluar las concentraciones en suero de estradiol (E₂) y androstenediona (A₄) en hembras no infectadas e infectadas con cisticercos de *T. crassiceps* WFU

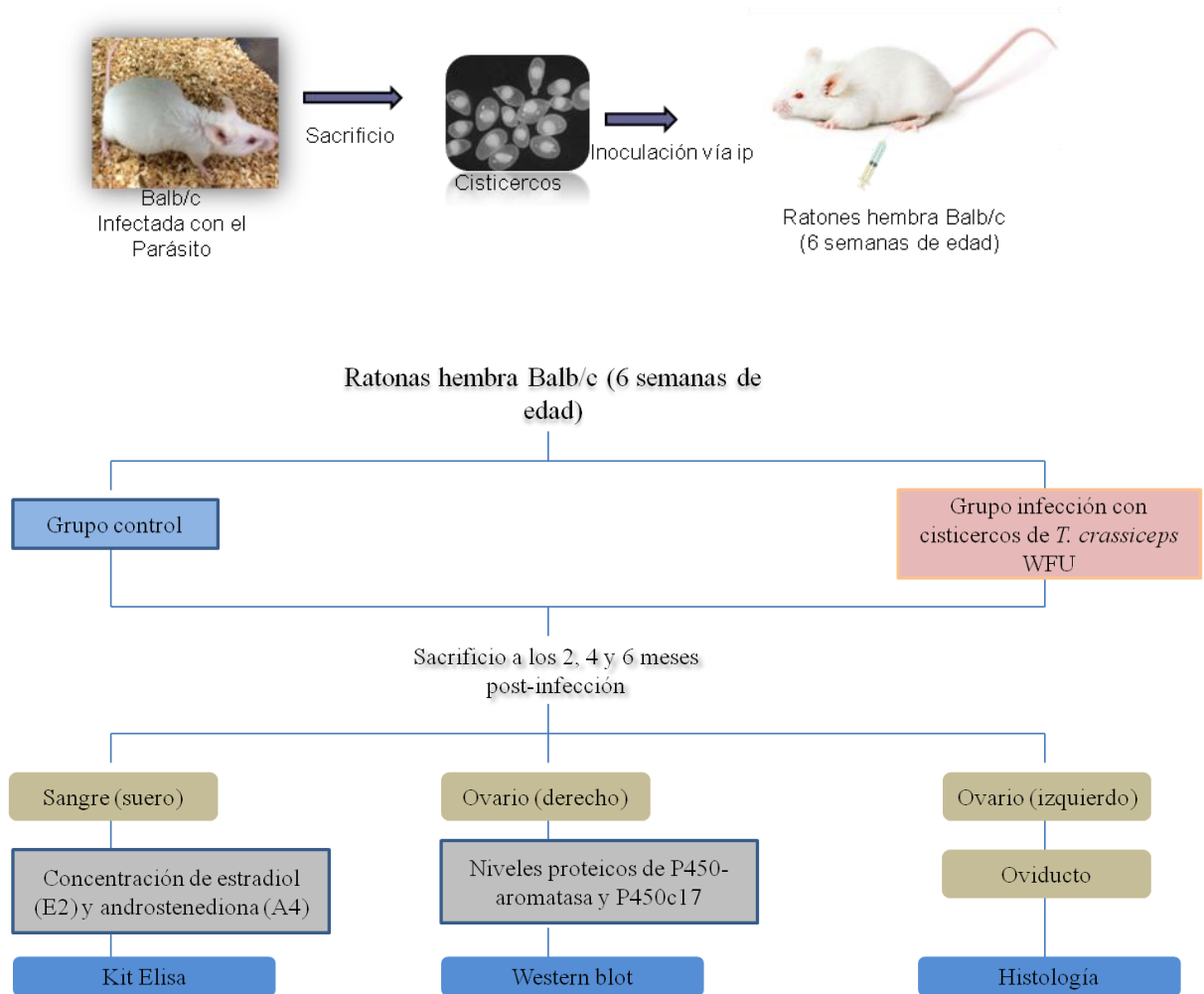
2. METODOLOGÍA

2.1 Reactivos

Reactivo	Casa comercial
Paraformaldehido	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Hematoxilina	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Eosina	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Etanol absoluto	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Xilol	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Albumina de suero bovino	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Ortovanadato de Sodio	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
NaF	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Pirofosfato de Sodio	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Glicerol	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
SDS	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Deoxicolato de sodio	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA

Kit ELISA Estradiol	DRG International, Inc. Springfield, USA
Kit ELISA Androstenediona	DRG International, Inc. Springfield, USA
Anti-Aromatasa	OriGene Technologies Inc, USA
Anti-p450c17	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-ratón peroxidado	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Anti-conejo peroxidado	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Medio de montaje Entellan	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Luminata	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Membranas PVDF	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Films X-ray	Kodak, Palo Alto, CA, USA

2.2 Diseño experimental



2.3 Modelo animal

Los procedimientos realizados en los ratones de laboratorio se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos internacionales establecidos para el uso y el cuidado de los animales del laboratorio. Estos procedimientos se llevaron a cabo previa autorización del Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV-IPN (CICUAL) y de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la misma institución (UPEAL).

Las ratonas de la cepa Balb/c en edad adulta de (6 semanas de edad) fueron proporcionadas por la unidad de Protección y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav. Las ratonas se colocaron en cajas de polisulfonato en un ciclo de 12 h luz/oscuridad y se alimentaron con agua y comida *ad libitum*.

Las ratonas se aclimataron durante una semana y se asignaron aleatoriamente a dos grupos de

Figura 10. Evaluación del efecto de la infección por cisticercos Tc en ovarios de ratonas infectadas y no infectadas

experimentación (n=4 por grupo): un grupo control negativo que sólo recibió PBS y un grupo de infección con cisticercos de *T.crassiceps* WFU. La infección se llevo a cabo por inyección vía intraperitoneal de 10 cisticercos en 0.5 ml de PBS estéril, los animales se mantuvieron por 2, 4 y 6 meses post-infección.

Al término de la infección, las ratonas se sacrificaron por dislocación cervical. Se recolecto el suero y los órganos y se asignaron para los análisis posteriores.

2.4 Histología de tejidos

2.4.1 Principio: La histología es una técnica útil para la evaluación de la morfología de los tejidos. Esta técnica consiste en la inclusión de tejidos (previamente fijados) en parafina para proporcionar cortes que muestran imágenes de estructuras tisulares contrastadas con una tinción. Las tinciones de los cortes histológicos permiten obtener un contraste de color mediante la combinación de colores ácidos y básicos. La hematoxilina, al ser un colorante básico tiñe de color morado a los ácidos como el ADN y ARN; mientras que la eosina, al ser un colorante ácido tiñe de color rosado las bases.

2.4.2 Procedimiento: Los ovarios y los oviductos disecados se fijaron en paraformaldehído al 4% inmediatamente después de su colección. El tejido se deshidrató sumergiéndolo en una secuencia de alcoholes con concentraciones crecientes: alcohol al 70%, alcohol al 96% y alcohol al 100%. Posteriormente se sumergió el tejido en una mezcla de alcohol-xilol (1:1 v/v) y después se colocó en xilol hasta que la muestra se observó translúcida. El paso siguiente es la inclusión en parafina hasta terminar la inclusión en la parafina más pura; este procedimiento se realizó a 58-60°C. Una vez incluido en parafina, el tejido se colocó en un molde metálico para histología, se vació la parafina y se dejó solidificar para llevar a cabo los cortes del órgano. El ovario completo se seccionó en cortes seriados de 4 µm con el uso de un micrótopo. Los cortes se montaron en secuencia sobre portaobjetos y se dejaron desparafinar toda la noche a una temperatura de 50°C. Finalmente, las muestras ya desparafinadas se tiñeron mediante la tinción con hematoxilina y eosina. Cuando las laminillas se secaron se les colocó una gota de resina, enseguida un cubreobjetos y se dejaron secar para su evaluación posterior.

2.5 Evaluación histológica del ovario

2.5.1 Conteo de los folículos ováricos

El conteo de los folículos ováricos se realizó en cada cuatro cortes histológicos de todo el ovario. Se marcaron para su análisis y los folículos se clasificaron de la siguiente manera:

- a) Primordiales, si los folículos contienen un ovocito rodeado por una capa de células de la granulosa con forma alargada o rodeada por una capa incompleta de células de la granulosa con forma de cubo.
- b) Primarios, si los folículos contienen un ovocito rodeado por una capa completa de células de la granulosa con forma de cubo
- c) Antrales, si los folículos contienen un ovocito con un núcleo visible, mas de cinco capas de células de la granulosa y un espacio antral.
- d) Preovulatorios, si los folículos poseen una cavidad antral grande, así como un complejo ovocito-células de la cúmulo unido a las células de la granulosa.

2.5.2 Procedimiento: Se obtuvo el porcentaje total de folículos de cada tipo (primordiales, primarios, antrales y preovulatorios) por muestra y se multiplicó por un factor de 4. Los datos

se presentan como la media más menos el error estándar (EE) por tipo folicular y por grupo experimental.

2.6 Conteo de cuerpos lúteos y medición de las microvellosidades ciliadas del oviducto

El conteo de cuerpos lúteos se realizó de acuerdo a las especificaciones de Barnett et al., (2007). Los cuerpos lúteos se identificaron como unidades estructurales en el ovario que contienen células luteinizantes, las cuales son de estructura similar a las células de la granulosa, pero de tamaño ligeramente mayor. Los cuerpos lúteos se contaron a lo largo de los cortes histológicos de cada ovario.

Se midió la longitud de las micro-vellosidades del epitelio cilíndrico simple del oviducto. Se seleccionaron 10 campos al azar con una ampliación de 100x. Todas estas mediciones se realizaron utilizando un microscopio (Olympus) equipado con una cámara digital y software Infinity 1-Lumera.

2.7 Cuantificación de Hormonas sexuales por ELISA

2.7.1 Principio: Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

2.7.2 Procedimiento: Los sueros de las ratonas no infectadas como de las infectadas se obtuvieron por centrifugación a 1500rpm por 15 minutos y congelaron a -20°C hasta su uso. Para las concentraciones de 17β-estradiol (E₂) se utilizó un kit comercial DRG de inmunoensayo enzimático de estradiol [DRG® Estradiol sensitive ELISA (EIA-4399)]. El antisuero utilizado en el ensayo fue específico para E₂. La reactividad cruzada para el ensayo fue 100% con Estradiol, 0.2% con Estrona, 0.05% con Estriol y 0% con otros esteroides o derivados de esteroides. La sensibilidad analítica del ensayo fue <1.399pg/mL.

Para las concentraciones de Androstenediona se utilizó un kit comercial DRG para inmunoensayo enzimático de androstenediona [DRG® Androstenedione ELISA (EIA-3265)]. El antisuero utilizado en el ensayo fue específico para Androstenediona. La reactividad

cruzada para el ensayo fue 100% con Androstenediona, 0.6% con Testosterona, 0.3% con 17OH-progesterona, <0.01% con Androsterona, Dihidrotestosterona, Estradiol, Estrona y Progesterona. La sensibilidad analítica del ensayo fue de 0.021 ng/mL

Para el análisis de las muestras se descongelaron y se mantuvieron a temperatura ambiente, la cuantificación de estradiol y androstenediona se realizó siguiendo el protocolo de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

2.8 Expresión de 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa y aromataasa por Western blot.

2.8.1 Principio: El western blot es una técnica semi analítica utilizada para detectar proteínas específicas en una muestra de tejido, cultivo celular, extracto de proteína total o subfraccionada. Se basa en la separación de las proteínas en función de su tamaño mediante una electroforesis en gel. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana, donde son reconocidas mediante anticuerpos específicos. La presencia de los anticuerpos específicos se detecta con anticuerpos marcados con una enzima que al ponerse en contacto con su sustrato emite una señal colorida o fluorescente.

2.8.2 Procedimiento: Se evaluó la expresión de la 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa y de la P450-aromataasa en ovarios con 2, 4 y 6 meses de infección y respectivos controles.

a) Extracción de proteína total de tejido. Los ovarios se extrajeron, se les quitó el excedente de grasa e inmediatamente se congelaron a -80°C hasta la extracción. Cada grupo de ovarios se homogenizó en amortiguador de lisis frío (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM ortovanadato de sodio, 100 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sodio, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptina, 5 μ g/mL antipaina, 5 μ g/mL quimostatina, 5 μ g/mL benzamidina y 1 μ g/mL pepstatina). A continuación las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm por 15 min a 4°C.

La proteína total se dividió en alícuotas de 20 μ l que se mantuvieron a -78°C hasta su uso. Se destinó una alícuota de 5 μ l para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como estándar.

b) Separación electroforética de la proteína total. Para cada condición se utilizaron 40 μ g del extracto total, ajustado a 40 μ l, que se mezcló con v/v con buffer muestra (buffer de muestra-2 β -Mercaptoetanol al 5%). Se ajustaron todas las muestras al mismo volumen para enseguida

someter a ebullición por 5 minutos. Se mantuvieron en el hielo mientras se cargaron en el gel de Dodecilsulfato sódico poliacrilamida-(SDS). Posteriormente se realizó la electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% con SDS a voltaje constante de 100 V. Una vez que se separaron los proteínas por peso y carga se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 65 mA durante 1 hora en una cámara de electro transferencia semi-húmeda. En seguida se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h los sitios libres de la membrana con una solución de leche descremada al 5% en PBS.

c) Inmunodetección. La membrana de PVDF se incubó con el anticuerpo primario específico para P450-aromatasa (1:1000) o P450c17 durante toda la noche a 4°C; posteriormente se realizaron 4 lavados cada 5 minutos con solución de lavado (PBS pH 7.4 Tween-20 0.1%) para después incubar por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico de (conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) o de anticuerpo de (ratón) conjugado con HRP (1:5000), luego se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno.

Las bandas se detectaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (luminata) y películas radiográficas KODAK y las bandas se capturaron en un procesador de imágenes (Bio Imaging System, Gene Genius), para su posterior análisis densitométrico por medio del software ImageJ. Como control de carga se utilizó Gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizaron tres experimentos independientes.

