



INSTITUTO POLÍTECNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



TITULO DEL TRABAJO

“EFECTO DEL AMP_c Y GLUCOCORTICOIDES EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES POR CISTICERCOS DE Taenia crassiceps WFU”

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO FARMACÉUTICO

PRESENTA:

**RODRIGUEZ RAMOS ANGELICA GUADALUPE
SALVADOR CONCHA VIRIDIANA**

ASESORES:

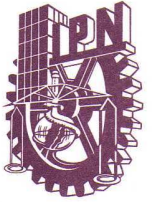
**DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO
BIOL. RICARDO PEREZ VALDEZ
M. C. YOLANDA DE LAS MERCEDES GOMEZ Y GOMEZ**

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2009



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México., D. F., a 31 de octubre de 2008.
Of. No. SA-UPIBI-1363/08

RODRÍGUEZ RAMOS ANGÉLICA GUADALUPE
7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA FARMACÉUTICA
Presente.

Comunico a usted, que como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con esta fecha queda registrado su proyecto terminal en la modalidad de **“PROYECTO DE INVESTIGACION”** denominado **“EFECTO DEL AMPc Y GLUCOCORTICOIDES EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES POR CISTICERCOS DE TAENIA CRASSICEPS WFU”** bajo la dirección externa Dra. Marta Catalina Romano Pardo, Biol. Ricardo Valdez Pérez y la dirección interna M. en C. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la opción curricular de titulación. Asimismo me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el Comité mencionado.

CONDICIONES

1. Permanecer en la misma opción y actividad en el Proyecto Terminal I, II, III.
2. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto Terminal II y Proyecto Terminal III.
3. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas.
4. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura.

ATENTAMENTE .
“LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA”



ING. YESICA MA. DOMÍNGUEZ GALICIA. PROFESIONAL
SUBDIRECTORA ACADÉMICA.

INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGIA
SUBDIRECCION ACADÉMICA

c.c.p. Departamento de Control Escolar.



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México., D. F., a 31 de octubre de 2008.
Of. No. SA-UPIBI-1365/08

SALVADOR CONCHA VIRIDIANA
7° SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA FARMACÉUTICA
Presente.

Comunico a usted, que como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con esta fecha queda registrado su proyecto terminal en la modalidad de **"PROYECTO DE INVESTIGACION"** denominado **" EFECTO DEL AMPc Y GLUCOCORTICOIDES EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES POR CISTICERCOS DE TAENIA CRASSICEPS WFU"** bajo la dirección externa Dra. Marta Catalina Romano Pardo, Biol. Ricardo Valdez Pérez y la dirección interna M. en C. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la opción curricular de titulación. Asimismo me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el Comité mencionado.

CONDICIONES

1. Permanecer en la misma opción y actividad en el Proyecto Terminal I, II, III.
2. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto Terminal II y Proyecto Terminal III.
3. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas.
4. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura.

ATENTAMENTE.
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"




ING. YESICA MA. DOMÍNGUEZ GALICIA
SUBDIRECTORA ACADÉMICA.

INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA
DIRECCIÓN ACADÉMICA

c.c.p. Departamento de Control Escolar.

⁵ Antes de formarte en el vientre,
ya te había elegido;
antes de que nacieras,
ya te había apartado;
Te había nombrado profeta para las
naciones.

⁶ Yo le respondí.
¡Ah señor mi Dios! ¡Soy muy joven,
y no sé hablar!

⁷ Pero el señor me dijo:
No digas: "Soy muy joven ", por que
vas a ir adondequiera que yo te envíe , y vas
a decir todo lo que yo te ordene. ⁸ No le temas
a nadie , que yo estoy contigo para librarte .
Lo afirma el señor.

⁹ Luego extendió el señor la mano y,
tocándome la boca , me dijo:
He puesto en tu boca mis palabras.

¹⁰ Mira hoy te doy autoridad sobre
naciones y reinos
Para arrancar y derribar,
Para destruir y demoler,
Para construir y para plantar.

Jer 1:5-10

RECONOCIMIENTOS

Al departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, laboratorio bajo la dirección de la Doctora Marta C. Romano Pardo.

Agradecemos el apoyo a parte de esta investigación por el donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 69347.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Marta Romano Pardo gracias por su apoyo al darnos la oportunidad de desarrollarnos en el ámbito de la investigación proporcionándonos las bases para poder llevar acabo investigaciones futuras, que servirán no solo a nuestra formación académica sino al desarrollo tecnológico del país. Así como al desarrollo personal de cada una.

Dra. Lorena Hinojosa gracias por su orientación y paciencia, por asesorarnos en la realización de este trabajo, por transmitirnos conocimiento, por sus consejos y enseñanzas para poder mejorar y ampliar nuestros conocimientos.

Al Biólogo Ricardo A. Valdéz gracias por involucrarnos en la investigación, gracias por los consejos y por su dedicación y orientación en la realización de este trabajo.

M.C Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez le agradecemos por la disposición de asesorarnos y ayudarnos a adquirir mas conocimientos en el área de la investigación.

A los compañeros del laboratorio por orientarnos en las técnicas que aprendimos y por darnos su apoyo en todo momento.

DEDICATORIA

A mi familia, a los verdaderos amigos y a la persona más maravillosa (Octavio).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida en el cual comienza una nueva etapa y espero que me siga dando la oportunidad de seguirla viviendo pues tengo muchas cosas por la cual hacerlo. Por todas y cada una de las bendiciones que me ha dado al lo largo de este tiempo pues aun que a veces sientes que el mundo se viene encima siempre hay una luz que te ilumina que te hace ser mejor persona y sobre todo que llega a mejorar tu vida.

A mi mamá que siempre me apoya en todo dándome su fortaleza paciencia y comprensión. Y sobre todo por darme la vida ya que si no todo esto no existiría. Espero tratar de ser la mejor hija del mundo aun que cometa errores sabes que TE AMO sé que siempre contare contigo para lo que sea de verdad mil gracias por estar siempre al pendiente de mi y sobre todo por demostrarle al mundo entero que el ser padre y madre al mismo tiempo es difícil pero no imposible.

Octavio por llegar en el momento indicado a mi vida pues él es la persona con la que quiero compartir mi vida, formar una familia y juntos aprender, y ayudarnos a alcanzar nuestros objetivos. Gracias por todo tu apoyo incondicional por lo momentos maravillosos que pasamos juntos y seguirán pasando pues como ya lo he dicho quiero formar una familia a tu lado. Ahora ya eres parte de mi vida y que bueno es encontrar a la persona ideal se que nos ayudaremos, apoyaremos a alcanzar nuestras metas. TE AMO.

A mi abuelito y a Mario las personas que me hacen falta y son una pieza clave en mi vida pues aun que ya no estén conmigo en persona se que siempre me acompañan con su espíritu, y a todas aquellas personas que nos dejaron pero que siguen entre nosotros cuidándonos y apoyándonos desde el cielo.

A mis verdaderos amigos pues siempre están ahí para apoyarme en todo y luchando junto a mí para llevar a cabo todo lo que me propongo. Gracias no sé que haría sin ustedes pues complementan mi vida y ya saben siempre contarán conmigo para lo que sea.

**LOS SUEÑOS QUE MAS ANHELAS SON LOS QUE MAS TRABAJO CUESTAN Y
CUANDO LOS CONSIGUES TE SIENTES PLENO.....QUERER ES PODER.**

DEDICATORIA

A Daniel y Guadalupe (mis padres)

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios

A ti señor que siempre estas mostrándome el camino y llenando mi vida de bendiciones.

Gracias señor por que tu me elegiste para amarte, gracias por llenar mi vida de alegría y por mostrarme tu amor, señor gracias por ser mi Dios y mi Salvador.

A mis padres

A ustedes padres (Daniel y Guadalupe) que gracias a su apoyo, amor y comprensión termino un ciclo muy importante en mi vida, sin ustedes nada de esto hubiera podido ser realidad, estoy muy orgullosa de que ustedes sean mis padres, son los mejores y no olviden nunca que los amo y que gracias a ustedes soy lo que soy, gracias por estar en todo momento.

Armando

Y a ti amor por compartir tu vida conmigo y estar a mi lado, por ser todo lo que me hacia falta, por cambiar mi vida.

Gracias por tus cuidados, por tu amor, por sorprenderme cada dia, por que

contigo esta estancia en la escuela fue más fácil.

Gracias a ti se que amar es lo mejor que existe... te amo.

A mis hermanos

Gracias hermanos (Jessy y Daniel) por darme ánimo, por sus regaños y cariño los quiero mucho.

A mis amigos

Dicen que los amigos son un regalo de Dios y compruebo por que es así, gracias por compartir un poco de su vida conmigo, por darme animo, por alegrar mis días, gracias por sus consejos y regaños y por sobre todo gracias por ser mis amigos, por su comprensión y cariño (Bety, Carlita, Paty, Miri, Josué, Iván Ángel, Poncho, Angie, Mary, Sandy, Kris, Cuau) son los mejores amigos que he tenido los quiero mucho.

A mi familia

Gracias a mis primas, a mis tíos por su apoyo a mis abuelitos, saben que los quiero mucho y gracias por sus consejos.

EFFECTO DEL AMPc Y GLUCOCORTICOIDES EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES POR CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* WFU

Rodríguez Ramos Angélica*, Salvador Concha Viridiana*

*Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

Palabras clave: *cisticercosis*, *Taenia crassiceps*, AMPc, glucocorticoides.

Introducción: La cisticercosis es una enfermedad causada por la forma larvaria de *Taenia solium* la cual se desarrolla en el músculo del cerdo, y causa diversas enfermedades a los seres humanos. En este trabajo se reportan los efectos que generan la adición de AMPc y Glucocorticoides en la síntesis de hormonas esteroides producidas por este parásito. Sin embargo debido a las dificultades de trabajar con esta clase de parásitos, el estudio se realizó empleando un modelo murino el cual fue *Taenia crassiceps* WFU para evaluar los efectos que se pueden presentar al incubar a los parásitos a diferentes condiciones de AMPc y glucocorticoides a concentraciones establecidas y con precursores tritados [³H] Dehidrohepiandosterona, para evaluar los efectos de los glucocorticoides y [³H] Androstenediona para estudiar los efectos del AMPc, y para identificar los metabolitos producidos por estos parásitos se hizo uso de la técnica de TLC.

Material y métodos: Los parásitos se obtuvieron de un modelo murino parasitado con *Taenia crassiceps* WFU una vez que extraídos los parásitos, se adicionó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía 0.1% de Alúmina Sérica Bovina (BSA), HEPES 25mM y 1% de Antibiótico-Antimicótico. Se ajustó el pH a 7.8 y se mantuvieron a 37° C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa, entonces los cisticercos se cultivaron con el medio adicionando las diferentes soluciones de hormonas, se dejaron incubar por un periodo determinado y posterior a ello se extrajo el medio que contenía a los parásitos con la finalidad de obtener los esteroides del medio de cultivo. Las muestras se suspendieron en Etanol absoluto para la aplicación en la placa de cromatografía. Se preparó la placa de sílica del gel. Se aplicaron los estándares y después las muestras problema. Las placas se corrieron en el sistema de solventes elegido. Los resultados se expresaron como porcentaje de transformación de precursor para cada metabolito identificado.