2.9 Análisis de resultados.

Los resultados se presentan como la media \pm EE y se consideró como significativo $P < 0.05$. La comparación entre grupos se realizó utilizando la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) y la significancia estadística se determinó con una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. La prueba t-student se realizó para evaluar diferencias estadísticas entre grupo control y grupo con infección en un tiempo. El análisis de datos se realizó utilizando el software Graph Pad Prism versión 7.0

3. RESULTADOS

3.1 La infección peritoneal con cisticercos de T.crassiceps WFU no afecta el peso corporal de las ratonas.

Para determinar el impacto de la infección con cisticercos de *T.crassiceps* en el peso corporal de las ratonas, se pesaron al momento del sacrificio. Se observó un incremento significativo en el peso corporal a los 2, 4 y 6 meses post-infección comparados con el grupo control. Sin embargo después de la recolección de los parásitos de la cavidad peritoneal no se observaron diferencias significativas en los pesos de las carcassas entre los grupos (Figura 11).

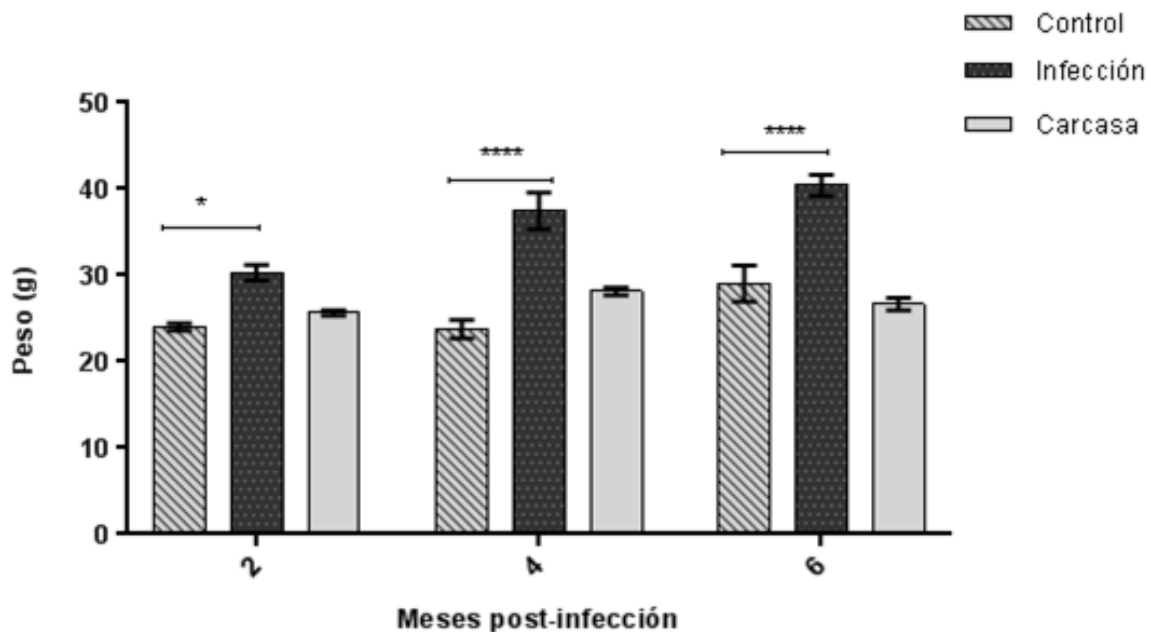
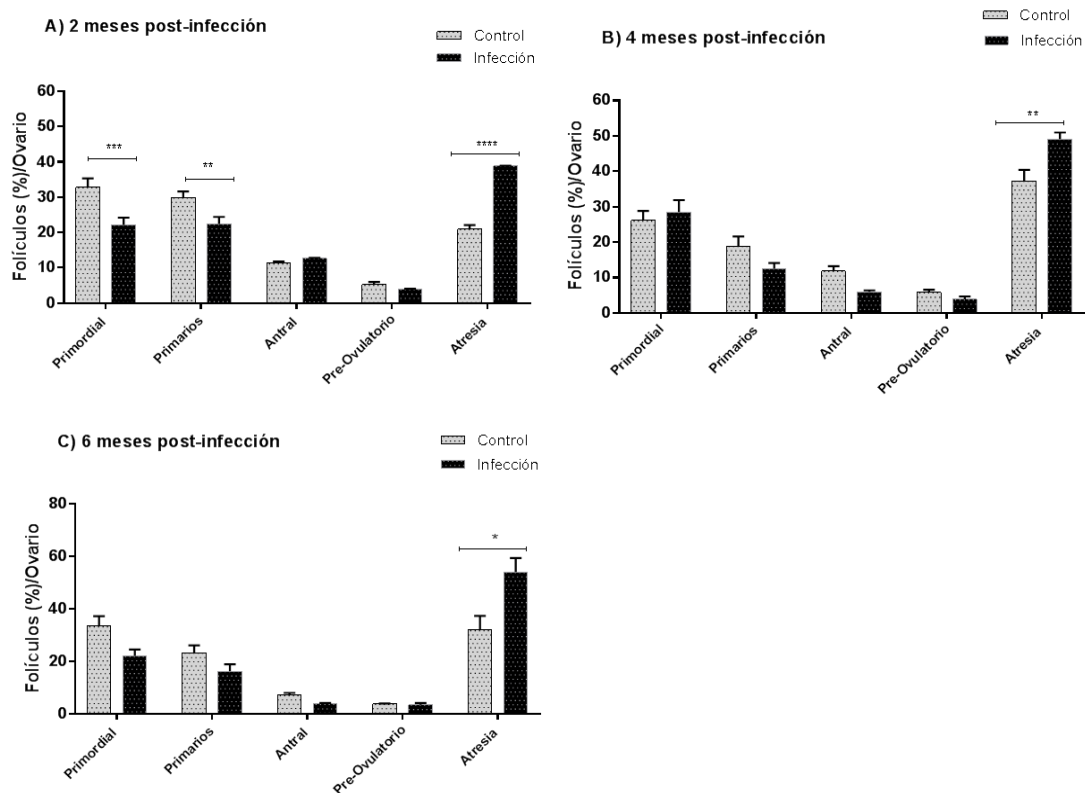


Figura 11. Peso corporal y de la carcassa de ratonas sanas e infectadas con cisticercos de *T.crassiceps* durante el curso de la infección. Cada barra representa la media \pm EE (n=4 por grupo). *p<0.05, ****p<0.0001 diferente comprado con los animales del grupo control.

3.2 La infección peritoneal con cisticercos de *T.crassiceps* WFU altera la foliculogénesis ovárica.

La unidad fundamental del ovario es el folículo y su desarrollo es un proceso complejo que termina en la ovulación y la liberación del ovocito. Se evaluó el efecto de la infección sobre la foliculogénesis a los 2, 4 y 6 meses post infección. Observamos una disminución

significativa en el número de folículos primordiales y primarios a los dos meses de infección en el grupo de animales infectados comparado con el control (Figura 12A). También se observó una tendencia a la disminución en el número de folículos antrales y preovulatorios a los 2, 4 y 6 meses post infección (Figura 12A, B y C). Es de destacar que se mostró un aumento significativo en el número de folículos en atresia lo cual nos indica que un número importante de los folículos no completa su desarrollo en los grupos infectados en todos los tiempos evaluados. Estos resultados sugieren una alteración en las hormonas FSH y LH que son las principales reguladoras del desarrollo folicular (Franks et al., 2000). En la figura 12 se muestran también micrografías representativas de ovario control (d) y de ovario de ratones hembra infectadas (e) a los 2, 4 y 6 meses post infección.



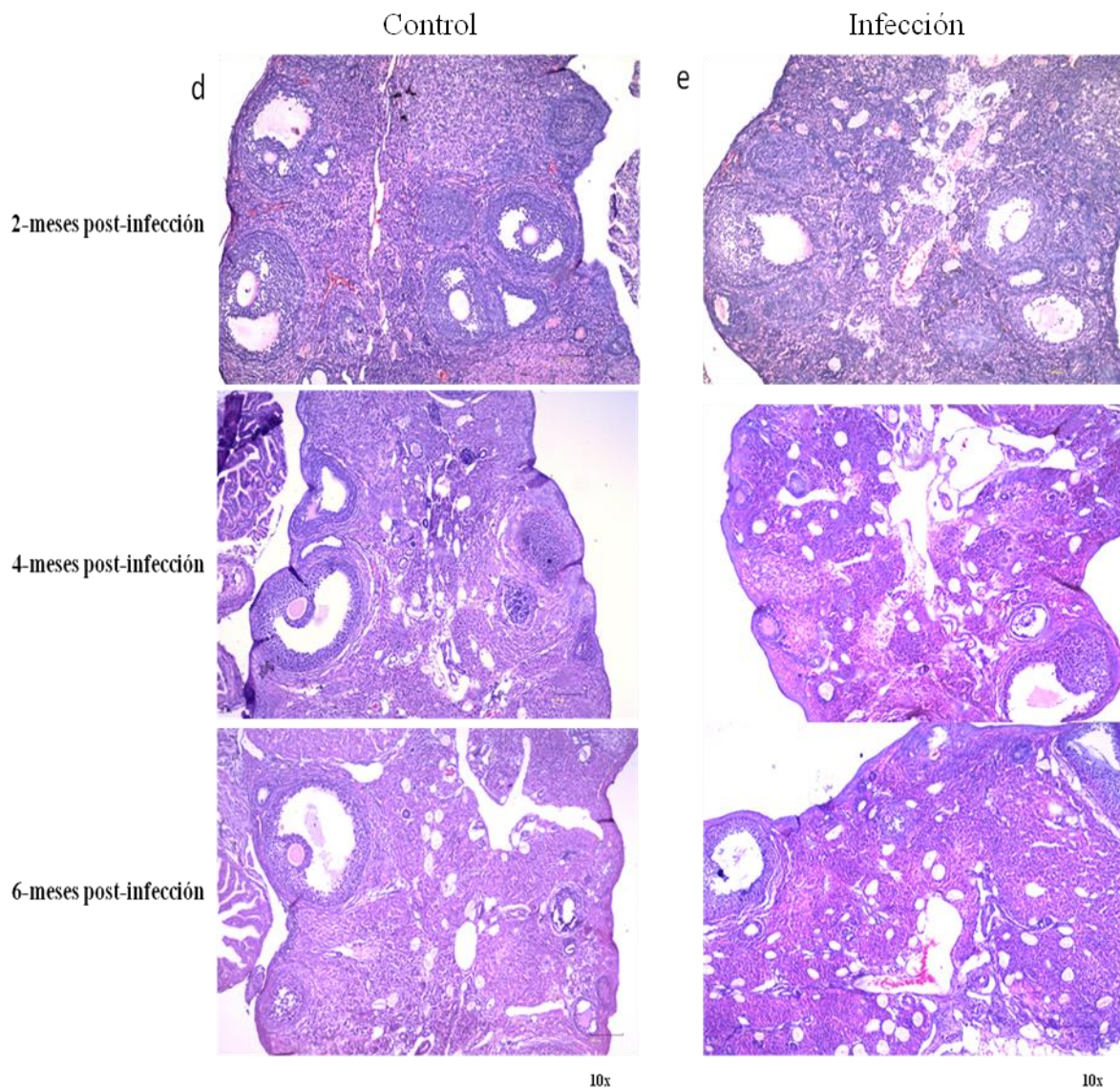


Figura 12. Efecto de la infección con *Taenia crassiceps* WFU en el número de folículos ováricos. Se analizaron al menos 500 cortes por ovario. Cada valor representa la Media \pm EE. . (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$ comparados con el grupo control. Los datos fueron analizados utilizando Análisis de varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc Bonferroni de comparación múltiple. $n = 3$ ratones hembra por grupo

3.3 La infección con cisticercos de T.crassiceps WFU disminuye el número de cuerpos lúteos

La presencia del cuerpo lúteo es indicativo de que ocurrió la ovulación o liberación del ovocito. Por lo tanto para estimar el proceso de ovulación, se realizó el conteo de los cuerpos lúteos en los ovarios de las ratonas sanas e infectadas con cisticercos de *T.crassiceps*. Se observó una disminución significativa en el número de cuerpos lúteos a los 2 y 4 meses de

infección. La diferencia se mantuvo, y fue más evidente a los 6 meses post-infección (Figura 13).

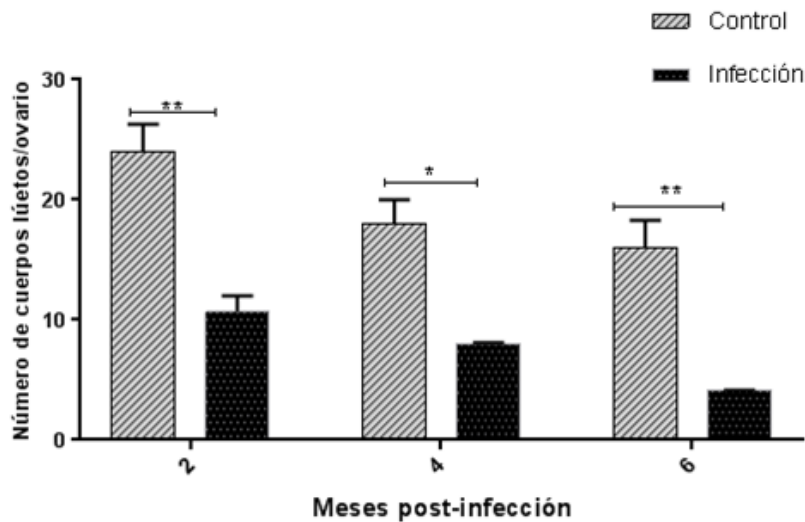


Figura 13. Efecto de la infección con *T.crassiceps* WFU en el número total de cuerpos lúteos en el ovario. Dos meses post-infección; 4 meses post-infección y 6 meses post-infección. Cada barra representa la media ± EE (n=4 ratonas por grupo). *p<0.05, **p<0.01 diferente comparado con el grupo control.

3.4 Efecto de la infección con cisticercos de *T. crassiceps* en el largo de los cilios de las células ciliadas del oviducto de la ratona

La figura 14 muestra la longitud de los cilios de las células ciliadas del oviducto de animales control e infectados. Observamos una disminución significativa en la longitud de las células ciliadas del oviducto de ratonas del grupo de infección comparadas con el grupo control a los 2, 4 y 6 meses post-infección.

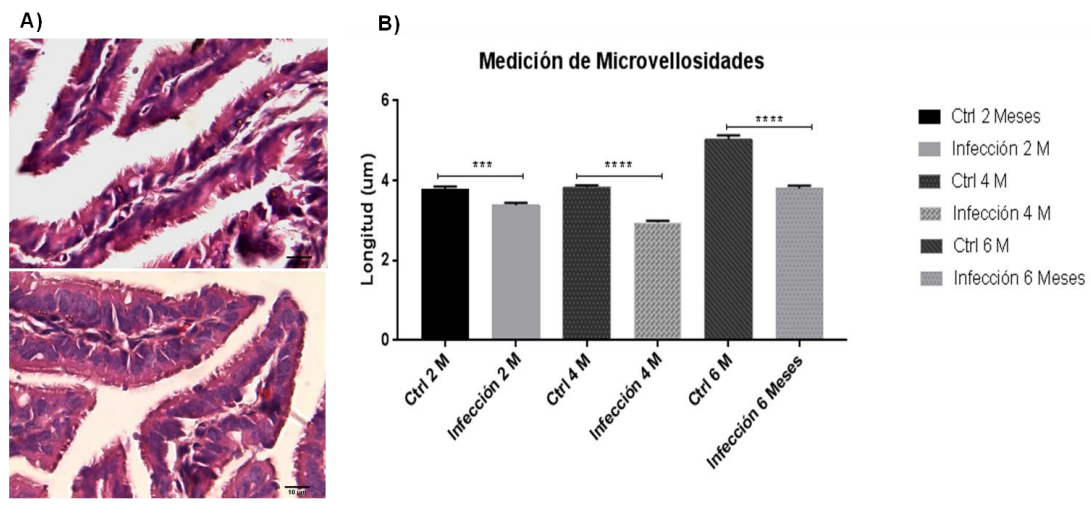


Figura 14. Efecto de la infección con *T. crassiceps* WFU en la longitud de los cilios las células ciliadas del oviducto. A). Micrografía representativa que muestra las células ciliadas del oviducto de animales control (micrografía superior) e infectados (micrografía inferior) (100X). B). 2, 4 y 6 meses post-infección. Cada barra representa la media \pm EE (n=4 por grupo). ***p<0.001, ****p<0.0001 diferente comparado con el grupo control.

3.5 Efecto de la infección con *T. crassiceps* en la expresión de P450-aromatasa y P450_{c17} en el ovario

Como se observaron alteraciones en el desarrollo folicular y en el oviducto, decidimos evaluar la expresión de dos importantes enzimas esteroidogénicas del ovario, la P450_{c17} y la P450-aromatasa y por Western blot. Estas dos enzimas son importantes para la síntesis de andrógenos y de estrógenos en el ovario. Se observó un aumento significativo en la expresión de la enzima P450-aromatasa de los ovarios del grupo con infección comparado con los ovarios de los animales del grupo control a los 2, 4 y 6 meses post-infección (Figura 15). Así mismo el análisis densitométrico del Western blot mostró un incremento significativo de la expresión de p450c17 en los ovarios de las ratonas del grupo con infección (Figura 16).

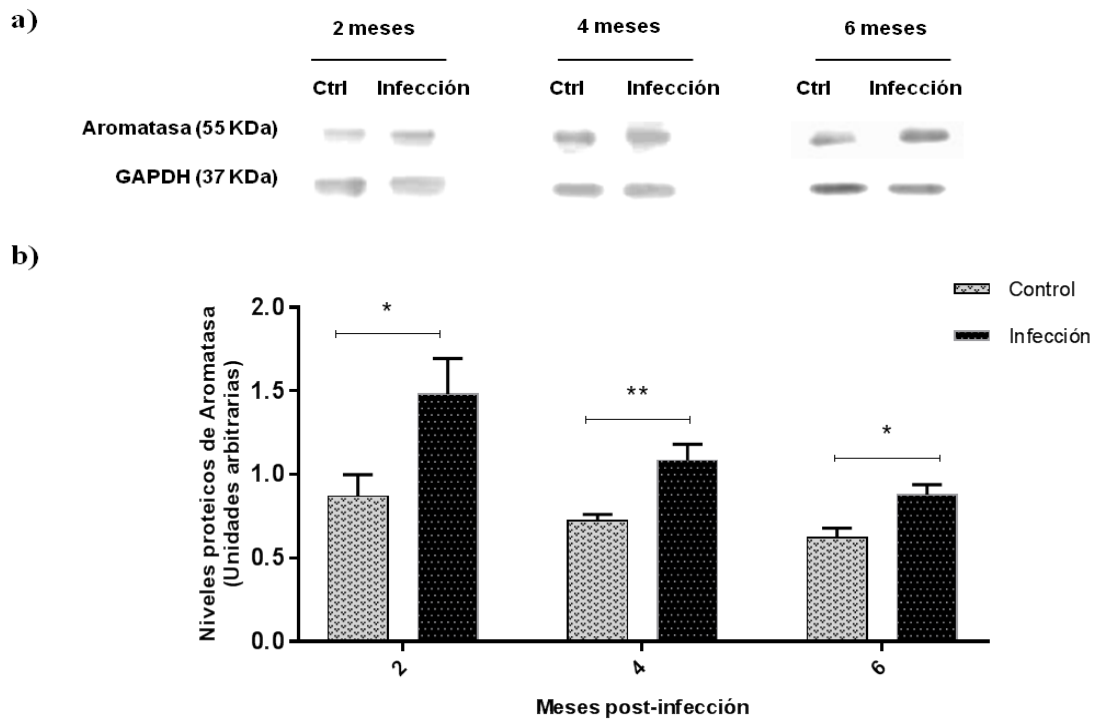


Figura 15. Análisis por western blot de la expresión de P450-aromatasa en ovarios de ratonas del grupo control y grupo de infección. a, Western blot y b, análisis densitométrico de la expresión de P450-aromatasa en los ovarios de ratonas del grupo control e infectados a los 2, 4 y 6 meses post infección. Datos representan la media \pm EE (n=6 por grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ diferente comparado con el control; unidades arbitrarias.

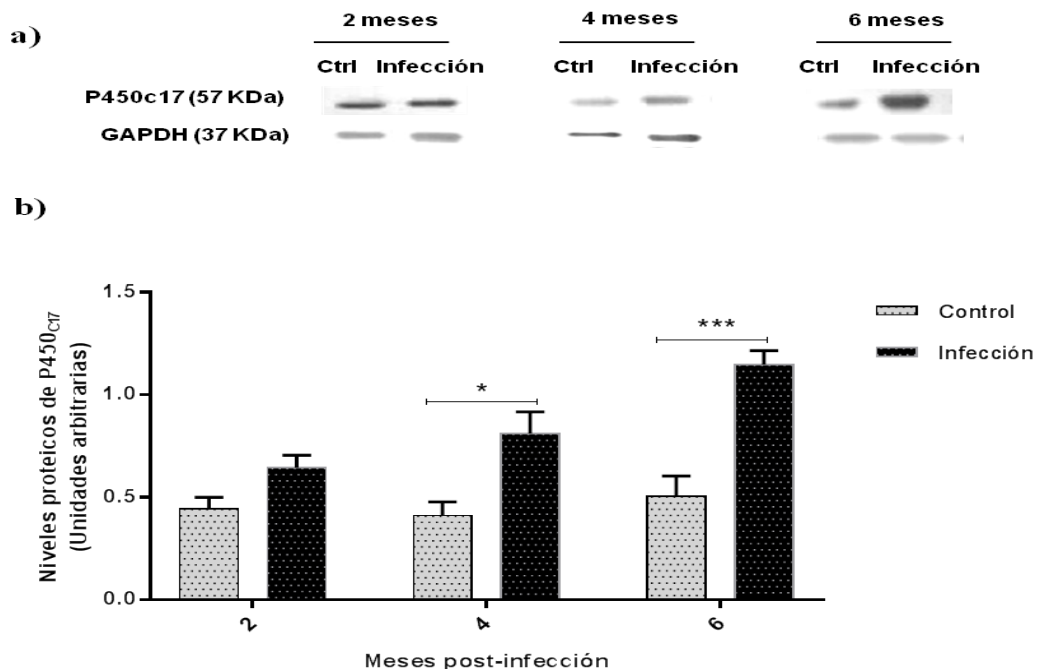


Figura 16. Análisis por Western blot de la expresión de P450c17 en ovarios de ratonas del grupo control y grupo de infección. a, Western blot y b, análisis densitométrico de la expresión de P450_{c17} en los ovarios de

ratonas del grupo control e infectados a los 2, 4 y 6 meses post infección. Datos representan la media \pm EE (n=6 por grupo). *p<0.05, ***p<0.001 diferente comparado con el control; unidades arbitrarias.

3.6 La infección de las ratonas con *T.crassiceps* WFU incrementó significativamente la concentración sérica de estradiol y de androstenediona

Como observamos un aumento en la expresión de las enzimas P450-aromatasa y P450_{c17} en el ovario de las ratonas infectadas, decidimos evaluar la concentración sérica de estradiol y androstenediona. Muestras de suero del grupo control y del grupo infectado se recolectaron para medir las concentraciones de estradiol y androstenediona. Se observó un incremento en los niveles de estradiol sérico (Figura 17) en el grupo de infección a los 2, 4 y 6 meses post infección.

La infección también provocó aumento significativo de las concentraciones de androstenediona en el suero de las ratonas infectadas con cisticercos en los tres tiempos estudiados (Figura 18).

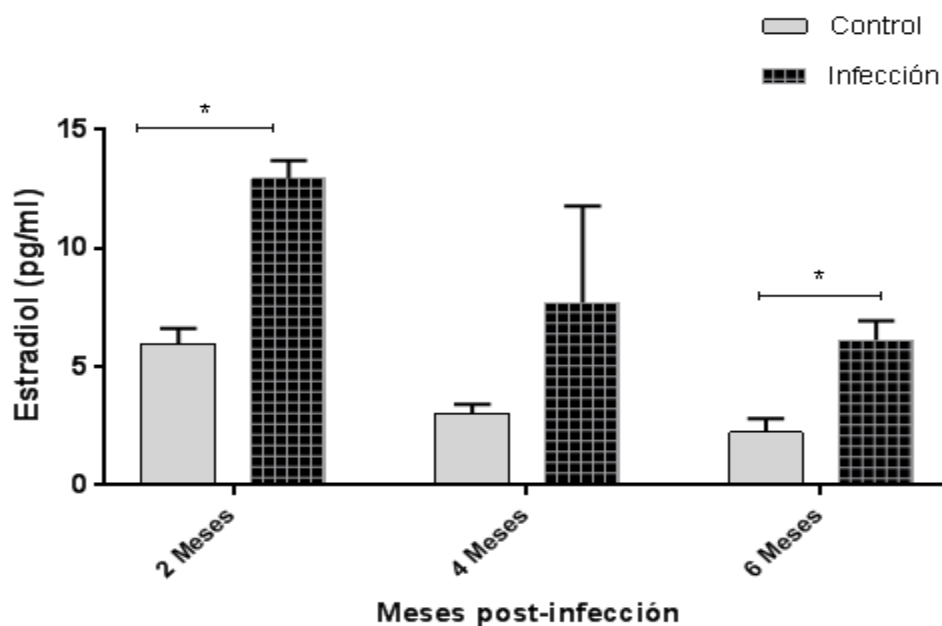


Figura 17. Concentración de estradiol en suero. Cuantificación de los niveles de estradiol en suero (pg/ml) de ratonas sanas e infectadas con cisticercos de *T.crassiceps* a los 2, 4 y 6 meses post-infección. Los datos representan la media \pm EE (n=4 por grupo). *p<0.05 diferente comparado con el control.

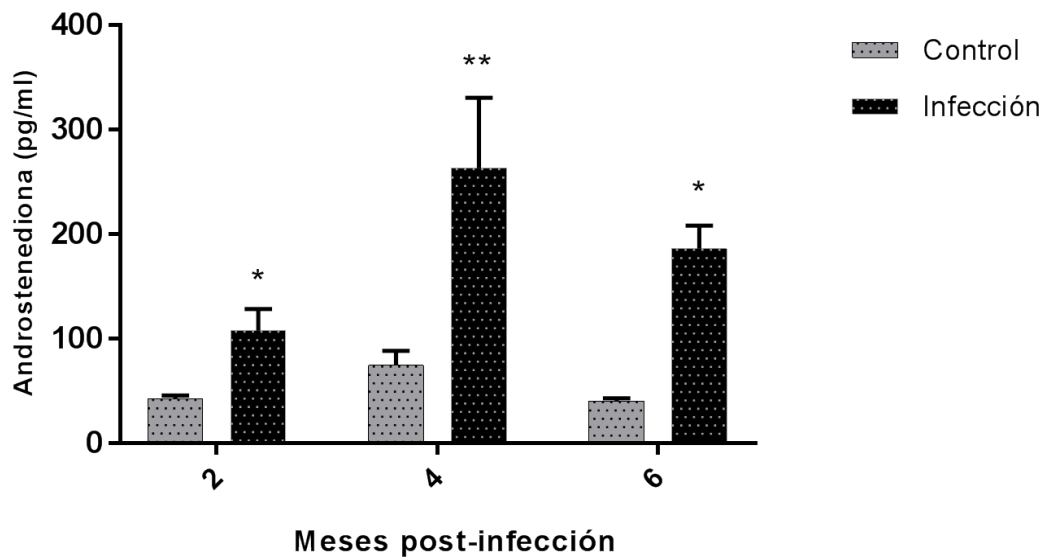


Figura 18. Concentración de androstenediona en suero. Cuantificación de los niveles de androstenediona en suero (pg/ml) de ratonas sanas e infectadas con cisticercos de *T.crassiceps* a los 2, 4 y 6 meses post-infección. Los datos representan la media \pm EE (n=4 por grupo). *p<0.05, **p<0.001 diferente comparado con el control.

4. DISCUSIÓN

La infección de ratonas con *Taenia crassiceps* WFU es un excelente modelo biológico de cisticercosis murina que permite estudiar la interacción entre el huésped y el parásito y por esto se eligió como modelo experimental para hacer un estudio detallado de los efectos de este parásito en aspectos reproductivos. Este es el primer estudio que muestra los efectos a largo plazo por la infección de *T. crassiceps* WFU en varios aspectos reproductivos de la ratona infectada, como la expresión de enzimas esteroideogénicas en el ovario, concentración de estradiol y androstenediona en suero, evaluación detallada de la evolución de cada tipo folicular del ovario y la presencia de cuerpos lúteos.

En el presente trabajo se observó un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal de las ratonas (Figura 11) que se puede atribuir al incremento de la carga parasitaria, debido a que el peso de las ratonas después de extraer los cisticercos (carcasa) fue similar en ambos grupos. La mayor susceptibilidad a la infección con cisticercos en las hembras se ha reportado anteriormente en animales infectados con la cepa ORF, siendo las hembras más susceptibles a la infección con cisticercos de *T. crassiceps* en comparación con los machos, lo que sugirió que el ambiente estrogénico favorece la reproducción del parásito (Larralde et al. 1995).