Resultados y discusión: Para el efecto que se observó al adicionar las distintas concentraciones de AMPc a los parásitos se tiene que a mayor concentración de esta molécula presento una inhibición en la transformación de Testosterona por lo tanto se puede decir que esta molécula tiene un efecto sobre la síntesis de hormonas esteroides y la evaluación del

efecto de glucocorticoides en la síntesis de hormonas esteroides por *Taenia crassiceps* WFU, se basó en la utilización de dos modelos murinos de 4 meses de inoculación con dichos parásitos, y uno de 7 meses de parasitado. Los resultados obtenidos en la figura 2 muestran la transformación de hormonas esteroides entre las que destacaron: androstenediol (5-adiol) en un alto porcentaje y estradiol (E₂) con un porcentaje de transformación considerable a 24 horas con el marcador radiactivo.

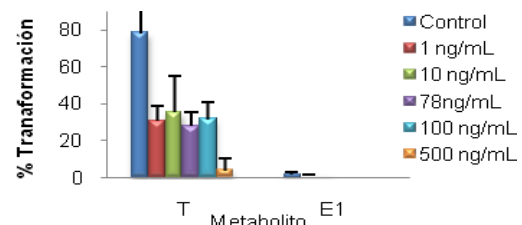


Figura 1.-Metabolismo de 3H-P4 por cisticercos de *T.c.* WFU (4 meses), incubados con AMPc a diferentes concentraciones por 3 horas Diclorometano-Acetato de Etilo (8:2 v/v) n=4

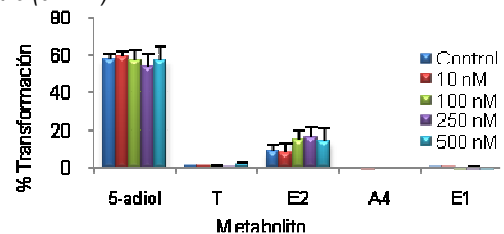


Figura 2.-Metabolismo de 3H-DHEA por cisticercos de *T.c.* WFU (4 meses), tratados por 5 días con corticosterona, e incubados por 24 horas, Benceno: Metanol (9:1 v/v) n=4

Conclusiones La transformación de las hormonas es un proceso es dinámico ya que mientras una pareciera inhibirse, otra en cambio se sintetiza.

Agradecimientos: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Referencias

- 1.-Tresguerres J. A. F, 1999, Mecanismo de acción Hormonal 823-843 pág. y eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenaladrenal 978-990 pág. **Fisiología Humana**, 2a Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid España.

INDICE GENERAL

1 INTRODUCCION

| | |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 Cisticercos..... | 1 |
| 1.1.1 Clase Cestóda..... | 1 |
| 1.1.2 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> | 2 |
| 1.2 Cisticercosis | 4 |
| 1.3 Neurocisticercosis..... | 6 |
| 1.3.1 Tratamiento médico..... | 7 |
| 1.4 Sistema endócrino..... | 8 |
| 1.5 Hormonas y su clasificación..... | 8 |
| 1.5.1 Derivadas de aminoácidos..... | 9 |
| 1.5.2 Peptídicas..... | 9 |
| 1.5.3 Esteroides adrenales..... | 9 |
| 1.5.4 Esteroides sexuales:..... | 10 |
| 1.5.5 Lipídicas..... | 10 |
| 1.5.6 Otras..... | 10 |
| 1.5.7 Hormonas esteroideas..... | 10 |
| 1.6 Metabolismo del colesterol..... | 11 |
| 1.7 AMPc (Adenosin Monofosfato cíclico)..... | 13 |
| 1.7.1 Receptores celulares..... | 13 |
| 1.7.2 Segundo Mensajero..... | 13 |
| 1.7.3 Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc)..... | 14 |
| 1.7.4 Mecanismo de acción del Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc)..... | 14 |
| 1.8 Glucocorticoides..... | 16 |
| 1.8.1 Mecanismo de acción de los glucocorticoides..... | 16 |
| 1.8.2 Acciones de los glucocorticoides..... | 17 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1.8.2.1 Metabolismo..... | 17 |
| 1.8.2.2 Sistema inmunitario..... | 18 |
| 1.8.2.3 Otros órganos..... | 18 |
| 1.8.2.4 Diferenciación y Desarrollo..... | 19 |
| 1.8.2.5 Sistema Nervioso Central..... | 19 |
| 1.8.2.6 Efecto sobre otras hormonas..... | 19 |
| 1.9 Modelo murino (<i>Taenia crassiceps</i>)..... | 20 |
| 1.9.1 Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> | 20 |
| 2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN | |
| 3 OBJETIVOS | |
| 3.1 Generales..... | 23 |
| 3.2 Específicos..... | 23 |
| 4 DESARROLLO EXPERIMENTAL. | |
| 4.1 Cultivo de parásitos..... | 25 |
| 4.2 Metabolismo y producción de hormonas esteroides sexuales..... | 25 |
| 4.2.1 AMPc..... | 25 |
| 4.2.2 Efecto Glucocorticoides..... | 26 |
| 4.3 Extracción de hormonas esteroides..... | 26 |
| 4.4 Cromatografía en capa fina..... | 27 |
| 5 RESULTADOS | |
| 5.1 Resultados de AMPc..... | 28 |
| 5.2 Resultados del efecto de corticosterona..... | 32 |
| 5.2.1 Discusión..... | 37 |
| 6 CONCLUSIONES | |
| 7 BIBLIOGRAFÍA | |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.- Morfología de <i>Taenia solium</i> , causante de la cisticercosis y neurocisticercosis; este parásito es muy similar al modelo empleado en el laboratorio, <i>Taenia crassiceps</i> WFU www.portalsaofrancisco.com.br | 2 |
| Figura 2.- Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> (totalinternet.blogspot.com)..... | 3 |
| Figura 3.- Mecanismo de acción del AMPc en las células esteroidogénicas..... | 12 |
| Figura 4.- Estructura Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc) | 14 |
| Figura 5.- Síntesis y degradación de AMPc (Tresguerres y col., 1999)..... | 15 |
| Figura 6.- Fotografía de <i>Taenia crassiceps</i> WFU, en medio de cultivo DMEM, tomada en el CINVESTAV, departamento de fisiología biofísica y neurociencias..... | 20 |
| Figura 7.- Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> | 21 |
| Figura 8.- Fotografías tomadas a los parásitos de <i>Taenia crassiceps</i> WFU en condiciones óptimas de crecimiento..... | 26 |
| Figura 9.- Parásitos con medio de cultivo adecuado, en los multipozos..... | 27 |
| Figura 10.- Ruta metabólica de los esteroide seguida para la parte experimental de AMPc..... | 28 |

Figura 11.- Porcentaje de transformación a ^3H -Testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 3 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con ^3H -A4. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4.....29

Figura 12.- Porcentaje de transformación a ^3H -Estrona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 3 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con ^3H -A4. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4.....29

Figura 13.- Porcentaje de transformación a ^3H -Testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 3 o 6 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con ^3H -A4. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4.....30

Figura 14.- Porcentaje de transformación a ^3H -Estrona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 6 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con ^3H -A4. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4.....30

Figura 15.- Porcentaje de transformación a ^3H -Testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 24 y 48 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con ^3H -A4. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4.....31

Figura 16.- Porcentaje de transformación a ^3H -Estrona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 24 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con ^3H -A4. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4.....31

Figura 17.- Porcentaje de transformación a ^3H -Androstendiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ^3H -DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4. Se realizaron dos repeticiones del experimento.....32

Figura 18.- Porcentaje de transformación a 3H-testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno:Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron dos repeticiones del experimento.....33

Figura 19.- Porcentaje de transformación a 3H-Estradiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno: Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron dos repeticiones del experimento.....33

Figura 20.- Porcentaje de transformación a 3H-Androstendiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno:Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron tres repeticiones del experimento.....34

Figura 21.- Porcentaje de transformación a 3H-Testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno:Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron tres repeticiones del experimento.....35

Figura 22.- Porcentaje de transformación a 3H-Estradiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno: Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron tres repeticiones del experimento.....36

Figura 23.-Ruta metabólica de los esteroides.....39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Concentraciones utilizadas en los experimentos de efecto AMPc a 4 y 7 meses de parásitos de *T. crassiceps* WFU.....25

Tabla 2.- Concentraciones utilizadas en los experimentos de efecto de glucocorticoides (corticosterona) a 4 y 7 meses de parásitos con *T. crassiceps* WFU.....26

Tabla 3.- Porcentaje de transformación a 3H-Estronal por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno:Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron dos repeticiones del experimento.....34

Tabla 4.- Porcentaje de transformación a 3H-Estrona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno:Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron tres repeticiones del experimento.....36



1 INTRODUCCION

1.1 Cisticercos

- Los cisticercos son parte del phylum Platyhelminthes, que son gusanos aplanados. Los organismos que se clasifican dentro de este phylum son de vida libre, parasitaria, o marinos.
- Los platelmintos de vida libre están cubiertos por cilios, cuya función es darles movilidad, además son carnívoros y carroñeros.
- Las tenias carecen de aparato digestivo.
- Los platelmintos son hermafroditas. La transferencia de espermatozoides es reciproca, la fecundación es interna, y en la mayoría de las especies su desarrollo es directo.

Dicho phylum consta de tres clases: Turbellaria, que contiene los platelmintos de vida libre; la clase Trematoda, las duelas hepáticas; y la clase Cestoda (**Sarti, 1997**), las taenias que son de interés en este estudio.

1.1.1 Clase Cestoda

Los organismos adultos de la clase Cestoda son diferentes a los turbelarios y a las duelas. El extremo anterior consta de un escólex en forma de perilla, el cual tiene ventosas y en algunos casos ganchos que anclan a los tejidos del animal huésped. Hay una estrecha región que conecta al escólex con el estróbilo, mismo que integra la mayor parte del cuerpo en la tenia. El estróbilo consta de partes aplanadas que se denominan proglótidos, los cuales están dispuestos en una serie lineal. Las tenias carecen por completo de aparato digestivo, ya que absorben el alimento digerido por el huésped a través del tegumento de su cuerpo que es parecido al de los trematodos pero esta cubierto por proyecciones parecidas a microvellosidades intestinales (**Whitfield, 1982**).

En condiciones naturales, la tenia de *Taenia solium* o solitaria habita en el intestino delgado del ser humano. Su nombre común alude a que en la mayor parte de los casos se encuentra un solo gusano en cada portador; sin embargo, no es raro encontrar más de



una solitaria en el mismo paciente. 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.

El conjunto de proglótidos unidos entre sí en forma de cadena se denomina estróbilo, y puede alcanzar varios metros de largo. 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), por lo que se dice que se encuentran grávidos. En medio de ambos extremos se localizan segmentos con un grado variable de diferenciación, incluyendo proglótidos maduros, diferenciados sexualmente, y que no contienen huevecillos. 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. La primera expulsión de proglótidos de la *Taenia solium* generalmente ocurre de dos a tres meses después de la infección **(Marshall y Williams, 1985)**.