En nuestro estudio, se encontró que la infección a largo plazo con *T. crassiceps* WFU causa alteraciones en el desarrollo de los diferentes tipos de folículos ováricos así como un incremento significativo de la atresia folicular. Los factores que determinan el desarrollo folicular y la atresia no se conocen completamente. Sin embargo existe evidencia que muestra que el desarrollo folicular, la ovulación y la función del cuerpo lúteo son procesos regulados por hormonas como las gonadotropinas hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Hirshfield 1991; McGee and Hsue 2000).

Así mismo, la atresia folicular ovárica es un proceso de apoptosis controlado hormonalmente y ocurre en todos los estadios del desarrollo folicular. Se conoce que la disminución en el número de receptores a gonadotropinas en las células de la granulosa se ha relacionado con el inicio de la atresia. También se conoce que las concentraciones relativas de andrógenos y estrógenos en el líquido folicular modulan la sensibilidad de las células del folículo a gonadotropinas, por lo que son importantes para controlar el inicio de la atresia (Carson et al.

1981). La producción de estradiol es esencial para promover la foliculogénesis e inhibir la atresia folicular. Dado que encontramos que el ovario de las ratonas infectadas muestra un aumento de folículos atrésicos, es posible que la concentración intra-ovárica de estrógenos esté elevada lo que provoca un desbalance estrógenos/andrógenos.

Observamos una disminución significativa en el número de folículos primordiales y primarios en las ratonas infectadas a los dos meses post-infección. Se sabe que estos estadios de desarrollo folicular son independientes de gonadotrofinas, pero el mecanismo que controla el inicio del desarrollo folicular se desconoce (Hoyer et al. 2005). Esperaríamos resultados similares a los 4 y 6 meses post-infección, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticas en comparación con los ratones del grupo control. Un mecanismo de compensación podría ser la causa de estas fluctuaciones, al respecto se ha reportado que la atresia folicular facilita la formación de folículos primordiales (Hirshfield 1991).

En este trabajo se observó una disminución significativa en el número de cuerpos lúteos en los tres tiempos incluidos en el estudio. El hecho de que las ratonas infectadas tuvieron 50% menos cuerpos lúteos a los dos meses de infección y que la diferencia fuera aun más grande a los 6 meses de infección, sugiere fuertemente que la ovulación claramente se afectó por la presencia de los parásitos en la cavidad abdominal.

Por otro parte, nuestros resultados muestran que la infección crónica con *T. crassiceps* WFU causa un incremento en las concentraciones de estradiol sérico comparado con el grupo control. Alteraciones en el ciclo estral del ratón se han descrito como consecuencias de infecciones parasitarias como *Plasmodium vinckei petteri*, donde la infección induce un aumento en los días de estro al inicio de la infección y una disminución después de los 20 días de infección (Barthelemy et al. 2004). Concentraciones elevadas de estradiol a los 4 y 8 semanas post-infección se han observado en ratonas infectadas con *T. crassiceps* ORF y en el suero de ratones machos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (Ramos Robles et al. 2018). Así mismo, Spratt et al (2006) y Dosset et al (2008) encontraron un aumento significativo de 17β -estradiol, como una consecuencia frecuente en infecciones graves.

Es posible que el incremento de estrógenos en el suero de las ratonas infectadas no solo se origine de los folículos ováricos sino también de otras fuentes. Interesantemente, observamos utilizando Western blot que la infección crónica con *T. crassiceps* WFU incrementa la expresión de la enzima P450-aromatasa en el ovario (Fig. 15). Se conoce que la expresión de

aromatasa es regulada por varias citocinas pro-inflamatorias como la IL6 y la IL1, estas interleucinas se incrementan en varias enfermedades infecciosas y también en ratones infectados con *T.crassiceps* ORF (Larralde et al. 1995; Aguilar-Rebolledo et al. 2001; Chavarría et al. 2005), sugiriendo una interacción inmunoendocrina durante la infección parasitaria y un posible mecanismo que le permita al parásito permanecer en el huésped. Hasta donde sabemos, no se han publicado otros estudios sobre la expresión de la aromatasa en ovarios de ratonas infectadas con cisticercos.

Como se indicó en la introducción, P450c17 es una enzima esencialmente importante para la biosíntesis de andrógenos en el ovario, y es también esencial en la esteroidogénesis de las glándulas suprarrenales y testículo.

Por esta razón decidimos evaluar la expresión de esta enzima y nuestros datos mostraron que la infección de *T. crassiceps* WFU incrementa la expresión de la P450c17 en el ovario. Hasta el momento no existen estudios que describan la relación entre la infección de *T.crassiceps* y la expresión de la enzima P450c17. Esta enzima se expresa principalmente en las células de la teca del ovario; se ha planteado la hipótesis de que el aumento de la actividad de esta enzima aumenta la biosíntesis y secreción de andrógenos (Kaur et al. 2018). Se ha demostrado que esta enzima interviene en la generación de esteroides regulando el crecimiento folicular bajo el control de LH. El incremento de la expresión de esta enzima en el ovario de las ratonas infectadas podría estar relacionado al aumento del número de folículos atrésicos encontrados en estos animales. En nuestro estudio, observamos también un significativo aumento en los niveles séricos de andrógenos en las ratonas infectadas comparadas con el grupo control; es posible que el aumento de los andrógenos séricos esté relacionado con un incremento de la expresión de esta enzima clave para la síntesis de andrógenos. Es posible que la síntesis de andrógenos intra-ováricos se eleve y pueda conducir a un desbalance de estradiol/andrógenos.

Con respecto a esto, en el síndrome del ovario poliquístico (SOP), un síndrome donde se presenta alteración en la foliculogénesis, se observa un aumento en la expresión de P450c17 en células de la teca comparado con pacientes sanos (Nelson et al. 1999). De igual forma, se ha reportado que patologías inflamatorias pueden desencadenar eventos en cascada que conduzcan a un incremento en la producción de andrógenos provenientes del ovario (Li et al. 2018). Se ha reportado que mujeres con el SOP presentan niveles elevados de IL6 en suero

(Younis et al. 2014), y alteraciones similares se observaron en las ratonas infectadas con *T. crassiceps* ORF (Larralde et al. 1995).

Una similitud interesante entre neurocisticercosis humana y el SOP se reportó en una paciente por Sacerdote et al. (2012). Además, se ha observado que mujeres con un tipo del SOP que ovulan muestran una hipersecreción de andrógenos pero no de estrógenos, y presentan una foliculogénesis normal. Pero en otro tipo del SOP en el cual las mujeres no ovulan se detectó hipersecreción de andrógenos y de estrógenos; ellas también presentaban un incremento de LH en suero, y una inversión en la proporción LH/FSH. Estas pacientes también presentaron alteración en la foliculogénesis y un incremento de la actividad de la enzima P450-aromatasa en el ovario, así como incremento en la producción de progesterona en cultivos de folículos ováricos con el SOP comparados con folículos de mujeres sanas (Franks et al. 2000). Además se ha reportado que células de la granulosa aisladas de folículos de mujeres que ovulan, secretan estradiol en respuesta a LH cuando los folículos han alcanzado un diámetro de 9-10mm. En contraposición a esto, células derivadas de folículos de mujeres que no ovulan por padecer SOP, la LH estimula la secreción de estradiol y progesterona en células de la granulosa de folículos menores a 4 mm de diámetro (Willis et al. 1998). También, folículos antrales de alrededor de 6-8mm en diámetro producen niveles de estradiol y progesterona parecidos a los encontrados en folículos pre-ovulatorios normales (Willis et al. 1998). Interesantemente, las células de la granulosa provenientes de ovarios de pacientes anovulatorias con el SOP tienen una producción exagerada de estradiol en respuesta a la FSH (Mason et al. 1994). Nuestros hallazgos en la alteración de la función del folículo y la disminución en la cantidad de cuerpos lúteos, sugieren alteraciones en el proceso de ovulación, y son aspectos muy parecidos a los que se observan en mujeres con el SOP que no ovulan. Recientemente se ha reportado que el SOP está asociado con un bajo grado de inflamación. Nuevos hallazgos muestran que los mediadores intrafoliculares de inflamación aumentan en folículos preovulatorios en mujeres con SOP; a su vez un bajo grado de inflamación crónica puede causar una disfunción ovárica en mujeres con dicho síndrome (Cirillo et al., 2019). En nuestro modelo las ratonas infectadas presentan un bajo grado de inflamación crónica por la presencia de los parásitos en la cavidad abdominal, lo que también puede ser un factor que esté contribuyendo a los resultados observados.

En la mayoría de las especies animales, incluyendo el ratón, la tuba (oviducto) está formada por células ciliadas (micro vellosidades) y células secretoras, así como células del músculo liso; se ha reportado que las hormonas del ovario afectan la estructura epitelial del oviducto así como la longitud de los cilios. Existen datos que indican que las alteraciones en los niveles de esteroides ováricos pueden inducir un mal funcionamiento del oviducto e infertilidad. Los estrógenos estimulan la hipertrofia de las células epiteliales, aumentan la secreción y la ciliogénesis, mientras que la atrofia, deciliación y disminución en la longitud de los cilios está asociada con altos niveles de progesterona en suero (Lyons et al. 2006). Nosotros observamos una disminución en la longitud de las micro-vellosidades del oviducto y un incremento en las concentraciones de estradiol en suero en la ratonas infectadas con *Tc* WFU. Respecto a estos resultados Verhage et al (1979) evaluó la longitud de las células ciliadas del oviducto así como su morfología y los correlacionó con los niveles en suero de hormonas ováricas, reportó altos niveles de estradiol en suero durante periodos de atrofia y deciliación, mientras que la longitud de las células se encontraba reducida. Estradiol por sí solo no tiene efecto sobre las células ciliadas; sin embargo puede regularlas indirectamente a través de la estimulación de los receptores de progesterona (Shao et al. 2007). De igual forma se ha observado que infecciones con microorganismos como la *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia* and *Escherichia coli* causan efectos en la mucosa del oviducto, lo cual resulta en la pérdida de las células ciliadas del oviducto o la disminución en la longitud de las mismas (Lyons et al. 2006), sin embargo en estas infecciones los microorganismos ascienden dentro del tracto genital donde causan inflamación. Alteraciones en las células del oviducto se han observado en mujeres con endometriosis en las que se encontró un incremento de citocinas pro-inflamatorias en el fluido peritoneal, que podría estar afectando directamente a las micro-vellosidades del oviducto; sin embargo se desconoce el mecanismo que lleva a estos cambios (Lyons et al. 2006); por otra parte se ha observado que mujeres infértiles por alteraciones en el oviducto presentan elevados niveles de IL-6 en el líquido folicular, por lo que se puede especular que IL-6 puede contribuir de manera indirecta a las alteraciones del oviducto (Calogero et al., 1998).

En el caso de la infección con de *T. crassiceps* WFU los cisticercos no se encontraron en el oviducto pero la inflamación peritoneal pudo ser de manera indirecta, la causa de las alteraciones en las células ciliadas. Este es el primer estudio que describe la relación entre la

infección con *T. crassiceps* WFU y alteraciones en el oviducto; sin embargo se necesitan más estudios para explicar el mecanismo por el cual se origina este daño.

En resumen, el presente estudio describe por primera vez la capacidad de *T. crassiceps* WFU de alterar la función del ovario y de enzimas esteroidogénicas en una infección crónica. Nuestros hallazgos sugieren que la infección con *T. crassiceps* WFU es un disruptor endocrino que tiene un impacto negativo en el sistema reproductor femenino que podría afectar la fertilidad.

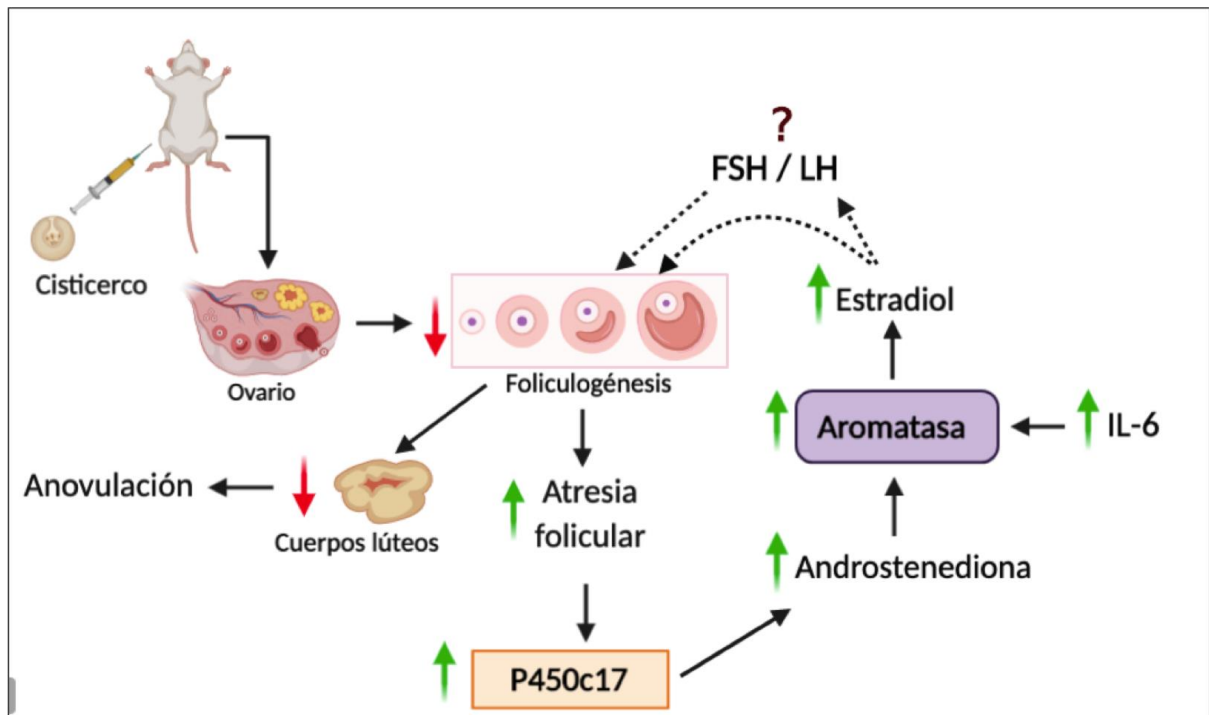


Figura 19. Resumen de resultados. La infección crónica con cisticercos de *T. crassiceps* WFU causa una disminución en el número de folículos en desarrollo así como una significativa disminución de cuerpos lúteos, lo que tiene como consecuencia una posible disminución en la ovulación de las hembras infectadas. También se ve reflejado un aumento significativo en el número de folículos atrésicos, la atresia folicular está relacionada con un aumento en la expresión de la enzima P450c17 lo que observamos en nuestros resultados, esta enzima es requerida para la síntesis de andrógenos, se observó un aumento de androstenediona que sirve como precursor de la enzima P450-aromatasa, enzima requerida para la síntesis de estrógenos, la expresión de esta enzima aumentó y se ha reportado que citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 puede modular a la alta la actividad de P450- aromatasa y como resultado a esto se observó un aumento significativo en las concentraciones séricas de estradiol. Un aumento en las concentraciones de estradiol causa un desbalance en FSH/LH que puede tener un efecto negativo en la foliculogénesis.