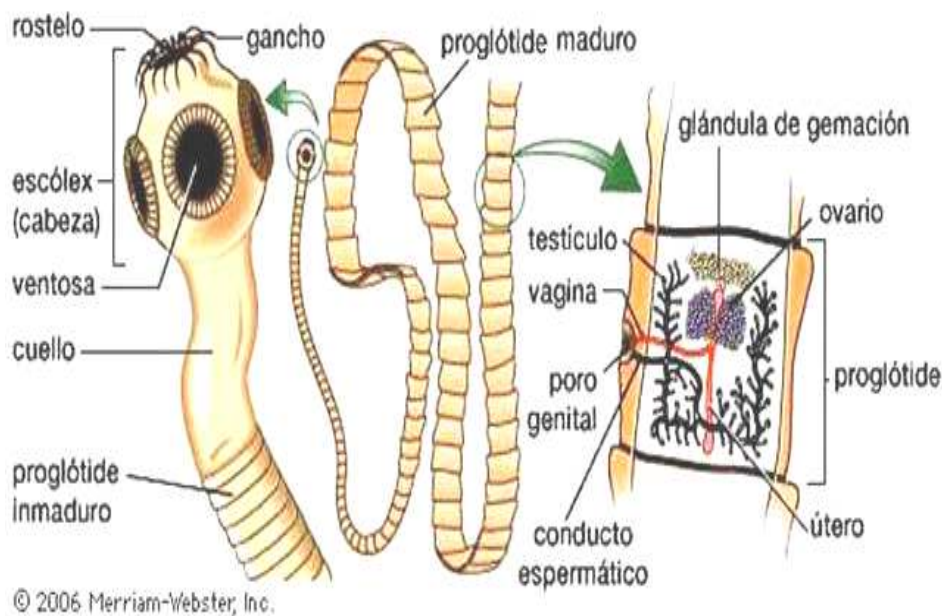


Figura 1.- Morfología de *Taenia solium*, causante de la cisticercosis y neurocisticercosis; este parásito es muy similar al modelo empleado en el laboratorio, *Taenia crassiceps* WFU www.portalsaofrancisco.com.br



1.1.2 Ciclo de vida de *Taenia solium*

La tenia de *Taenia solium* habita en el intestino delgado del hombre, en el cual vive anclado a la pared intestinal con el escólex. En el ciclo de vida de la *Taenia solium* el cerdo participa activamente como huésped intermediario natural; por sus hábitos coprófagos, ingiere proglótidos que contienen decenas de miles de huevos; así, debido a la acción de enzimas y sales biliares del tracto digestivo, rompe el embrióforo y eclosiona la oncosfera. Los embriones activados se fijan momentáneamente a la pared intestinal por medio de sus tres pares de ganchos que liberan enzimas hidrolíticas que destruyen el tejido y atraviesan la barrera intestinal, llegan al torrente circulatorio para localizarse en cualquier parte del animal. Ya que son estructuras microscópicas continúan su desarrollo hasta transformarse en cisticercos en un tiempo promedio de tres a cuatro meses, dando como resultado la cisticercosis porcina.

El ciclo biológico se completa cuando el humano consume carne de cerdo poco cocida o cruda parasitada con cisticercos vivos; al llegar por vía oral, el cisticerco evagina por la acción enzimática y biliar y, mediante su escólex se ancla en el intestino delgado para continuar su desarrollo hasta alcanzar la forma adulta o de solitaria, en un tiempo de cuatro meses.

En más de una ocasión el ser humano actúa como huésped intermediario accidental, al ingerir alimentos, frutas o agua contaminada con huevos infectantes provenientes de un individuo con teniasis; este último inclusive puede autoinfectarse mediante la vía ano-mano-boca; se menciona también la posibilidad de infección por peristaltismo inverso, el mecanismo de cómo los huevos infectantes se transforman en cisticercos .

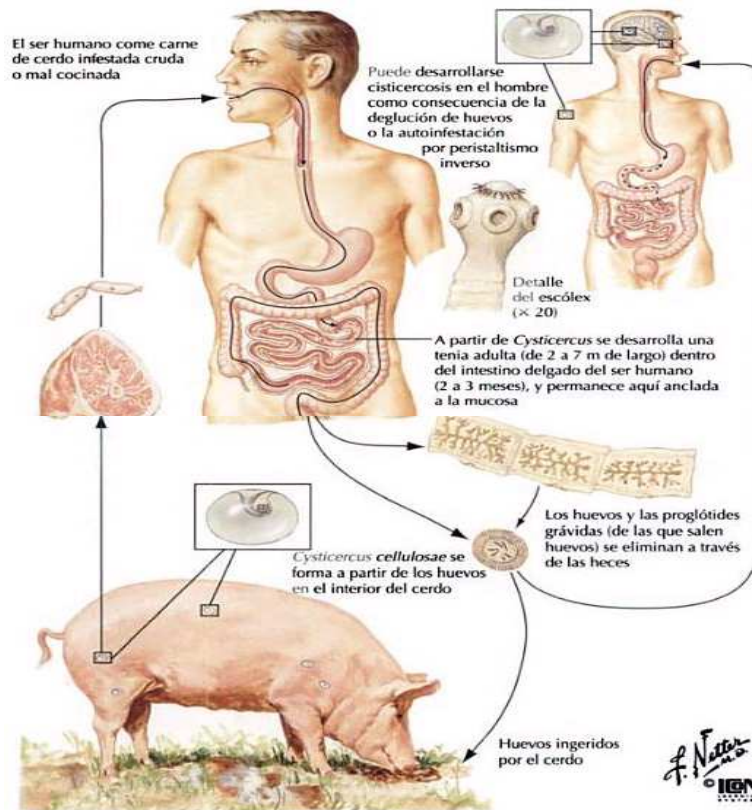


Figura 2.- Ciclo de vida de *Taenia solium* (totalinternet.blogspot.com)

Entre las enfermedades más comunes que causa este parásito se encuentran la cisticercosis y neurocisticercosis, que a continuación se describen.

1.2 Cisticercosis

La cisticercosis es la enfermedad parasitaria producida por la forma larvaria del género *Taenia*, los parásitos habitan en los tejidos del hombre, causando daño. En la cisticercosis un mismo parásito infecta a dos huéspedes y ocasiona dos enfermedades, una en el estado larvario llamada cisticercosis, y otra en la etapa adulta llamada teniasis (Romero, 1994).

Los cisticercos se pueden encontrar en el tejido conjuntivo subcutáneo, donde se manifiestan como pequeñas tumoraciones, no adheridas a planos superficiales. También se localizan en el músculo estriado, los pulmones, el epiplón, la tiroides, el corazón, el hígado u otros órganos o vísceras donde usualmente pasan inadvertidos, en el cerebro y



el globo ocular, especialmente en el humor vítreo y bajo la retina produciendo la disminución de la agudeza visual o ceguera.

El daño que producen los cisticercos en los tejidos, depende del número de parásitos y del lugar en donde se localicen.

La estructura del cisticerco tiene una cubierta o envoltura a manera de un saco blanco nacarado u opalescente, su interior está lleno de líquido transparente, normalmente contiene un escólex (que consiste en ventosas, y en algunas especies de anillos anteriores con espinas controladas por músculos). Aunque hay parásitos que no lo poseen, ya que el escólex de *Cisticercus celuloaseae* tiene cuatro ventosas con una doble corona de ganchos; en *Cisticercus racemosus*, es irregular y rugoso, con lubolaciones y es más grande, tiene líquido en su interior pero no contiene escólex. Cabe señalar que existe una diferencia en su comportamiento, ya que el *Cisticercus racemosus* tiene más afinidad por el sistema nervioso central que el *Cisticercus celuloaseae*.

El humano es el único huésped que puede alojar a los adultos de *Taenia solium*, de manera que es la única fuente de infección de la cisticercosis. El parásito lo adquiere por la ingesta de carne de cerdo con cisticercos.

Cuando el humano o cerdo ingieren huevos de *Taenia solium*, la oncosfera del parásito que sale del huevo, segrega enzimas proteolíticas, con las que el parásito se ayuda para penetrar a través de la mucosa intestinal y otros órganos, hasta llegar a la circulación general.

La infestación por *Taenia solium* en el ser humano puede ocurrir de dos maneras:

- Por ingestión de huevos del parásito emitidos con las heces de personas infestadas (vía fecal-oral). En la luz intestinal las proglótides liberadas tienen la facultad de moverse y arrastrarse por sí solas hasta el ano, en el cual causan prurito en el área perianal. De tal modo que, al rascarse el enfermo recoge los huevos en sus dedos, ropa, sábanas, etc. y los esparce, siendo ingeridos por la misma persona o por otra que tenga contacto directo o indirecto con ella. También



puede ser a través de la manipulación de elementos contaminados, incluyendo el agua o alimentos.

- Por autoinfestación a partir de la ruptura de los segmentos o proglótidos grávidos de los adultos alojados en el intestino del hospedador, con lo que se liberarían los huevos del parásito al lumen intestinal, que llegarían a las porciones anteriores del tracto digestivo por mecanismos antiperistálticos.

En ambos casos, el embrión liberado del huevo penetra la pared del intestino y es transportado por los vasos sanguíneos a cualquier lugar del cuerpo, donde se desarrollan los quistes.

El hombre es el huésped definitivo del parásito adulto de *Taenia solium*, se aloja en el intestino delgado y puede llegar a medir varios metros de largo. El paciente con la tenia puede permanecer asintomático y expulsar proglótidos, las cuales contienen huevos que son expulsados con las heces. Los huéspedes intermediarios son el cerdo y ocasionalmente el humano.

1.3 Neurocisticercosis

La cisticercosis ocurre cuando el hombre se convierte en huésped intermediario de *Tenia solium*, y una vez en el interior pueden generar la neurocisticercosis que es la enfermedad parasitaria más frecuente del Sistema Nervioso Central.

La enfermedad es asintomática cuando el número de parásitos es escaso, pero suele ser fatal cuando, independientemente de su número, se alojan en el sistema ventricular del encéfalo y bloquean la circulación del líquido cefalorraquídeo, o cuando se desarrollan en la región subaracnoidea basal, y generan una reacción inflamatoria que secuestra vasos y nervios. La sintomatología neurológica también se debe al gran tamaño que suelen alcanzar los cisticercos en algunas regiones del cerebro.

En los pacientes con cisticercosis en el sistema nervioso central se ha observado que solo el 2.5 por ciento tiene parásitos en otras partes del organismo. En el sistema nervioso central, los cisticercos celulosos generalmente se localizan en la sustancia gris, y en



menor frecuencia en la sustancia blanca o en los ventrículos, y los cisticercos racemosos se encuentran en las cisternas de la base del cerebro o dentro de los ventrículos.

Uno de los factores más importantes que determinan la aparición de los síntomas de la neurocisticercosis es la muerte de los parásitos. Cuando el parásito está vivo no hay reacción inflamatoria ni suele haber manifestaciones clínicas, pero cuando el parásito muere aparece la reacción inflamatoria de tipo crónico, de tipo caseoso que inicia el proceso de calcificación, en este lapso casi siempre hay sintomatología. Al terminar la calcificación desaparece la sintomatología (**Tratado De Medicina Interna, 1993**).

Entre los síntomas que se manifiestan en la neurocisticercosis son hipertensión intracraneal, cefalea (40 %), edema de la papila, alteraciones de la visión y vómitos. Con gran frecuencia hay sintomatología de pares craneales, convulsiones (50-60% de los casos). Los cuadros de hipertensión intracraneal se originan cuando un parásito libre ocluye los orificios oculares. Los cisticercos celulosos producen infecciones asintomáticas con más frecuencia que los racemosos. Al morir el cisticerco también produce periarteritis de los vasos medianos del encéfalo y meningitis basal, por lo que se usan corticoides por tiempo prolongado para disminuir la reacción inflamatoria.

Es bien sabido que la neurocisticercosis es una enfermedad de distribución universal, endémica en países de bajo nivel socioeconómico, en los que el cerdo es una fuente importante de alimento. Por ello, se ha convertido en un grave problema de salud pública de los países en vías de desarrollo, donde las condiciones sanitarias son deficientes. Se conocen zonas endémicas en Centroamérica, Sudamérica, Europa del Este y Asia. Existen algunos fármacos para eliminar a estos parásitos que producen reacciones inflamatorias que pueden causar la muerte del huésped.

1.3.1 Tratamiento médico.

Los fármacos cestícidias más usados son praziquantel y albendazol. Por ejemplo: la dosis de praziquantel usada en el tratamiento de la cisticercosis es de 50 mg/kg de peso por día, durante 15 días; simultáneamente se administran corticoides en dosis inmunosupresoras y se prolonga su administración durante uno o dos meses, con el fin de



evitar posible exacerbación de la sintomatología por la eventual reacción inflamatoria después de la muerte de los cisticercos.

El albendazol se administra en dosis de 30 mg/kg de peso, durante 4 semanas, junto con esteroides (**Tratado De Medicina Interna, 1993**).

En varios estudios comparativos se ha probado un mejor efecto del albendazol, por su mayor porcentaje de destrucción de quistes parenquimatosos (75-90 %, frente al 60-70 % del praziquantel) y por su capacidad de destruir quistes. Existen diversos tratamientos con corticoides, como los que utilizan dexametasona en dosis altas (4.5 a 12 mg/día), prednisona 1mg/kg/día y en ocasiones manitol. En los últimos años se han realizado diversos experimentos combinando los fármacos para el tratamiento de esta enfermedad. Estos fármacos tienen actividad cestidica como es el caso de la nitazoxanida en combinación con el albendazol, los cuales tienen como metabolitos activos al sulfóxido de albendazol y la tizoxanida. En estos estudios se mostró que la combinación de estos fármacos resulta más efectiva para la eliminación de los parásitos, y con ello se propone una alternativa para aquellos pacientes que no tiene una respuesta favorable al tratamiento con albendazol.

Trabajos previos del laboratorio mostraron que los cisticercos de *Taenia solium* y *crassiceps* son capaces de transformar esteroides (**Gomez y col., 2000; Romano y col., 2003**), por lo que a continuación se hace referencia al sistema endocrino, a la clasificación de las hormonas y su regulación.

1.4 Sistema endócrino

El sistema endocrino se encarga de las secreciones internas del cuerpo (hormonas). Las hormonas son sustancias químicas producidas en determinados órganos endocrinos. Estos órganos también se denominan glándulas sin conducto o glándulas endocrinas, debido a que sus secreciones se liberan directamente en el torrente sanguíneo. Las glándulas exocrinas liberan sus secreciones sobre la superficie interna o externa de los tejidos cutáneos, en la mucosa del estómago o el revestimiento de los conductos pancreáticos.



Algunas de las funciones de las hormonas son regular el crecimiento, el desarrollo y las funciones de muchos tejidos, y coordinan los procesos metabólicos del organismo. También intervienen en la maduración, la reproducción, el comportamiento y el mantenimiento de la homeostasis (**Tresguerres y col., 2005**).

1.5 Hormonas y su clasificación.

Las hormonas son mensajeros químicos secretados por células especializadas, localizadas en las glándulas exocrinas y endocrinas, o también por células epiteliales e intersticiales, con el fin de afectar la función de otras células. El mensajero es una señal química que circula por la sangre y permite la comunicación espacial y temporal entre células diferentes, o del mismo órgano. Las hormonas tienen la característica de actuar sobre las células diana, que presentan receptores específicos para las hormonas (**Katzung, 2002**).

Las hormonas se clasifican de acuerdo a su naturaleza química en:

1.5.1 Derivadas de aminoácidos.

- Melatonina.
- Hormonas tiroideas: tetrayodotironina (T_4) y triyodotironina (T_3).

1.5.2 Peptídicas.

Hormonas hipotalámicas:

- Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de tirotrona (TRH), hormona liberadora de prolactina (PRH), hormona liberadora de melatonina (MRH), hormona inhibidora de prolactina (PIH), somatostatina y hormona liberadora de corticotropina (CRH).

Hormonas adhipofisarias:



- Hormona adrenocorticotropica (ACTH), hormona somatotropa o de crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina (TSH) y prolactina.

Hormonas neurohipofisarias:

- Oxitocina y hormona antidiurética o vasopresina (ADH).

1.5.3 Esteroides adrenales

- Glucocorticoides: cortisol, corticosterona y cortisona.
- Mineralocorticoides: aldosterona y corticosterona.

1.5.4 Esteroides sexuales:

- Andrógenos: dihidroepiandrosterona, androsterona, androstenediona, androstendiol, testosterona y dihidrotestosterona.
- Estrógenos y Progestágenos : estradiol, estrona y progesterona.

1.5.5 Lipídicas.

- Leucotrienos.
- Tromboxanos
- Prostaglandinas: prostanglandina E1, prostanglandina E2 o dinoprostona, prostanglandina I2 o prostaciclina.

1.5.6 Otras.

- Hormona de Allen Doysi, Hormona de Aschheim-Zondek, Hormona cromafín, Hormona placentaria = factor lactógeno placentario, Hormona de Swingle y Pfiffner



1.5.7 Hormonas esteroideas

El precursor de las hormonas esteroides es la molécula del colesterol, que sufre modificaciones en la cadena lateral, hidroxilación en distintos puntos y aromatización de los anillos, lo que resulta en diversas hormonas con actividad biológica (**Tresguerres y col, 2005**).

Las principales funciones de las hormonas esteroides son:

- Crecimiento y desarrollo: Controlan el crecimiento y desarrollo, a través de hormonas peptídicas, esteroideas y tiroideas.
- Reproducción: Regulan la gametogénesis y controlan el desarrollo dimórfico anatómico, funcional y la conducta en ambos sexos.
- Producción, utilización y almacenamiento de energía: son mediadores primordiales del movimiento de sustrato y de la conversión de los metabolitos procedentes de la digestión en energía o en productos energéticos almacenados, y mantienen los niveles plasmáticos de la glucosa para la función del sistema nervioso central, y proporcionan sustrato adicional a otros tejidos.
- Mantenimiento del medio interno (homeostasis): Intervienen en la regulación y estabilización de los líquidos corporales y su contenido electrolítico, de la presión sanguínea y frecuencia cardíaca, del equilibrio ácido base, de la temperatura corporal, y de la masa del hueso, músculo y grasa.

1.6 Metabolismo del colesterol

El colesterol se obtiene a partir de tres fuentes principales:

- El colesterol que circula en la sangre en forma de lipoproteínas.
- El colesterol que se sintetiza de novo en las glándulas reproductoras (testículo y ovario).
- El colesterol que se libera de los ésteres de colesterol almacenados en las gotas lipídicas.



El colesterol es transportado al interior de la mitocondria mediante una proteína transportadora de esteroides activada por el adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Ahí comienza la biosíntesis esteroidea que tiene como elemento limitante la producción de pregnenolona catalizada por la enzima que da ruptura a la cadena lateral del colesterol (CYP11A1), y que tiene como cofactor a la adrenodoxina y las flavoproteínas.

El colesterol es transportado desde la membrana externa mitocondrial a la interna atravesando el espacio acuoso intermembrana. Las proteínas mediadoras de este paso son: la SAP (péptido activador de la esteroidogénesis), el receptor periférico de las benzodiazepinas y una proteína mitocondrial denominada Star (steroidogenic acute regulatory protein).

Estudios recientes apuntan a que esta proteína Star juega un papel importante en la producción de la forma aguda de los esteroides.

En la producción de esteroides están involucradas 4 enzimas clave que se encuentran en las crestas mitocondriales o en el retículo endoplásmico, y son la P450 desramificante (CYP11A1), la 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3-beta-HSD), la citocromo P450 17-alfa-hidroxilasa (CYP17) y la aromatasa (CYP19). Estas enzimas reguladoras catalizan la conversión de colesterol en pregnenolona, de pregnenolona en progesterona, de progesterona en andrógenos y finalmente de andrógenos en estrógenos.

El primer paso en la esteroidogénesis es la conversión del colesterol a pregnenolona catalizado por la enzima CYP11A1, que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. En el retículo endoplásmico la pregnenolona puede sufrir dos conversiones: La primera es el paso a progesterona, reacción en la que interviene la enzima 3- β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa- Δ^5 - Δ^4 -isomerasa (3- β -HSD), esta enzima; Ambas la pregnenolona y la progesterona, pueden ser hidroxiladas en el carbono 17, formándose 17-OH-pregnenolona y 17-OH-progesterona respectivamente, la 17- α -hidroxilasa-17,20-liasa (CYP17) es la enzima encargada de realizar esta conversión (**Tresguerres y col, 2005**).

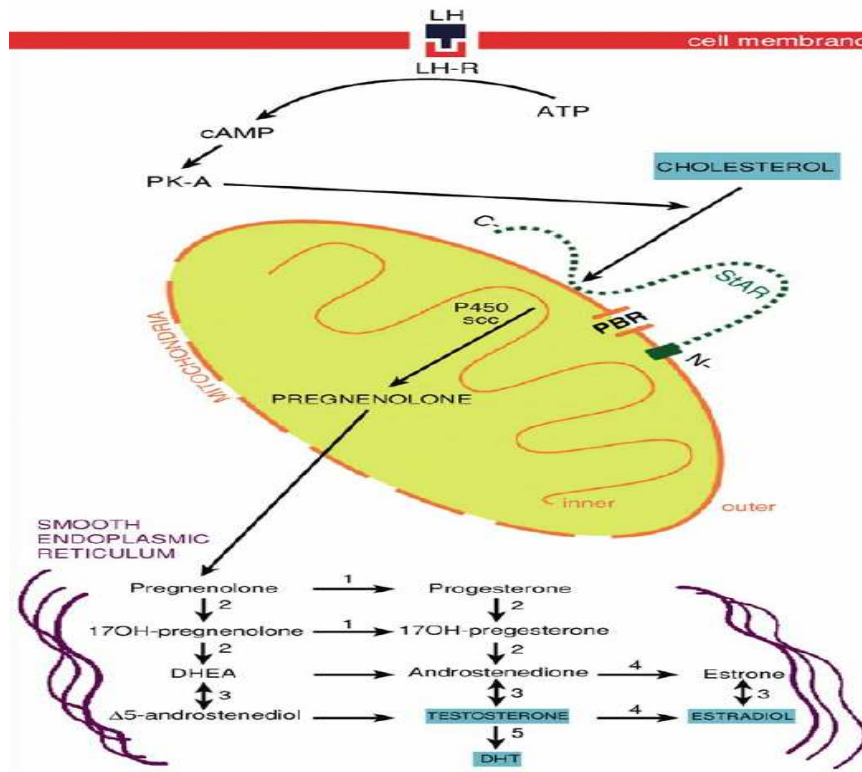


Figura 3.- Mecanismo de acción del AMPc en las células esteroidogénicas.