5. CONCLUSIONES

- * La infección con cisticercos de *Tc* altera el desarrollo folicular y la función endócrina del ovario.
- * Como resultado de las alteraciones foliculares se atrofian las vellosidades del oviducto, imprescindibles para la gestación.
- * La infección con el cisticerco modifica la expresión de enzimas esteroidogénicas y un aumento en las concentraciones de estradiol y androstenediona en suero, lo que asemeja a lo que sucede en el síndrome de ovario poliquístico.
- * En resumen, el presente estudio describe por primera vez la capacidad de *Taenia crassiceps* de alterar la función ovárica y las enzimas esteroidogénicas en una infección crónica.
- * Nuestros hallazgos sugieren que la infección con *Taenia crassiceps* WFU actúa como disruptor endócrino y tiene un impacto negativo en el sistema reproductor de la hembra que puede afectar su fertilidad.

6. PERSPECTIVAS

- Evaluar la concentración sérica de FSH y LH en las ratonas infectadas y controles.
- Evaluar el efecto de la infección en el endometrio de las ratonas infectadas.
- Evaluar la expresión de citocinas pro-inflamatorias en las ratonas infectadas y no infectadas.
- Evaluar la tasa de fertilidad de las ratonas infectadas.

7. REFERENCIAS

- Aceves-Ramos, A., Valdéz, R.A., Gaona, B., Willms, K., Romano, M.C., 2013. Steroid Synthesis by *Taenia Crassiceps* WFU Cysticerci is Regulates by Enzyme Inhibitors. *Gen. Comp.* 188(1), 212-17. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.034>.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.021>
- Aguilar-Rebolledo, F., Cedillo-Rivera, R., Llaguno-Violante, P., Torres-López, J., Muñoz-Hernández, O., Enciso-Moreno, J., 2001. Interleukin levels in cerebrospinal fluid from children with neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64(1, 2), 35-40. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.35>
- Arteaga-Silva, M., Vargas-Villavicencio, J.A., Viguera-Villaseñor, R.M., Rodríguez-Dorantes, M., Morales-Montor, J., 2009. *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice. *Acta Trop.* 109, 141-145. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.011>
- Barone, I., Giordano, C., Malivindi, R., Lanzino, M., Rizza, P., Casaburi, I., Bonofiglio, D., Catalano, S., Ando, S., 2012. Estrogens and PTP1B function in a novel pathway to regulate aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Endocrinology.* 153 (11), 5157-5166.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1160-2>
- Bhatt, M.R, Khatri, Y., Rodgers, R.J, Martin, L.L., 2017. Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase

- (P450 17A1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 170, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.033>
- Blackwell, A.D., Tamayo, M.A., Beheim, B., Trumble, B.C., Stieglitz, J., Hooper, P.L., Martín, M., Kaplan, H., Gurven, M., 2015. “Helmint Infection, Fecundity, and Age of first Pregnancy in Women”. *Science*. 350 (970), 6-9.
- Bulun, S.E., Noble, L.S., Takayama, K., Michael, M.D., Agarwal, V., Fisher, C., Zhao, Y., Hinshelwood, M.M., Ito, Y., Simpson, E.R., 1997. Endocrine Disorders Associated with Inappropriately High Aromatase Expression. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 61, 133-139. [http://doi:10.1016/S0960-0760\(96\)00248-8](http://doi:10.1016/S0960-0760(96)00248-8).
- 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. *Pharmacol Rev.* 57, 359-383. <http://doi:10.1124/pr.57.3.6>.
- Caloger, A.E., Nicoletti, F., Palumbo, M.A., Burrello, N., Di Mauro, M., Lunetta, M., Bendtzen, K., Cianci, A., 1998. Macrophage-Derived Cytokines in the Follicular Fluids of Women With Infertility Due To Immunological Causes Elevated Levels of Interleukin 6 and Low Levels of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Cytokine*. 10, 814-818. <https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0363>.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Clarke, I.J., Burguer, H.G., 1981. Estradiol, Testosterone, and Androstenedione in Ovine Follicular Fluid During Growth and Atresia of Ovarian Follicles. *Biol. Reprod.* 24, 105-113. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.1.105>
- Carlson, B. M., 2014. *Embriología humana y Biología del desarrollo*. Barcelona, España: Elsevier.
- Chavarría, A., Fleury, A., García, E., Márquez, C., Fragoso, G., Sciutto, E., 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocisticercosis and the immune-

- inflammatory profiles. Clin Immunol. 116, 217-278.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.04.008>
- Cirillo, F., Catellani, C., Lazzeroni, P., Sartori, C., Nicoli, A., Amarri, S., Battista La Sala, G., Street, M.E., 2019. MiRNAs Regulating Insulin Sensitivity Are Dysregulated in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Ovaries and Are Associated With Markers of Inflammation and Insulin Sensitivity. Front Endocrinol. 10, 879.
<https://doi:10.3389/fendo.2019.00879>
- Dossett, L.A., Swenson, B.R., Evans, H.L., Bonatti, H., Sawyer, R.G., May, A.K., 2008. Serum estradiol concentration as a predictor of death in critically ill and injured adults. Surg Infect (Larchmt). 9(1), 41-48. <https://doi.org/10.1089/sur.2007.037.Serum>
- Fernández Presas, A.M., Valdez, R.A., Willms, K., Romano, M.C., 2008. The key steroidogenic enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU). Parasitol. Res. 103, 847-852. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1066-5>
- Fitzpatrick, S.L., Richards, J.S., 1991. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. Endocrinology. 129, 1452-1462.
- Franks, S., Mason, H., Willis, D., 2000. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. Mol. Cell. Endocrinol. 163, 49-52. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00239-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00239-7)
- García, H.H., Gonzalez, A.E., Evans, C.A.W., Gilman, R.H., 2003. *Taenia solium* Cysticercosis. Lancet. 362, 547-556. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14117-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14117-7)
- Hawkins, S.M., Matzuk, M.M., 2010. Menstrual Cycle: Basic Biology. 10-18.
<https://doi.org/10.1196/annals.1429.018.Menstrual>.
- Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol. 124, 43-101. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)

- Hotez, P., Whitham, M., 2014. Helminth infections: A new global women's health agenda. *Obstet. Gynecol.* 123, 155-160. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000025>
- Hoyer, P.B., 2005. Damage to ovarian development and function. *Cell Tissue Res.* 322, 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1083-y>
- Jamnongjit, M., Hammes, R.S., 2006. Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals That Raise Them. *Cell cycle.* 5 (11), 1178-83. <http://doi.org/10.4161/cc.5.11.2803>.
- 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. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0109>.
- Kaur, R., Kaur, T., Kaur, A., 2018. Genetic association study from North India to analyze association of CYP19A1 and CYP17A1 with polycystic ovary syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 35, 1123–1129. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1162-0>
- 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. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575–580. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00062-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00062-5)
- Larralde, C., Aluja, A.S., 2007. Cisticercosis: Guia Para Profesionales de La Salud. *Journal of Parasitology.* 93 (4), 975-76. <https://doi.org/10.1645/GE-1379.1>.
- Lephart, E.D., Simpson, E.R., 1991. Assay of aromatase activity. *Methods Enzymol.* 206, 477-83. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)06116-k](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)06116-k)
- Li, Y., Zheng, Q., Sun, D., Cui, X., Chen, S., Bulbul, A., Liu, S., Yan, Q., 2018. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *J. Cell. Physiol.* 234, 7435–7447. <https://doi.org/10.1002/jcp.27501>

- Lin, Y.C., Rikihisa, Y., Kono, H., Gu, Y., 1990. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniaeformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Exp. Parasitol.* 70, 344–352. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90116-T](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90116-T)
- Lyons, R.A., Saridogan, E., Djahanbakhch, O., 2006. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum. Reprod. Update.* 12(4), 363–372. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml012>
- Mason, H.D., Willis, D.S., Beard, R.W., Winston, R.M., Franks, S., 1994. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and to concentrations of sex steroids in follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1355-1360. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.5.7962330>
- McGee, E.A., Hsueh, A.J.W., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 21(2), 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- Miller, W.L., Tee, M.K., 2015. The post-translational regulation of 17,20 lyase activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.010>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00130-3)
- Nelson, V.L., Legro, R.S., Strauss, J.F., McAllister, J.M., 1999. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endo.* 13, 946-957. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0311>
- Patricio-Gómez, J.M., Valdéz, R.A., Veloz, A., Aguilar-Vega, L., Zurabian, R., Romano, M.C., 2017. The synthesis of steroids by *Taenia crassiceps* WFU cysticerci and tapeworms is related to the developmental stages of the parasites. *Gen Com Endocrinol.* 259, 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.018>.

- Ramos Robles, B., Valdez, R.A., Juárez Hernández, U., Marquina Castillo, B., Mata Espinoza, D., Barrios Payan, J., Hernández Pando, R., Romano, M.C., 2018. Immunoendocrine abnormalities in the male reproductive system during experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 109, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.02.005>
- Richards, J.S., Pangas, A.S., 2010. New Insights into Ovarian Function. 198, 117-38. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02062-9>.
- Román, G., Sotelo, J., Del Brutto, O., Flisser, A., Dumas, M., Wadia, N., Botero, D., 2000. A Proposal to Declare Neurocysticercosis an International Reportable Disease. *Bulletin of the World Health Organization*. 78 (3), 399-406. <https://doi.org/10.1590/s0042-96862000000300016>.
- Romano, M.C., Váldez, 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. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00233-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00233-4)
- Romano, M.C., Valdés R.A., Hinojosa, L., Gómez, Y., Jiménez, P., 2008. Are hormones relevant for the search and desing of anti-parasitic drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 408-414. <https://doi.org/10.2174/156802608783790884>.
- Romano, M.C., Jiménez, P., Miranda-Brito, C., Váldez, R.A., 2015. Parasites and steroid hormones: corticosteroid and sex steroid synthesis, their role in the parasite physiology and development. *Front. Neurosci.* 9, 224. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00224>
- Sacerdote, A.S., Mejía, J.O., Bahtiyar, G., Salamon, O., 2012. Effect of raloxifene on human neurocysticercosis. *Endocr. Rev.* 32, 3–7. <https://doi.org/10.1136/bcr.06.2011.4417>
- Shao, R., Weijdegard, B., Fernandez-Rodriguez, J., Egecioglu, E., Zhu, C., Andersson, N., Thurin-Kjellberg, A., Bergh, C., Billig, H., 2007. Ciliated epithelial-specific and regional-specific expression and regulation of the estrogen receptor- β 2 in the fallopian tubes of

- immature rats: a possible mechanism for estrogen-mediated transport process in vivo. *Am. J. Physiol. Metab.* 293, E147–E158. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00101.2007>
- Solano, S., Zepeda, N., Copitin, N., Fernandez, A.M., Tato, P., Molinari, J.L., 2013. A *Taenia crassiceps* metacestode factor enhances ovarian follicle atresia and oocyte degeneration in female mice. *J. Helminthol.* 89, 49–57. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000588>
- Spratt, D.I., Morton, J.R., Kramer, R.S., Mayo, S.W., Longcope, C., Vary, C.P.H., 2006. Increases in serum estrogen levels during major illness are caused by increased peripheral aromatization. *Am. J. Physiol. Metab.* 291, E631–E638. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00467.2005>.
- Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G., 2007. The Molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28(1), 117-149. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0022>
- Stocco, C., 2008. Aromatase Expression in the Ovary: Hormonal and Molecular Regulation. *Steroids.* 73(5), 473-487. <https://doi.org/10.1016/j.asieco.2008.09.006.EAST>
- Stocco, C., 2012. Tissue Physiology and Pathology of Aromatase. *Steroids.* 77(1-2), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.10.013>.
- Tresguerres, J.A.F., Castillo, C., 2010. Fisiología de eje hipotalamo-hipófiso-ovárico. Capítulo 79 en: *Fisiología humana*. 4ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, pp.1007-1022.
- Valdéz, 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0095-6>

- Valdéz, R.A., Jiménez, P., Fernandez Presas, A.M., Aguilar, L., Willms, K., Romano, M.C., 2014. *Taenia solium* tapeworms synthesize corticosteroids and sex steroids in vitro. *Gen Comp Endocrinol.* 205 (1), 62-7. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.014>.
- Verhage, H.G., Bareither, M.L., Jaffe, R.C., Akbar, M., 1979. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am. J. Anat.* 156, 505–521. <https://doi.org/10.1002/aja.1001560405>
- Willis, D.S., Watson, H., Mason, H.D., Galea, R., Brincat, M., Franks, S., 1998. Premature Response to Luteinizing Hormone of Granulosa Cells from Anovulatory Women with Polycystic Ovary Syndrome: Relevance to Mechanism of Anovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(11), 3984–3991. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5232>
- Willms, K., 2008. Morphology and Biochemistry of the Pork Tapeworm, *Taenia Solium*. *Curren Topics in Medicinal Chemitry.* 8(5), 375-82. <https://doi.org/10.2174/15680260878390875>.
- Willms, K., Robert, L., 2007. Ultrstructure of a Spermatid Transport System in the Mature Proglottids of Experimental *Taenia Crassiceps* (WFU Strain). *Parasitology Research.* 101 (4), 967-73. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0570-3>.
- Willms, K., Zurabian, R., 2010. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology.* 335–346. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>
- Younis, A., Hawkins, K., Mahini, H., Butler, W., Garelnabi, M., 2014. Serum tumor necrosis factor- α , interleukin-6, monocyte chemotactic protein-1 and paraoxonase-1 profiles in women with endometriosis, pcos, or unexplained infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 1445–1451. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0237-9>



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

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

Effect of mice *Taenia crassiceps* WFU cysticerci infection on the ovarian folliculogenesis, enzyme expression, and serum estradiol

A. Veloz^a, Liliana Reyes-Vázquez^{a,b}, J.M. Patricio-Gómez^a, M.C. Romano^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV del I.P.N., México CdMx, Mexico

^b Departamento de Toxicología, CINVESTAV del I.P.N., CdMx, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Ovary
Cysticerci
Folliculogenesis
Estradiol
Steroidogenic enzymes

ABSTRACT

The murine infection with *Taenia crassiceps* WFU (*T. crassiceps* WFU) cysticerci has been widely used as an experimental model to better understand human cysticercosis. Several reports have established that the host hormonal environment determines the susceptibility and severity of many parasite infections. Female mice are more susceptible to infection with *T. crassiceps* cysticerci suggesting that a rich estrogen environment facilitates their reproduction. Ovarian androgens and estrogens are synthesized by key enzymes as P450-aromatase and 17 α -hydroxylase/17, 20 lyase (P450_{C17}). The aim of this study was to determine the effect of chronic intraperitoneal infection of *T. crassiceps* WFU cysticerci on mice ovarian follicular development, ovulation, the expression of ovarian P450-aromatase and P450_{C17}, and serum 17 β -estradiol, key enzymes of the ovarian steroidogenic pathway. To perform this study ovaries and serum were obtained at two, four and six months from *T. crassiceps* WFU cysticerci infected mice, and compared to those of healthy animals. The ovaries were fixed and processed for histology or lysed in RIPA buffer for Western blot using specific antibodies for P450_{C17} and P450-aromatase. 17 β -estradiol serum concentration was measured by ELISA. The results showed that the infection with *T. crassiceps* WFU cysticerci significantly reduced the number of primordial and primary follicles after two months of infection. Through the course of the study, the corpus luteum number began to decrease, whereas atretic follicles increased. The expression of ovarian P450_{C17} and P450-aromatase as well as serum E2 concentration were significantly increased in the infected group compared to control. These findings show that chronic infection with *Taenia crassiceps* WFU may alter the reproductive functions of the female mice host.