1.7 Adenosin Monofosfato cíclico

1.7.1 Receptores celulares

Los receptores celulares son componentes de la célula y son capaces de identificar sustancias, sean neurotransmisores u hormonas. Hay receptores extracelulares que se encuentran en la superficie celular ya que su ligando no es capaz de traspasar la bicapa lipídica. Existen otros receptores intracelulares que se encuentra en el citosol y sus ligandos son capaces de traspasar la bicapa lipídica.

Tanto los receptores extracelulares como intracelulares desencadenan una cascada de reacciones que resulta en la liberación de hormonas o en la transcripción génica. La señalización celular comprende una cascada de procesos químicos conectados entre sí que participan en la comunicación entre todas las células. Esta señalización celular se da por la participación de ligandos específicos que van a estimular o inhibir receptores específicos. Las principales moléculas que participan en estos procesos son: las



hormonas esteroideas, neurotransmisores, proteína G, AMPc, guanosin monofosfato cíclico (GMPc), fosfolípidos, calcio (Ca^{2+}), citoquinas, integrinas, proteínas del citoesqueleto, proteínas con diversas actividades enzimáticas, que posteriormente en conjunto con otras moléculas van a permitir la transcripción de genes y la formación de nuevas proteínas (**Katzung, 2002**).

1.7.2 Segundo Mensajero

Se designa a toda nueva molécula generada en respuesta a la ocupación de un receptor de membrana que tiene la capacidad de reproducir los efectos biológicos del ligando (primer mensajero). Estas moléculas se caracterizan por poseer un bajo peso molecular y por su facilidad para variar en un rango de concentraciones amplio, dependiendo de la presencia o no de señales que estimulen su presencia. Los segundos mensajeros más comunes son: el 3',5'-AMP cíclico (AMPc), 3',5'-GMP cíclico (GMPc), 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), el Ca^{2+} y diversos fosfolípidos denominados fosfoinosítidos, presentes en las membranas celulares (**Katzung, 2002**).

1.7.3 Adenosin monofosfato cíclico

El AMPc es un nucleótido cuyo comportamiento es el de un segundo mensajero el cual desencadena una serie de eventos biológicos. Es un derivado del adenosin trifosfato (ATP) y este sufre la conversión a AMPc por la acción de la enzima adenilato ciclasa que se localiza en la membrana interna de la célula. El sistema enzimático responsable de la formación de este metabolito regulador, la adenilato ciclasa, las enzimas responsables de su inactivación (fosfodiesterasas de AMPc), las proteínas transductoras acopladas (proteínas G) y las enzimas reguladoras por el AMPc (proteínas quinasas dependientes de AMPc), así como el control que estas proteínas ejercen diversas acciones a distintos niveles celulares.

La activación de la adenilato ciclasa produce un incremento del contenido citosólico de AMPc, este segundo mensajero tiene una vida media muy corta, degradándose por la acción de las fosfodiesterasas en el citosol, cuya actividad es estimulada por calcio-calmodulina (**Tresguerres y col, 2005**).

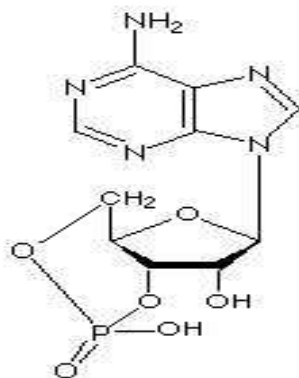


Figura 4.- Estructura Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc)

1.7.4 Mecanismo de acción del Adenosin Monofosfato cíclico

Diversas reacciones químicas inician en la celular cuando un ligando como la LH interacciona con su receptor de membrana el cual se encuentra en las células esteroidogénicas. Una vez que se ha llevado a cabo esta interacción se activan las proteínas G que están ligadas al adenilato ciclasa, que es la responsable de la conversión de ATP en AMPc. Este nucleótido es el encargado del transporte del colesterol a la membrana externa de la mitocondria para que pueda ser transformado a testosterona.

Cuando el AMPc se encuentra en concentraciones diferentes a las ideales se activan dos enzimas las cuales son las responsables de mantener los niveles de este nucleótido en equilibrio, estas enzimas son las fosfodiesterasas las cuales se encargan de degradarlo a 5'AMP y la proteína kinasa la cual se encarga de estimular la degradación del nucleótido o inhibir su síntesis (Tresguerres y col, 2005; Katzung, 2002).

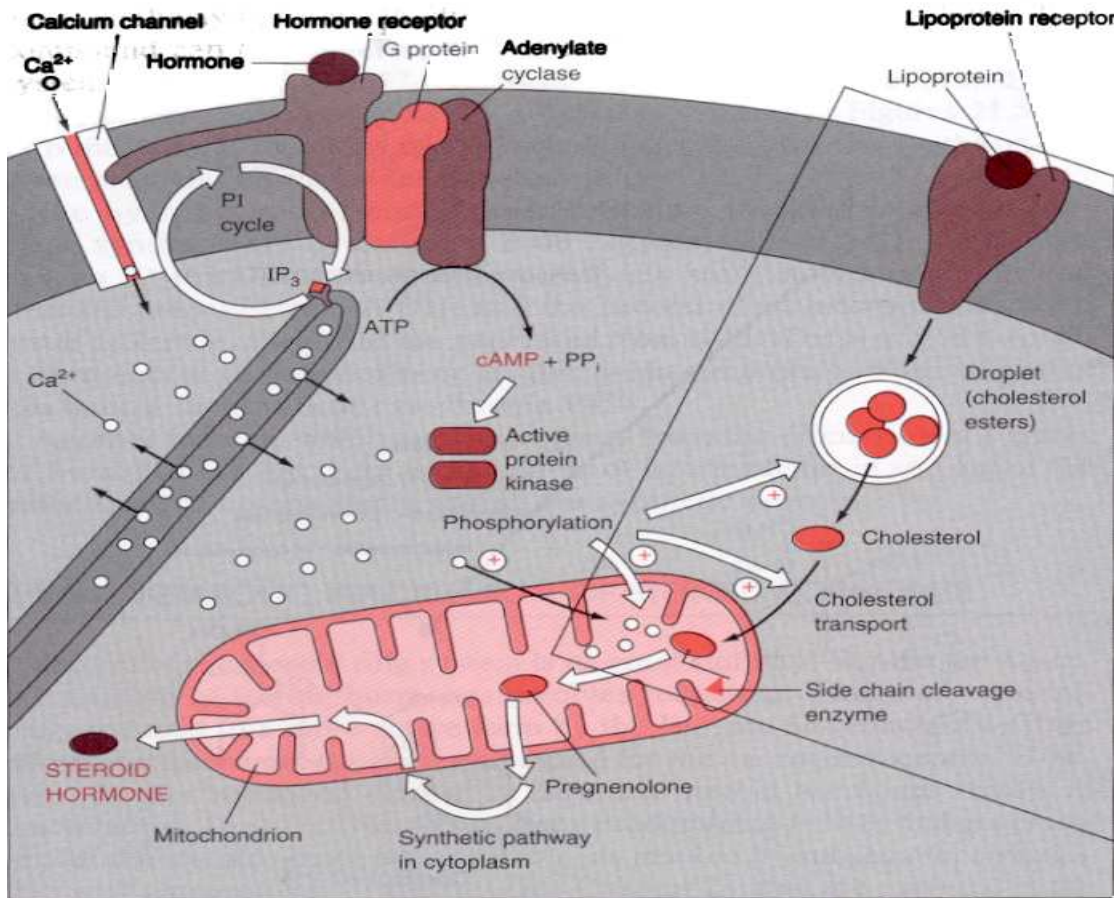


Figura 5.- Síntesis y degradación de AMPc (Tresguerres y col., 1999).

1.8 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son sintetizados por la corteza adrenal actúan sobre múltiples tejidos desencadenando una gran variedad de respuestas que juegan un papel muy importante en la adaptación del organismo a una situación de estrés. Los glucocorticoides tienen importantes efectos antiinflamatorios e inmunopresores, previniendo los efectos perjudiciales de una respuesta inmunitaria excesiva.

La secreción de los glucocorticoides está controlada por la ACTH hipofisaria y ésta a su vez depende de la liberación hipotalámica de la CRH (Tresguerres y col., 2005).



1.8.1 Mecanismo de acción de los glucocorticoides

Los receptores de los glucocorticoides (GR) pertenecen a la superfamilia de las proteínas reguladoras o receptores hormonales esteroideas, tiroideas y de la vitamina D que modulan la expresión génica, como factores de transcripción. El gen para el receptor de los glucocorticoides está en el cromosoma 5 (q₃₁-q₃₂).

Los glucocorticoides actúan en sus células diana de diversos modos:

- a) Induciendo la síntesis proteica, por ejemplo la de las enzimas hepáticas.
- b) Inhibiendo la transcripción de un gen, como el de la POMC en las células corticotropas.
- c) Induciendo la síntesis de una proteína que a su vez tenga acciones inhibitorias, como la síntesis de lipocortina que es antiinflamatoria.
- d) Modificando la propiedad de la membrana celular.

Los glucocorticoides también se unen y activan a los receptores de los mineralocorticoides. La activación de ambos tipos de receptores tiene efectos similares u opuestos, dependiendo del sistema que se esté estudiando. Se han observado efectos opuestos sobre la presión arterial, cuando los dos tipos de esteroides, mineralocorticoides y glucocorticoides se administran intraventricularmente.

La corticosterona y el cortisol tienen prácticamente la misma afinidad por el receptor de glucocorticoides. Sin embargo en el ser humano el cortisol es el glucocorticoide más importante, ya que se encuentra en concentraciones mucho más elevadas que la corticosterona y la aldosterona, esta última circula en concentraciones todavía más bajas que la corticosterona.

Los esteroides sintéticos (dexametasona, prednisolona y triamcinolona) poseen una gran actividad glucocorticoide, mayor que la del cortisol, las modificaciones químicas de su estructura se realizan con objeto de aumentar la actividad glucocorticoide, reducir la actividad mineralocorticoide y aumentar la vida media. El principal antagonista de los receptores de los glucocorticoides es la mifepristona (RU-486) que tiene efectos inversos a los glucocorticoides (**Tresguerres y col., 2005**).



1.8.2 Acciones de los glucocorticoides

1.8.2.1 Metabolismo

Los glucocorticoides actúan sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, en el que tienen un efecto hiperglucemiante y diabetogénico. El cortisol aumenta la gluconeogénesis hepática, disminuye la entrada de glucosa en las células periféricas y estimula la síntesis de glucógeno de modo que éste se almacena, quedando disponible para ser liberado por las hormonas glucogelíticas, como lo son el glucagón y la adrenalina. La homeostasis de la glucemia se mantiene en el organismo gracias al balance entre la insulina, por un lado y, por otro, las hormonas contrarreguladoras como el glucagón, la adrenalina, la GH y el cortisol. El cortisol estimula directamente la liberación pancreática de glucagón.

El efecto del cortisol en el hígado es anabólico, activa la captación de aminoácidos y la síntesis proteica, dando lugar a un aumento de la síntesis de las enzimas que participan en la gluconeogénesis y la glucogenogénesis.

El cortisol estimula también la síntesis de enzimas fosfofenol piruvato, fructosa 1,6 difosfatasa y glucosa, enzimas que catalizan las reacciones finales de gluconeogénesis. Tanto el cortisol como la glucosa promueven la formación de glucógeno, y la conversión del glucógeno beta inactivo en activo, mediante una reacción que además inactiva la gluconeogénesis (**Tresguerres y col., 2005**).

1.8.2.2 Sistema inmunitario

Los glucocorticoides sintéticos son las drogas más utilizadas para suprimir la respuesta inflamatoria, el rechazo de trasplantes y para el tratamiento de un gran número de enfermedades autoinmunes.

La mayoría de las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides se debe a su efecto inhibitorio sobre la síntesis de prostaglandinas. El mecanismo de acción del cortisol es por la inhibición de la producción de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de



membrana. El cortisol induce la síntesis de una proteína (lipocortina o lipomodulina) que inhibe la fosfolipasa A2.

La administración de glucocorticoides previene la reacción antiinflamatoria en respuesta a sustancias extrañas o lesiones tisulares. Esto se debe a que inhiben el aumento de la permeabilidad vascular por su capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, así como la liberación de histamina por los basófilos y células cebadas, por lo tanto disminuyen el edema y la inflamación.

Los glucocorticoides alteran la circulación de las células del sistema inmunitario. Tras la administración de glucocorticoides aumentan el número de neutrófilos, mientras que disminuye la de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

Los glucocorticoides atenúan la acción bactericida los macrófagos y monocitos, por lo que disminuyen la resistencia a las infecciones.

Los efectos de los glucocorticoides son mas acusados en los linfocitos T que en los B, de modo que los pacientes que reciben tratamiento con dosis farmacológicas de glucocorticoides no suelen tener alteraciones en su capacidad para producir anticuerpos, o por lo menos no se han observado alteraciones de las inmunoglobulinas plasmáticas, tras el tratamiento con glucocorticoides.

1.8.2.3 Otros órganos

Los glucocorticoides en exceso producen disminución de la matriz orgánica en el hueso y una atrofia ósea u osteoporosis. Disminuyen la síntesis de colágeno en los osteoblastos, así como la formación de hueso nuevo, por que disminuye la síntesis de osteocalcina actuando a nivel del promotor que controla la expresión del gen de esta hormona.

El cortisol estimula la secreción acida gástrica, aumenta el fluido sanguíneo en la mucosa gástrica, pero disminuye la proliferación del epitelio.



1.8.2.4 Diferenciación y desarrollo

Los glucocorticoides regulan el desarrollo embrionario de diversos órganos (pulmón y glándula mamaria, entre otros), así como la diferenciación celular.

Los glucocorticoides junto con la prolactina y otras hormonas, son necesarios para el inicio de la lactancia. El cortisol y la insulina promueven la diferenciación celular y aumentan la síntesis de DNA y RNA.

1.8.2.5 Sistema nervioso central

En el sistema nervioso los glucocorticoides tienen acciones muy diversas, han sido utilizados para reducir el edema cerebral por sus efectos sobre la permeabilidad vascular. Tanto la carencia de glucocorticoides como su exceso producen cambios en el estado de ánimo, ya que a dosis muy altas, producen muerte neuronal en el hipocampo. Los niveles muy elevados de glucocorticoides alteran la memoria hipocámpica en el ser humano.

1.8.2.6 Efectos sobre otras hormonas

Los glucocorticoides modifican también la secreción de otras hormonas, si bien la mayoría de las acciones se han observado cuando sus niveles son muy altos o en situaciones de tratamiento prolongado con dosis farmacológicas. El exceso de glucocorticoides inhibe la producción de prolactina y la de GH.

El exceso de glucocorticoides disminuye los niveles plasmáticos de T4 y la respuesta de TRH. A nivel de gónadas, los glucocorticoides en dosis farmacológicas inhiben la secreción de estrógenos y andrógenos en el ovario y testículo respectivamente, así como la respuesta estimulante con gonadotropinas.



1.9 Modelo murino: cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU

El modelo experimental que se empleó en la evaluación de los efectos de AMPc y de glucocorticoides fue el cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU, ya que estos parásitos presentan características muy similares a *Taenia solium* en cuanto a morfología y a la síntesis de hormonas esteroides. Tienen la ventaja de reproducirse en el abdomen de ratones lo cual facilita la obtención de los mismos para fines experimentales.



Figura 6.- Fotografía de *Taenia crassiceps* WFU, en medio de cultivo DMEM, tomada en el CINVESTAV, departamento de fisiología biofísica y neurociencias.

1.9.1 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

La *Taenia crassiceps* es un parásito de caninos que en su forma adulta o cestodo se encuentra en el intestino del zorro rojo europeo y norteamericano (**Delvalle, 1989; Dorais y Esch, 1989; Freeman, 1962**). La etapa larvaria (cisticercos) se desarrolla en pequeños roedores que adquieren la infección por ingestión de los huevos provenientes de las heces de los zorros. En los roedores, los huevos se desarrollan a cisticercos y estos se pueden multiplicar asexualmente (**Tresguerres y col., 1999**). Los cisticercos se alojan en diversos tejidos y en la cavidad del cuerpo del roedor.

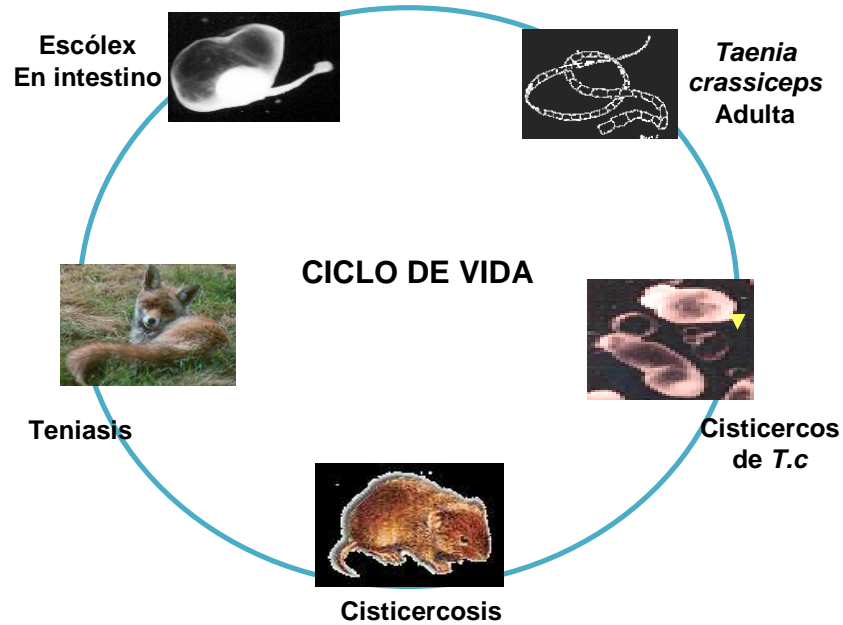


Figura 7.- Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

Los cisticercos se reproducen por gemación, lo que resulta en una gran población de parásitos homogéneos (Huerta, 1992; Spolski, 2000). Esta característica del cestodo que no presentan los de *Taenia solium*, permite realizar estudios del parásito *in vitro*.



2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Trabajos previos del laboratorio han demostrado han demostrado la síntesis de hormonas esteroidogénicas por cisticercos y tenias *solium*, *crassiceps* ORF y *crassiceps* WFU.

Se ha demostrado que estos parásitos pueden transformar precursores tritiados a andrógenos y estrógenos. Siguen una ruta de síntesis de hormonas esteroides muy similar a la que presentan los órganos esteroidogénicos de mamíferos y aves (**Gómez y col., 2000; Valdéz y col., 2006 y Jiménez y col., 2006**), lo que sugiere la presencia de enzimas esteroidogénicas en la *T. solium* y *crassiceps*.

En las células esteroidogénicas y en la secreción de esteroides el AMPc tiene una función importante ya que actúa como segundo mensajero desencadenando una serie de reacciones bioquímicas que dan señal para que el colesterol sea transportado y metabolizado en la mitocondria en la célula esteroidogénica.

En este trabajo de investigación se estudió el efecto del AMPc y de los glucocorticoides en la síntesis de andrógenos y estrógenos por cisticercos de *T. crassiceps* WFU.