1. Introduction

Taenia solium human and porcine cysticercosis is a parasitic disease related to poor sanitary conditions and inadequate hygiene in endemic areas and is still frequent in Mexico and in developing countries of Asia, Africa and Latin America (García et al., 2003; Fleury et al., 2015; Morales et al., 2018). Humans can become infected by the adult parasite (*Taenia*) and by the larval stage (cysticerci). Parasite localization in human brain, known as neurocysticercosis, is the most common parasitic disease of the central nervous system (Webb et al., 2018). The murine infection with the cestode parasites *Taenia crassiceps* ORF or WFU, has been widely used as an experimental model to better understand human cysticercosis (Willms and Zurabian, 2009). *T. crassiceps* ORF cysticerci cannot develop the worm because they had lost the scolex. On the other hand, *T. crassiceps* WFU cysticerci have a scolex able to develop a worm when administered PO to hamsters (Willms and Zurabian, 2009).

It has been shown that the host hormonal environment determines the susceptibility, the course and severity of many parasite infections. Hormones are the primary regulators of animal growth and development. Many parasites show a response to host hormonal signals, or alter its hormonal physiology by modifying the rates of endogenous hormone biosynthesis, degradation, or binding to target receptors. Several studies have shown that *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* ORF cysticerci transform steroid precursors such as progesterone (P₄), dehydroepiandrosterone (DHEA), and androstenedione (A₄) to androgens and estrogens (Jiménez et al., 2006; Valdéz et al., 2006), and have described the capacity of *Taenia crassiceps* WFU cysticerci and tapeworms to transform tritiated precursors to sexual steroids and corticosteroids (Patricio-Gómez et al., 2017). These studies suggest that the parasite has the enzymes that participate in the $\Delta 4$ and $\Delta 5$ biosynthetic pathways involved in the synthesis of androgens and estrogens. Other studies described the presence of the enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in

* Corresponding author. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 07360, Ciudad de México, Mexico.

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

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107778>

Received 18 June 2019; Received in revised form 13 August 2019; Accepted 14 October 2019

Available online 17 October 2019

0014-4894/ © 2019 Published by Elsevier Inc.

Taenia solium cysticerci and tapeworms (Fernández Presas et al., 2008). In addition, Aceves-Ramos et al. (2014) have demonstrated that *Taenia solium* cysticerci express the enzyme 17 β -HSD that belongs to the short chain dehydrogenases/reductase family, and transforms A4 to testosterone. Furthermore, steroid synthesis by parasites may contribute to defend them from attack of immune cells and therefore facilitate their survival in the host tissues (Romano et al., 2015).

A reciprocal interaction between host and parasites occurs in several parasitic diseases because parasites synthesize substances that induce changes in the host tissues and even can reach the host circulation (Romano et al., 2003). The presence of parasites in the host can change its endocrine equilibrium and its immune system and affect the parasitic charge, the course of the infection and the parasite's survival (Romano et al., 2015). Because the host hormones also affect the parasite's development susceptibility, the parasitic infection could be different in males and females. For example, female mice are more susceptible to infection with *Taenia crassiceps* ORF cysticerci than males, suggesting that a rich estrogen environment facilitates their proliferation (Sciutto et al. 1991).

It has been observed that the infection of female mice with *T. taeniaeformis* decreases mating, uterine implantation sites and number of full-term pups after 5 months of the parasite inoculation (Lin et al., 1990). Likewise, *Taenia crassiceps* ORF cysticerci disrupts the mice normal estrous cycle, and inhibits typical sexual behavior in female and male animals (Arteaga-Silva et al., 2009). Solano et al. (2013) reported that subcutaneous inoculation with a low molecular weight *Taenia crassiceps* ORF metacestode factor caused ovarian follicular atresia (predominantly in antral/preovulatory stages of development), and oocyte degeneration after 45 days of treatment. In addition, two slices of the ovaries of each of 6 control or infected mice were H/E stained, and data showed that infected female mice had an increased number of atretic follicles compared with the total follicles after 45 days (Solano et al., 2013).

In females, 17 β -estradiol modulates the structure and function of reproductive tissues, such as the uterus and oviduct (Stocco, 2008). Ciliated cells of the oviduct are dependent on estradiol and progesterone concentrations; they are part of the cylindrical epithelial cells that have the function of transporting both gametes and embryos. Fluctuations in circulating estradiol are responsible for the characteristic female pattern through their activity function on the hypothalamus-pituitary ovary axis.

Estrogens are crucial for female and male fertility; several reports have shown that severe reproductive defects occur when their synthesis is blocked. These steroids are synthesized by the enzyme P450-aromatase encoded by the *Cyp19a1* gene, from androgen precursors as A4 and testosterone. This enzyme is expressed in the ovary by granulosa cells and also found in a number of extragonadal sites, including bone, breast, adipose tissue and brain (Simpson et al., 2001; Mendelson and Kamat, 2007). In the ovary, the androgenic substrate for aromatase is produced by theca cells of the follicle, and these steroids are also directly involved in the regulation of this enzyme. The ovarian estrogens are fundamental for the female reproductive cycle (Stocco, 2008). The ovarian follicle is the functional unit of the ovary; basically it includes an oocyte surrounded by two somatic cells, the granulosa and theca cells. The process of follicular development involves maturation steps called folliculogenesis, that goes through a primordial follicle, transformed into a primary follicle, an antral follicle, and finally into a mature dominant follicle that will release an oocyte at ovulation. This process is regulated in part by the pituitary gonadotropins follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) that stimulates the synthesis of 17 β -estradiol and progesterone (Kolibanakis et al., 2005). Some follicles do not continue their maturation to antral follicles and goes to atresia. Ovarian follicular atresia is a hormonally controlled apoptotic process, and occurs at all stages of follicle development. An increased androgen to estrogen ratio is found in the follicular fluid of atretic follicles in ovine and porcine ovaries (Chun and Hsueh, 1998)

and it has been also reported that besides sex steroids, several intraovarian factors induce atresia (Kaipia and Hsueh, 1997).

P450_{C17} is also a key ovarian enzyme involved in androgen synthesis. It is an endoplasmic reticulum membrane-bound multifunctional enzyme that exhibits 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase activities, catalyzes the conversion of pregnenolone to 17-hydroxy-pregnenolone and of progesterone to 17-hydroxyprogesterone, also transform 17 α -hydroxypregnenolone (or 17 α -hydroxyprogesterone) to DHEA (or androstenedione), which are rate-limiting steps in androgen biosynthesis. In rodents such as rat, P450_{C17} is not expressed in the adrenal gland, but is expressed predominantly in the gonads producing androstenedione. The biochemical activity whether P450_{C17} stops after 17 α -hydroxylation or proceeds to 17,20 lyase is dependent on three post-translational factors: first 17,20 lyase activity is especially sensitive to the molar abundance of the electron-transfer P450 oxidoreductase. Second, cytochrome *b₅* strongly promotes 17, 20 lyase activity and finally, the serine/threonine phosphorylation of P450_{C17} catalyzed by cAMP (Bhatt et al., 2017; Mathieu et al., 2002; Miller and Tee, 2015).

To our knowledge, data of the influence of long term infection with *T. crassiceps* WFU cysticerci on folliculogenesis and corpus luteum formation is limited, and no data are available on the impact on serum estrogen, and the expression of key ovarian steroidogenic enzymes. Furthermore, we have evaluated the length of the oviduct ciliated cells because they are hormone targets, and hence any alteration in the levels of sex steroids might be reflected in the ciliated cells morphology.

Therefore, the aim of this study was to determine in detail whether *Taenia crassiceps* WFU cysticerci long term infection affects each type of ovarian follicles, the ovulation evaluated by corpus luteum formation, serum estrogen and the expression of P450-aromatase and P450_{C17}, key enzymes of the ovarian steroidogenic pathways.

2. Material and methods

2.1. Ethics statements

All animal use procedures for this study were approved by Laboratory Animal Use and Care Committee at Cinvestav and were performed in accordance with the international Guidelines for the Use and Care of Experimental Animals.

2.2. Animals

Six week old Balb/c female mice were obtained from the breeding colony at the Cinvestav animal facility, housed in filtered polysulfone cages, and maintained under 12 h dark-light cycles. The animals had free access to commercial chow and sterilized tap water. Mice were caged in groups of five in an approved animal facility.

2.3. Parasites and infection procedure

Cysticerci from WFU *Taenia crassiceps* strain were used for mice infection in all experiments. Parasites have been maintained in female Balb/c mice by i. p sequential inoculation of metacestodes in their peritoneal cavity. Animals included in the study were randomly assigned to control and infected groups. Larvae for the experimental infection were obtained from female donor mice previously infected for 2–4 months. Ten small (approximately 2 mm in diameter) non-budding *T. crassiceps* larvae were suspended in phosphate-buffered-saline, pH 7.2 (PBS) and injected i. p into each mouse using a 0.25 gauge needle. Control mice were injected with PBS. Groups of four non-infected and infected animals were sacrificed at 2, 4 and 6 months post infection. Body weight of control and infected animals was registered. After a careful collection of the abdominal cysticerci, the carcasses were also weighed.

2.4. Steroid hormone assay

Mice were weighed and sacrificed by decapitation, after blood was collected in non-heparinized tubes; serum samples were obtained through centrifugation at 1500 rpm for 15 min and maintained at -20°C until required. For 17β -estradiol (E_2) concentrations, an enzyme immunoassay was performed using a commercial DRG estradiol enzyme immunoassay kit [DRG® Estradiol sensitive ELISA (EIA-4399)] following the manufacturer's protocol. The antiserum used in the assay was specific for E_2 . The cross-reactivity of the assay was 100% with Estradiol, 0.2% with Estrone, 0.05% with Estriol and 0% with other related steroids/steroids derivatives. The analytical sensitivity of the assay was < 1.399 pg/mL.

2.5. Preparation of ovaries and uterus tissue for histological studies

Uterus and left ovaries from infected and non-infected mice were fixed with 4% formaldehyde diluted in PBS for 24 h and embedded in paraffin. Sections, 4 μm thick were cut with a LEICA RM2245 microtome and mounted on glass slides, deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy (Olympus Bx51 microscope).

2.6. Counting of follicles and corpus luteum number

The total count of follicles and corpora lutea (CL) were done in the ovaries by examining every fourth serial section of each ovary. The developing and mature follicles, were classified in: a) primordial follicles, with a single layer of granulosa cells; b) primary follicles with a single layer of cuboidal granulosa cells; c) antral follicles, with several layers of granulosa cells, and antrum filled with fluid, and well-differentiated thecal cells outside the basement membrane; and d) pre-ovulatory or Graafian follicles, follicles that reach the maximal diameter and have shown to be responsive to the preovulatory surge of gonadotropins (morphological classification was according (Myers et al., 2004). The number of atretic follicles (non-healthy) was also counted. The atretic follicles were characterized by degenerating oocytes or changes in the oocyte morphology (e.g. deformed shape or fragmentation). Data are presented as percentage of follicles or CL per ovary.

The length of the cilia of the oviduct cells of control and infected animals was measured in an Olympus digital microscope using the Infinity 1-lumera software. 10 fields of each of 4 sample/mice were evaluated.

2.7. Tissue homogenization for western blot analysis

The right ovaries were used for Western blot analysis. The ovaries were homogenized at 4°C using a Polytron homogenizer, in a solution of 50 mM Tris-HCL, pH 7.4, plus protease inhibitors (Protease inhibitors Cocktail, Sigma-Aldrich Quimica, SA de CV, México). The samples were then centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4°C . The resultant supernatant was collected for Western blot analysis. Total protein concentration was measured by the Bradford's method using bovine serum albumin (BSA) as the standard. An equal amount of protein extract (40 μg) was loaded per well and separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-poly-acrylamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were electro-transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) in a Hoefer semidry unit (Hoefer Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, CA, USA), blocked with 5% non-fat dry milk in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tween) for 1 h. Membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against Cyp 19 Aromatase (1:1000) (OriGene Technologies Inc.) or P450_{C17}, and GAPDH as a loading control (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Next, membranes were washed three times with PBS-Tween 1% and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-

conjugated anti-rabbit Ab (Bio-Rad, Hercules CA, USA, 1:5000) or HRP-conjugated anti-mouse Ab (Bio-Rad, Hercules CA, USA, 1:5000) for 2 h at room temperature. After washing three times with PBS-Tween, bands were visualized using Luminata Forte western HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, USA) and X-ray films (Kodak, Palo Alto, CA, USA). Finally, autoradiograms were scanned in a Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, USA) and quantified using ImageJ software (NIH, USA).