3 OBJETIVOS

3.1 Generales

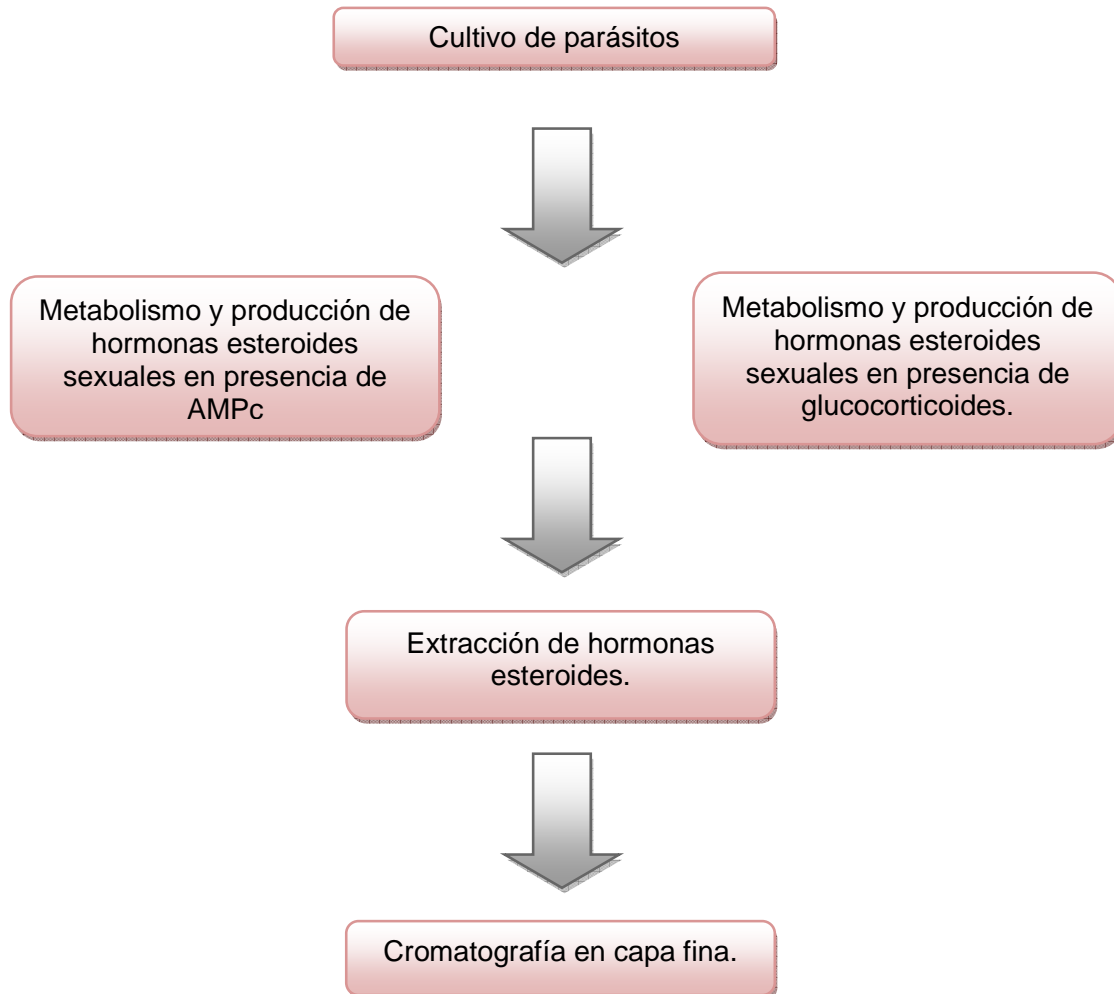
- Evaluar el efecto de los glucocorticoides sobre la capacidad de síntesis de andrógenos y estrógenos por parte de los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU.
- Estudiar el efecto del AMP cíclico en la síntesis de hormonas esteroides por cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU.

3.2 Específicos

- Cultivar cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU.
- Estudiar la capacidad de síntesis de hormonas esteroides sexuales con presencia de glucocorticoides y como precursor radiactivo ^3H -DHEA (Dehidrohepiandosterona radiactiva)
- Estudiar la capacidad de síntesis de hormonas esteroides sexuales con presencia de AMPc y como precursor radiactivo ^3H -A₄ (Androstenediona radiactiva)



4 DESARROLLO EXPERIMENTAL





4.1 Cultivo de parásitos

Los cisticercos de *T. crassiceps* WFU se inocularon en la cavidad peritoneal de ratones hembras bal/c y se dejaron en el animal por 4 ó 7 meses. Los ratones se anestesiaron con éter y se obtuvieron los parásitos. Una vez que se extrajeron los parásitos se lavaron tres veces con solución salina estéril y con medio químicamente definido estéril DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA), HEPES 25mM y 1% de Antibiótico-Antimicótico. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 0.5M y NaHCO₃ al 10%. Los cisticercos se sembraron en cajas de cultivo por 24 horas y posteriormente se pasaron a multipozos y se realizaron los diferentes tratamientos. A cada pozo se le agregaron 2 mL de medio de cultivo estéril DMEM. El medio se esterilizó por filtración con un filtro de poro de 0.22 micrómetros.

Los parásitos se mantuvieron a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa.

4.2 Metabolismo y producción de hormonas esteroides sexuales

4.2.1 Efecto de AMPc

En cuanto a los efectos de AMPc se empleó como marcador radioactivo ³H-A₄ y se incubó por 3 ó 6 horas para el primer experimento y para el segundo se emplearon los tiempos de 24 y 48 horas con el marcador. Se contó con grupos control a los que sólo se les adicionó alcohol.

Las dosis utilizadas fueron:

Tabla 1.- concentraciones utilizadas en los experimentos de efecto AMPc a 4 y 7 meses de parásitos de *T. crassiceps* WFU

| AMPc (ng/mL) | |
|-----------------|---------|
| 4 meses | 7 meses |
| 0.01 | 0.001 |
| 0.1 | 0.01 |
| 1 | 0.1 |
| 10 | 1 |
| 78 | 500 |
| 100 | |
| 500 | |
| 1000 | |
| 1500 | |



4.2.2 Efecto de glucocorticoides

Después de 24 horas de preincubación, los parásitos se trataron diariamente con diferentes dosis de corticosterona durante 5 días, y se realizó el cambio de medio cada 24 horas. Se contó con un grupo de parásitos al que solo se le adicionó alcohol (control).



Figura 8.- Fotografías tomadas a los parásitos de *Taenia crassiceps* WFU en condiciones optimas de crecimiento.

Las dosis utilizadas fueron:

Tabla 2.- Concentraciones utilizadas en los experimentos de efecto de glucocorticoides (corticosterona) a 4 y 7 meses de parásitos con *T. crassiceps* WFU

| CORTICOSTERONA (nM) | |
|------------------------|---------|
| 4 meses | 7 meses |
| 10 | 10 |
| 100 | 100 |
| 250 | 250 |
| 500 | 500 |
| | 1000 |

Una vez transcurrido el periodo de tratamiento se adicionó el marcador radioactivo ^3H -DHEA. El tiempo de incubación con el marcador fue de 6 y 24 horas. Finalizado este tiempo, se extrajo el medio y en el se evaluó el porcentaje de transformación de los metabolitos esperados por TLC.

4.3 Extracción de hormonas esteroides

Del medio de cultivo se extrajeron los esteroides producidos. Se agregaron 5 mL de éter anhidro por cada mL de medio, la mezcla se agitó con vórtex durante 1 minuto, con la



finalidad de que el éter extrajera los esteroides del medio de cultivo, se dejó reposar 10 minutos, obteniéndose dos fases, acuosa y etérea. Los viales se colocaron en una mezcla de hielo seco-acetona (-70° C) durante 15 minutos para congelar la fase acuosa y decantar así la fase etérea conteniendo los esteroides. Se evaporó totalmente el éter en baño María a 37° C. Las muestras se suspendieron en $100\ \mu\text{L}$ de etanol absoluto para proceder a su aplicación en la placa de cromatografía.



Figura 9.- Parásitos con medio de cultivo adecuado, en los multipozos.

4.4 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se preparó la placa de sílica gel. Se aplicaron alícuotas de $3\ \mu\text{L}$ de los estándares disueltos previamente en acetona grado HPLC, en los carriles de la zona de estándares y también en la sección donde se aplicaron las muestras problema. Después de aplicar los estándares, se sembraron $20\ \mu\text{L}$ de las muestras problema que se resuspendieron en $100\ \mu\text{L}$ de etanol absoluto; se utilizó nitrógeno gaseoso para secar el punto de aplicación. Las placas se corrieron en el sistema de solventes elegido. Una vez que los solventes recorrieron la placa, se retiró la misma de la cámara y se dejaron evaporar los solventes. Los estándares se detectaron en las placas por medio de luz U.V y la región correspondiente a los mismos se recortó. Los estándares se revelaron con ácido sulfúrico al 10% seguido de calor. La región de estándares se utilizó para cuadrricular la placa. Posteriormente, se recortó la región correspondiente a las muestras, y se colocaron en viales con 5 mL de líquido de centelleo. Finalmente, la radioactividad se cuantificó en un contador para emisiones Beta. Los resultados se expresaron como porcentaje de transformación de precursor para cada metabolito identificado.



5 RESULTADOS

5.1 Resultados de AMPc

La ruta que se tomó como base para poder explicar la síntesis de hormonas esteroides en presencia de AMPc para las curvas que se presentan en este trabajo es la siguiente (en el cuadro marcado en el esquema).

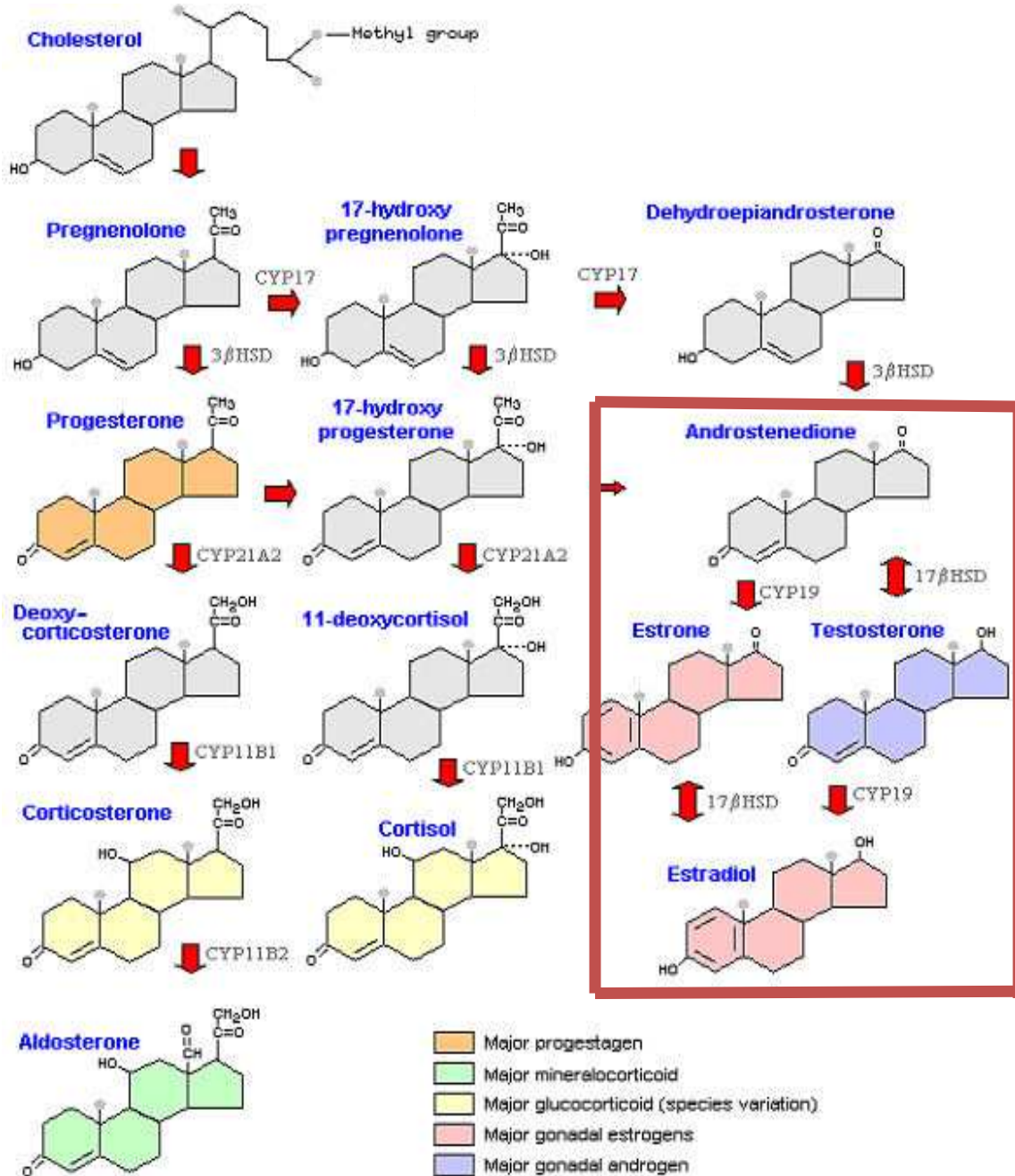


Figura 10 - Ruta metabólica de los esteroide seguida para la parte experimental de AMPc.