3. Statistical analysis

The results are presented as the mean plus or minus standard error and $P < 0.05$ was considered as significant. The comparison between groups was performed with analysis of variance (ANOVA) and statistical significance was determined with the *post-hoc* Bonferroni multiple comparison test, and unpaired Student's *t*-test, was used to investigate statistical differences between groups. Data analyses were performed using Graph Pad Prism version 7.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego CA, USA).

4. Results

4.1. *T. crassiceps* infection does not alter the mice body weight

To determine the impact of the cysticerci *Tc* infection on the mice body weight, the animals were weighed at sacrifice. There was a significantly increase on body weight at 2, 4 and 6 months post-infection compared to control group. After parasite's collection we did not find statistical differences in the carcass weights between groups (Fig. 1).

4.2. Infection with *Tc* cysticerci affects ovarian histology and follicle number

After 2 months of infection the ovaries of the infected group showed a significant increase in the total number of atretic follicles compared with the control group. The quantity of primordial and primary follicles were significantly decreased after two months of infection (Fig. 2a), but the difference was not statistically significant after that time. The number of antral and pre-ovulatory follicles was not modified by the infection. Nevertheless, the amount of atretic follicles of the infected mice continued growing as the infection progressed (Fig. 2 b and c), while remained stable at 4 and 6 months in the control animals. Representative images of the ovaries of infected and control are shown in (d) and (e). A noticeable number of atretic follicles and the decreased amount of antral follicles and corpora lutea in the ovaries of infected animals are remarkable.

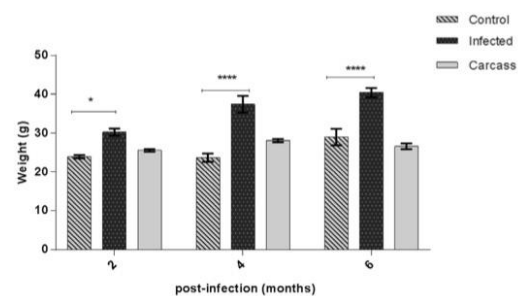


Fig. 1. Time course of body and carcass weight of control and *Tc* cysticerci infected mice. Each bar represents the mean \pm SEM ($n = 4$ per group). * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ different compared to the control animals.

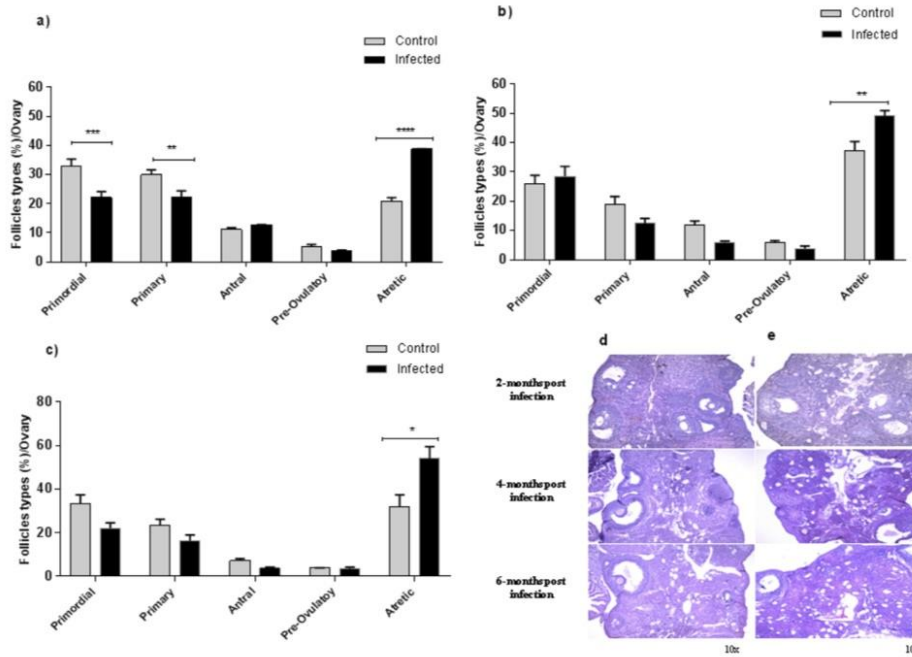


Fig. 2. Effect of *Taenia crassiceps* WFU infection on the total number of ovarian follicles. Total number of the different ovarian follicles of control and infected groups at 2, 4 and 6 months post-infection. a. Two months post infection; b. 4 months post infection; c. 6 months post infection; d, representative micrographs of the evolution of the ovaries of control (d) and (e) infected mice along the study (H:E). Each bar represents the mean \pm SEM (n = 4 per group). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 different compared to the control.

4.3. Infections with *Tc* cysticerci decreases the total number of corpora lutea

In order to estimate the ovulation process we have counted the corpus luteum in the ovaries of control and infected mice. A significant decrease in the amount of corpus luteum was observed at 2 and 4 months of infection. The difference was still more evident at 6 months of infection (Fig. 3).

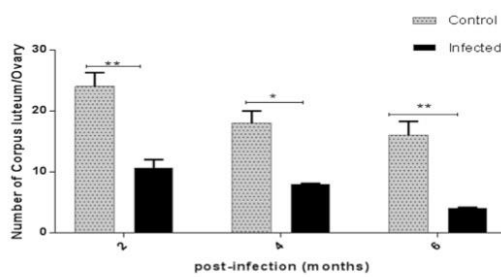


Fig. 3. Effect of the infection with *Tc* WFU on the total number of ovarian corpora lutea. Two months post infection; 4 months post infection and 6 months post infection. Each bar represents the mean \pm SEM (n = 4 per group). *p < 0.05, **p < 0.01 different compared to the control.

4.4. Effect of *Taenia crassiceps* cysticerci on the ciliated cells of mouse oviduct

Fig. 4 shows the length of the cilia of the oviduct cells of control and infected animals. We have observed a significant decrease in the length of the ciliated cells of the infected group compared to control at two, four and six months post-infection.

4.5. Serum estrogen levels of female mice from control and infected group

The measurement of serum estrogen (E_2) concentration showed that the infection with cysticerci significantly increased the hormone at two, four and six months post infection (Fig. 5).

4.6. Effect of *Tc* infection on P450-aromatase and P450_{C17} ovarian expression

As we have observed an alteration in serum estradiol concentrations in infected female mice, we have decided to evaluate the expression of two key ovarian enzymes, cytochrome P450-aromatase and P450_{C17} by Western blot. A significant increase in P450-aromatase expression was observed in the ovaries of the infected group compared to the control animals at 2, 4 and 6 months post-infection (Fig. 6). The expression of P450_{C17} was significantly increased at 4 and 6 months of infection. The densitometric analysis of the Western blot results showed a significant increase in the expression of cytochrome P450-aromatase and P450_{C17} in the ovaries of infected females compared to control mice (Fig. 7).

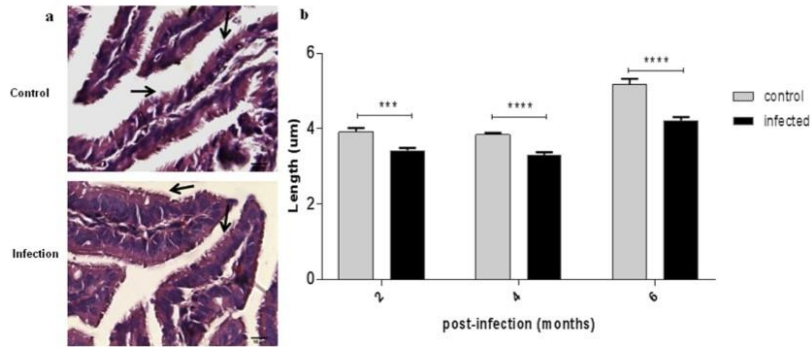


Fig. 4. Effect of the infection with *Tc* WFU in the length of the ciliate cells of the oviduct. a. Representative micrograph that shows the oviduct ciliated cells (100×). b. Two months, 4 months and 6 months post infection. Each bar represents the mean ± SEM (n = 4 per group). ***p < 0.001, ****p < 0.0001 different compared to the control.

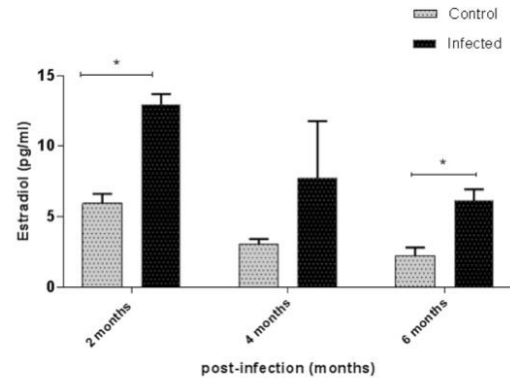


Fig. 5. The infection of female mice with *Tc* WFU significantly increased the circulating estradiol concentrations. Serum samples of control and infected group were collected to measure estradiol concentrations. An increase of estradiol levels was observed in the infected group at 2, 4 and 6 months post-infection. Each bar represents the mean ± SEM (n = 6 per group). *p < 0.05 different compared to the control.

5. Discussion

The helminthiasis represent some of the most common global health conditions of women living in developing countries, and two helminth infections in particular hookworm infection and schistosomiasis stand out for their devastating effect on reproductive health (Hotez and Whitham, 2014). This is the first study to demonstrate the effects of long term infection with *Taenia crassiceps* WFU in several female mice reproductive aspects as ovarian steroidogenic enzyme expression, serum estradiol concentration, detailed evaluation of the evolution of each follicle type and corpus luteum presence. Because of the practical laboratory management, murine cysticercosis infection with *Taenia crassiceps* WFU is a good biological model to study the interaction between the host and the parasites.

The significant increase observed in the body weight of infected mice during the course of the infection (Fig. 1) should be attributed to the increase of parasite burden because carcass weights were similar in both groups.

In our study, we have found that long term *Tc* infection causes alterations in the development of the different ovarian follicles and a

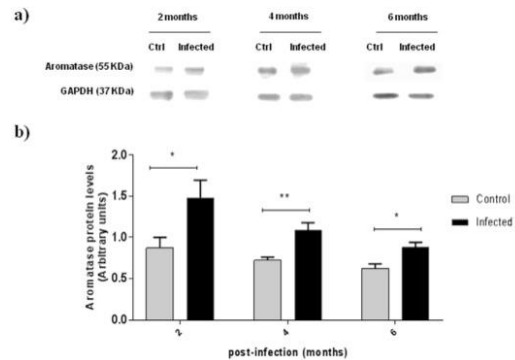


Fig. 6. Western blot analysis of the expression of p450-aromatase in the ovaries of control and infected mice. a. Western blot and b. densitometric analysis of aromatase in the ovaries of control and infected mice at 2, 4, and 6 months post infection. Data represents the mean ± SEM (n = 6 per group). *p < 0.05, **p < 0.01 different compared to the control; arbitrary units.

significant increment of follicular atresia. The dominant factors that determine follicular development or atresia are still not completely understood. Nevertheless, there is a lot of evidence showing that the follicular development, ovulation, and the function of the corpus luteum are processes regulated by hormones as the gonadotropins follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) (Hirshfield, 1991; McGee and Hsueh, 2000). Likewise, ovarian follicular atresia is a hormonally controlled apoptotic process, and occurs at all stages of follicle development. A decrease in the number of gonadotropin receptors of granulosa cells is responsible for the onset of atresia whilst the follicular concentrations of androgens and estrogens modulate the sensitivity of follicle cells to gonadotropins and thus may be of importance in controlling the onset of atresia (Carson et al., 1981). In the ovary, sex steroids are important intra-ovarian regulators of follicle atresia, therefore, ovarian estradiol production is essential for promoting folliculogenesis and inhibiting follicular atresia. Since we have found that the ovary of infected females had an increased number of atretic follicles, it is possible that intra-ovarian androgen concentrations would be elevated conducting to an intraovarian estradiol/androgen imbalance.

Furthermore, we had observed a significant decrease in primordial

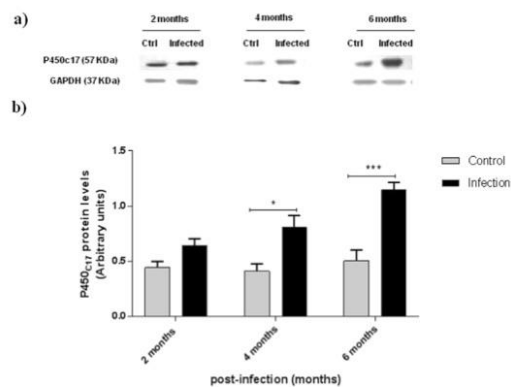


Fig. 7. Western blot analysis of the expression of P450c17 in the ovaries of control and infected mice. a. Western blot and b. densitometric analysis of P450c17 in the ovaries of control and infected mice at two months post infection; 4 months post infection; and 6 months post infection. Data represents the mean \pm SEM (n = 6 per group). *p < 0.05, ***p < 0.01 different compared to the control; arbitrary units.

and primary follicles at 2 months post infection. It is well known that at these stages the follicle development is independent of gonadotropins, and the whole mechanisms that control the start of follicular growth is unknown (Hoyer, 2005). We would expect the same results at 4 months and 6 post-infection months, nevertheless we did not find statistical differences when compared with the control mice. A compensation mechanism could be the cause of these fluctuations, because it has been reported that follicular atresia enables the formation of primordial follicles (Hirshfield, 1991).

Nevertheless, a significant decrement occurred in the corpus luteum number in the three times included in this study. The infected mice had 50% less corpus luteum after two months of infection and the difference was even greater after six months, strongly suggesting that the ovulation was markedly affected by the presence of the parasites in the abdominal cavity. It is well demonstrated that following ovulation, the ruptured follicle will form a corpus luteum, whose function is regulated by the gonadotropins FSH and LH (Kolibianakis et al., 2005). We did not found significant differences in the preovulatory follicles, but the augmented follicular atresia could explain this finding.

On the other hand, our findings demonstrate that chronic infection with *Taenia crassiceps* WFU caused an increase in serum estradiol concentration compared to the control group. Alterations in the cell cycle of mice have been described in parasitic infections as *Plasmodium vinckei petteri* infections that induced an increase in estrous days at the beginning of the infection and a decrease after 20 days (Barthelemy et al., 2004). Increased estradiol concentrations at 4 and 8 post-infection weeks have been found in female mice infected with *T. crassiceps* ORF and in the serum of male mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Ramos Robles et al., 2018). To note, Spratt et al. (2006) and Dossett et al., 2008 have found significant 17β -estradiol increments, as a frequent consequence of major infections.

The morphological changes observed in the ovaries of the infected female suggest that the increment in serum estrogens may not come only from the ovarian follicles. Interestingly, we have found that chronic infection with *Taenia crassiceps* WFU increases the expression of ovarian P450-aromatase. Aromatase expression is regulated by several proinflammatory cytokines as IL6 and IL1 that are increased in several infective diseases and also in mice *T. crassiceps* ORF cysticercosis, suggesting an immunoendocrine interaction during the parasitic disease and a possible mechanism to enable parasite establishment in the host

(Larralde et al., 1995; Aguilar-Rebolledo et al., 2001; Chavarría et al., 2005). To the best of our knowledge, there are not available studies on the expression of P450-aromatase in ovary of cysticerci infected mice.

As stated in Introduction, P450_{C17} is an important ovarian key enzyme essential for androgen biosynthesis, and is a major branch point in steroidogenesis in the adrenal glands and the gonads. For this reason we have evaluated the expression of this enzyme and our data indicate that *Taenia crassiceps* infection increased the expression of ovarian P450_{C17}. We did not find studies describing the relationship between *Tc* infection and P450c17 expression. This enzyme is predominantly expressed in ovarian theca cells; the increased activity of this enzyme has been hypothesized to enhance androgen biosynthesis and secretion (Kaur et al., 2018). This enzyme has been proven to mediate steroid generation to regulate the follicular growth under the control of LH. The increased expression of this enzyme in the ovary of infected female mice could be related to the increment in atretic follicles found in those animals. To this regards, in PCOS, a syndrome where folliculogenesis is also disturbed, P450_{C17} expression augmented in theca cells compared with those of healthy patients (Nelson et al., 1999). Likewise, inflammatory conditions may trigger cascading events leading to increased ovarian androgen production (Li et al., 2018). It has been reported that serum levels of IL-6 were higher in women with PCOS (Younis et al., 2014), and similar alterations were found in mice infected with *T. crassiceps* ORF (Larralde et al., 1995).

An interesting similarity between neurocysticercosis and PCOS was found in a female patient (Sacerdote et al., 2012). Moreover, it has been shown that ovulating women with PCOS, hypersecrete androgens but not estrogens, and present normal folliculogenesis. On the other hand, hypersecretion of androgen and also estrogens have been found in PCOS affected women that do not ovulate. They also presented increased serum LH, and the inversion of the LH/FSH ratio. These patients' also had disordered folliculogenesis, and increased ovarian P450-aromatase activity and progesterone production by cultured PCOS follicles compared to those of healthy women (Franks et al., 2000). Furthermore, it has been reported that normal granulosa cells isolated from individual follicles of ovulatory women secrete estradiol in response to LH when the follicle has reached 9–10 mm in diameter. By contrast, in cells derived from anovulatory women with polycystic ovaries, LH stimulated secretion of estradiol and progesterone in granulosa cells was found in follicles as small as 4 mm (Willis et al., 1998). Furthermore, antral follicles around 6–8 mm in diameter produced levels of estradiol and progesterone, which were more akin to those found in the normal, pre-ovulatory follicle. Interestingly, the granulosa cells from the ovaries of women with anovulatory PCOS had an exaggerated production of estradiol in response to FSH (Mason et al., 1994). Our findings on the alterations in follicle function and the decreased amount of corpora lutea, that suggests alteration in the ovulatory process, closely resembles aspects of anovulatory PCOS.

In most animal species, including mice, the fallopian tube (oviduct) is composed of ciliated (microvilli cells) and secretory cells as well as smooth muscle cells, and it is known that ovarian hormones affect tubal epithelial structure and expression of cilia. Available data indicate that alteration of ovarian steroid levels may induce oviduct malfunction and infertility. Relatively low levels of estrogens, stimulates epithelial cell hypertrophy, secretion and ciliogenesis, while atrophy and deciliation are associated with high levels of serum progesterone (Lyons et al., 2006). We have observed a decrease in the length of oviduct microvilli and increased serum estradiol concentrations in the *T. crassiceps* WFU infected mice. Respect to this finding, Verhage et al. (1979) reported high plasma levels of estradiol during periods of atrophy and deciliation, while the cells height was reduced. Estradiol itself has no effect on ciliated cells; however it regulates indirectly them through the induction of progesterone receptors (Shao et al., 2007). Also it has been observed that micro-organism infections such as *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia* and *Escherichia coli* causes effects on the mucosa of Fallopian tube, which results in loss of oviduct ciliated cells or decrease in the

length of ciliated cells (Lyons et al., 2006), however in these diseases the micro-organisms ascend into the upper genital tract where they causes inflammation. In the case of *T. crassiceps* WFU infection the cysticerci were not found in the tubes but inflammation in the abdomen could be the cause of the ciliated cells alterations. This is the first study that describes a relationship between infection with *Taenia crassiceps* and alterations in the oviduct; however more studies are needed to explain the mechanism by which this damage originates.

In summary, the present study describes for the first time the capacity of *T. crassiceps* to alter the ovarian function and ovarian steroidogenic enzymes in a chronic infection. Our findings suggest that infection with *T. crassiceps* WFU is as an endocrine disruptor that has a negative impact on the female reproductive system that might affect fertility.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

A. Veloz received a PhD fellowship from CONACyT, Mexico. We thank to Ricardo A. Valdez for statistic assistance, and Gabriel Vargas and Marisol Bautista for technical assistance. The study was supported by CINVESTAV del I.P.N., Mexico.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107778>.

References

- Aceves-Ramos, A., De la Torre, P., Hinojosa, L., Ponce, A., García-Villegas, R., Lacleite, J.P., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.021>.
- Aguiar-Rebolledo, F., Cedillo-Rivera, R., Llaguno-Violante, P., Torres-López, J., Muñoz-Hernandez, O., Enciso-Moreno, J., 2001. Interleukin levels in cerebrospinal fluid from children with neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64 (1), 35–40. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.35>.
- Arteaga-Silva, M., Vargas-Villavicencio, J.A., Viguera-Villaseñor, R.M., Rodríguez-Dorantes, M., Morales-Montor, J., 2009. *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice. *Acta Trop.* 109, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.011>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1160-2>.
- Bhatt, M.R., Khatri, Y., Rodgers, R.J., Martin, L.L., 2017. Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450 17A1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 170, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.033>.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Clarke, I.J., Burguer, H.G., 1981. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 24, 105–113. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.1.105>.
- Chavarría, A., Fleury, A., García, E., Márquez, C., Fragoso, G., Sciutto, E., 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin. Immunol.* 116, 217–278. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.04.008>.
- Chun, S.Y., Hsueh, A.J.W., 1998. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J. Reprod. Immunol.* 39, 63–75. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(98\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(98)00013-8).
- Dossett, L.A., Swenson, B.R., Evans, H.L., Bonatti, H., Sawyer, R.G., May, A.K., 2008. Serum estradiol concentration as a predictor of death in critically ill and injured adults. *Surg. Infect.* 9 (1), 41–48. <https://doi.org/10.1089/sur.2007.037.Serum>.
- Fernández Presas, A.M., Valdez, R.A., Willms, K., Romano, M.C., 2008. The key steroidogenic enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU). *Parasitol. Res.* 103, 847–852. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1066-5>.
- Fleury, A., Sciutto, E., de Aluja, A., Carpio, A., 2015. Cysticercosis: a preventable, but embarrassing neglected disease still prevalent in non-developed countries. In: Sing, A. (Ed.), *Zoonoses – Infections Affecting Humans and Animals*. Springer, Dordrecht, pp. 335–354.
- Franks, S., Mason, H., Willis, D., 2000. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 49–52. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00239-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00239-7).
- García, H.H., Gonzalez, A.E., Evans, C.A.W., Gilman, R.H., 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362, 547–556. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14117-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14117-7).
- Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124, 43–101. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7).
- Hotez, P., Whitham, M., 2014. Helminth infections: a new global women's health agenda. *Obstet. Gynecol.* 123, 155–160. <https://doi.org/10.1097/AOG.000000000000025>.
- Hoyer, P.B., 2005. Damage to ovarian development and function. *Cell Tissue Res.* 322, 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1083-y>.
- Jiménez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.01.002>.
- Kaipia, A., Hsueh, A.J., 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 349–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>.
- Kaur, R., Kaur, T., Kaur, A., 2018. Genetic association study from North India to analyze association of CYP19A1 and CYP17A1 with polycystic ovary syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 35, 1123–1129. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1162-0>.
- Kolibanakis, E.M., Papanikolaou, G., Fatemi, H.M., Devroey, P., 2005. Estrogen and folliculogenesis: is one necessary for the other? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 17, 249–253.
- 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. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575–580. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00062-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00062-5).
- Li, Y., Zheng, Q., Sun, D., Cui, X., Chen, S., Bulbul, A., Liu, S., Yan, Q., 2018. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *J. Cell. Physiol.* 234, 7435–7447. <https://doi.org/10.1002/jcp.27501>.
- Lin, Y.C., Rikihisa, Y., Kono, H., Gu, Y., 1990. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniiformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Exp. Parasitol.* 70, 344–352. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90116-T](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90116-T).
- Lyons, R.A., Saridogan, E., Djahanbakhch, O., 2006. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum. Reprod. Update* 12 (4), 363–372. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml012>.
- Mason, H.D., Willis, D.S., Beard, R.W., Winston, R.M., Franks, S., 1994. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and to concentrations of sex steroids in follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1355–1360. <https://doi.org/10.1210/jeem.79.5.7962330>.
- Mathieu, A.P., Auchus, R.J., LeHou, J.G., 2002. Comparison of the hamster and human adrenal P450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) using site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00172-8).
- McGee, E.A., Hsueh, A.J.W., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21 (2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>.
- Mendelson, C.R., Kamat, A., 2007. Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 106 (1–5), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.05.001>.
- Miller, W.L., Tee, M.K., 2015. The post-translational regulation of 17,20 lyase activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2014.09.010>.
- Morales, J., Martínez, J.J., Villalobos, N., Hernández, M., Ramírez, R., Salgado-Estrada, B., Jiménez, H., Figueroa, A., Sánchez, L.M., Lázcano, E., Fleury, A., Aluja, A., Sciutto, E., 2018. Persistent *Taenia solium* cysticercosis in the state of Morelos, Mexico: human and porcine seroprevalence. *J. Parasitol.* 104 (5), 465–472. <https://doi.org/10.1645/18.23>.
- Myers, M., Britt, K.L., Wreford, N.G.M., Ebling, F.J.P., Kerr, J.B., 2004. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 127, 569–580. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00995>.
- Nelson, V.L., Legro, R.S., Strauss, J.F., McAllister, J.M., 1999. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol. Endocrinol.* 13, 946–957. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0311>.
- Patricio-Gómez, J.M., Valdez, R.A., Veloz, A., Aguiar-Vega, L., Zurabian, R., Romano, M.C., 2017. The synthesis of steroids by *Taenia crassiceps* WFU cysticerci and tapeworms is related to the developmental stages of the parasites. *Gen. Comp. Endocrinol.* 259, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.018>.
- Ramos Robles, B., Valdez, R.A., Juárez Hernández, U., Marquina Castillo, B., Mata Espinoza, D., Barrios Payan, J., Hernández Pando, R., Romano, M.C., 2018. Immunoendocrine abnormalities in the male reproductive system during experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 109, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.02.005>.
- Romano, M.C., Vázquez, 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. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00233-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00233-4).
- Romano, M.C., Jiménez, P., Miranda-Brito, C., Vázquez, R.A., 2015. Parasites and steroid hormones: corticosteroid and sex steroid synthesis, their role in the parasite physiology and development. *Front. Neurosci.* 9, 224. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00224>.
- Sacerdote, A.S., Mejía, J.O., Bahtiyar, G., Salamon, O., 2012. Effect of raloxifene on human neurocysticercosis. *Endocr. Rev.* 32, 3–7. <https://doi.org/10.1136/ber.06.2011.4417>.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Díaz, M.L., Valdéz, F., Lomei, C., Govezensky, T., Montoya, R.M., Larralde, C., 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77, 243–246. <https://doi.org/10.1007/BF00930866>.
- Shao, R., Weijdegard, B., Fernández-Rodríguez, J., Egecioglu, E., Zhu, C., Andersson, N., Thurin-Kjellberg, A., Bergh, C., Billig, H., 2007. Ciliated epithelial-specific and regional-specific expression and regulation of the estrogen receptor- β 2 in the fallopian

- tubes of immature rats: a possible mechanism for estrogen-mediated transport process in vivo. *Am. J. Physiol. Metab.* 293, E147–E158. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00101.2007>.
- Simpson, E.R., Clyne, C., Speed, C., Rubin, G., Bulun, S., 2001. Tissue-specific estrogen biosynthesis and metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* 949, 58–67.
- Solano, S., Zepeda, N., Copitin, N., Fernandez, A.M., Tato, P., Molinari, J.L., 2013. A *Taenia crassiceps* metacystode factor enhances ovarian follicle atresia and oocyte degeneration in female mice. *J. Helminthol.* 89, 49–57. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000588>.
- Spratt, D.J., Morton, J.R., Kramer, R.S., Mayo, S.W., Longcope, C., Vary, C.P.H., 2006. Increases in serum estrogen levels during major illness are caused by increased peripheral aromatization. *Am. J. Physiol. Metab.* 291, E631–E638. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00467.2005>.
- Stocco, C., 2008. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73 (5), 473–487. <https://doi.org/10.1016/j.asieco.2008.09.006.EAST>.
- Valdéz, 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0095-6>.
- Verhage, H.G., Bareither, M.L., Jaffe, R.C., Akbar, M., 1979. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am. J. Anat.* 156, 505–521. <https://doi.org/10.1002/aja.1001560405>.
- Webb, C., La Rosa, M., Olson, G., Cabada, M., 2018. Neurocysticercosis in pregnancy. *AJP Rep.* 8, e51–e56. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1639615>.
- Willis, D.S., Watson, H., Mason, H.D., Galea, R., Brincat, M., Franks, S., 1998. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (11), 3984–3991. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5232>.
- Willms, K., Zurabian, R., 2009. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* 335–346. <https://doi.org/10.1017/S003182009991442>.
- Younis, A., Hawkins, K., Mahini, H., Butler, W., Garelnabi, M., 2014. Serum tumor necrosis factor- α , interleukin-6, monocyte chemoattractant protein-1 and paraoxonase-1 profiles in women with endometriosis, pcos, or unexplained infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 1445–1451. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0237-9>.