La gráfica que se muestra en la figura 11 señala los resultados del experimento realizado con los cisticercos extraídos de un ratón después de 4 meses de infección. Las concentraciones de AMPc que se utilizaron de AMPc se muestran en la misma; éste se adicionó junto con el precursor androstenediona tritiada ($^3\text{H-A}_4$) Se observó una inhibición en cuanto a la transformación de $^3\text{H-A}_4$ a $^3\text{H-T}_4$ (Testosterona); conforme se aumenta la concentración de AMPc, la síntesis de este metabolito disminuye.

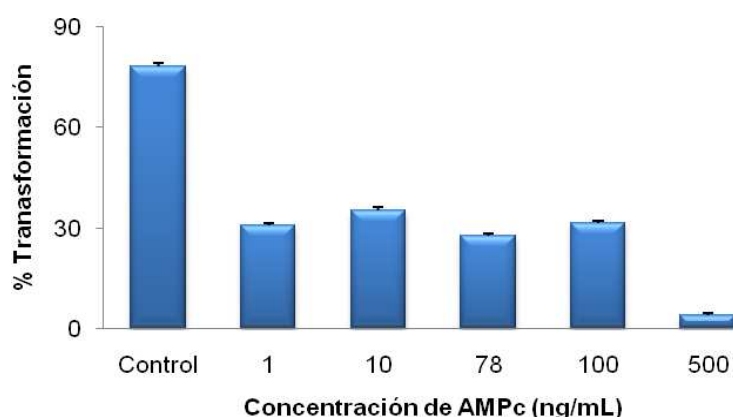


Figura 11. Porcentaje de transformación a ^3H -Testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 3 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con $^3\text{H-A}_4$. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$.

En la figura 12 se muestra la síntesis de estrona tritiada ($^3\text{H-E}_1$) a partir del precursor $^3\text{H-A}_4$. Se observó nuevamente una inhibición de la síntesis de esta hormona, ya que conforme se aumenta la concentración de AMPc, disminuye la concentración de E_1 .

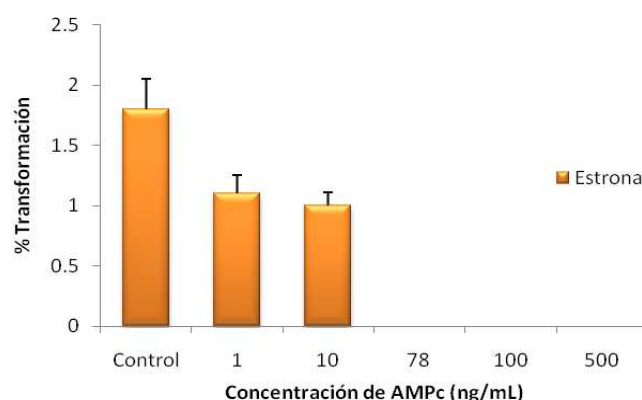


Figura 12. Porcentaje de transformación a ^3H -Estrona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 3 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con $^3\text{H-A}_4$. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$.



En la figura 13 se muestra la síntesis de $^3\text{H-T}_4$ con parásitos obtenidos después de 7 meses de infección, incubados por 3 o 6 horas. Se observó una discreta estimulación de la producción de esta hormona en concentraciones bajas (0.001, 0.01, 0.1 ng/mL) de AMPc. Para la síntesis de $^3\text{H-T}_4$ con parásitos de 7 meses con un tiempo de incubación de 6 horas, se observó una estimulación de la producción en concentraciones bajas (0.001, 0.01, 0.1 ng/mL) de AMPc y en concentraciones altas (1, 500 ng/mL) tendió a desaparecer.

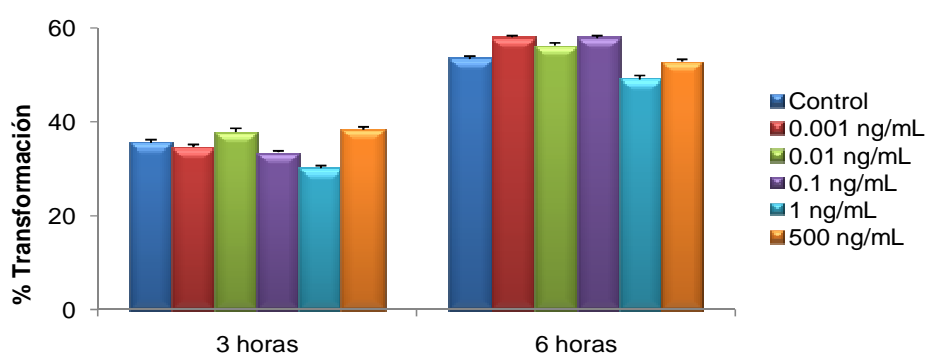


Figura 13. Porcentaje de transformación a $^3\text{H-Testosterona}$ por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 3 o 6 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con $^3\text{H-A}_4$. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$.

La figura 14 representa la transformación de $^3\text{H-A}_4$ a $^3\text{H-E}_1$, se observó una inhibición de la síntesis de este metabolito conforme se aumentaba la concentración de AMPc, respecto a las concentraciones básicas.

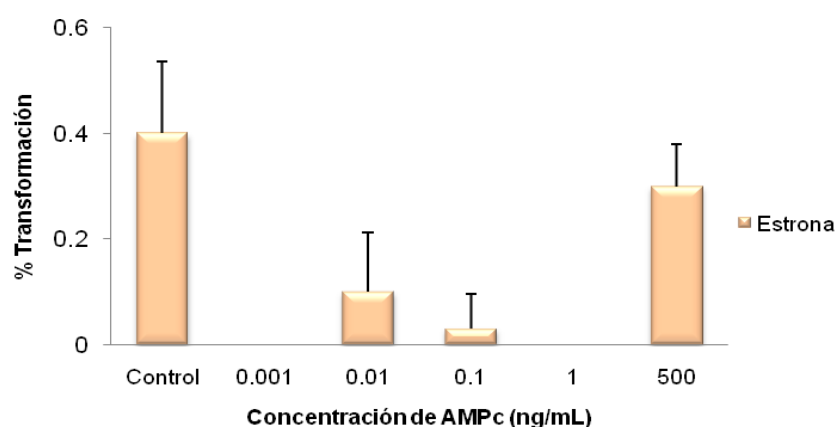


Figura 14. Porcentaje de transformación a $^3\text{H-Estrona}$ por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 6 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con $^3\text{H-A}_4$. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$.



La figura 15 muestra el comportamiento de la síntesis de $^3\text{H-T}_4$ a partir de $^3\text{H-A}_4$ con parásitos de 4 meses de infección con un tiempo de incubación de 24 h o 48 h. Los resultados mostraron que a concentraciones altas (500, 1000, 1500 ng/mL) existe una estimulación en la producción de este metabolito (Figura a). Por otro lado se muestra que en los parásitos de esta misma edad pero con un tiempo de incubación de 48 horas se presentó una inhibición en la producción de $^3\text{H-T}_4$.

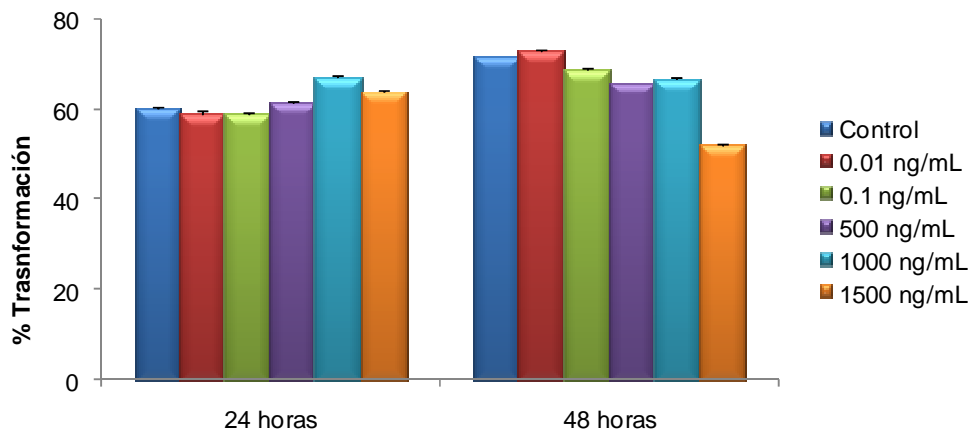


Figura 15. Porcentaje de transformación a $^3\text{H-Testosterona}$ por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 24 y 48 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con $^3\text{H-A}_4$. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$.

La figura 16 muestra el comportamiento de la síntesis de $^3\text{H-E}_1$ a partir de $^3\text{H-A}_4$ en donde se observa claramente una estimulación en la producción de este metabolito en los cisticercos de 4 meses tratados por 24 horas con AMPc. Esto sólo se observa en la concentración de 0.1 ng/mL de AMPc en comparación con la producción basal mostrada.

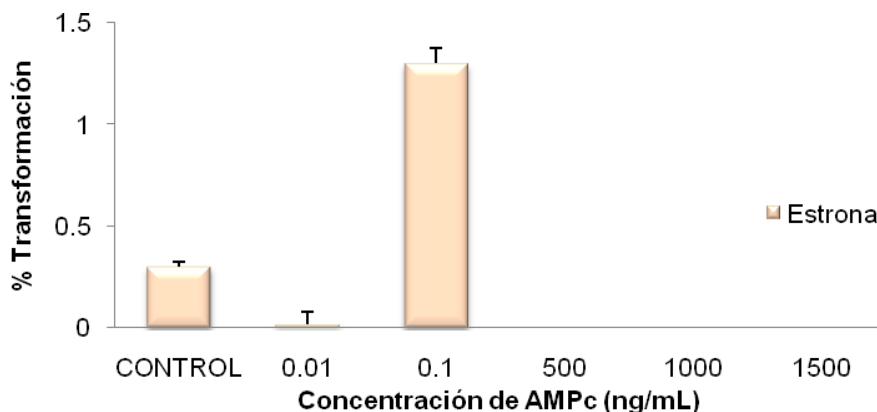


Figura 16. Porcentaje de transformación a $^3\text{H-Estrona}$ por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 24 horas con diferentes dosis de AMPc, e incubados con $^3\text{H-A}_4$. Diclorometano:Acetato de etilo (8:2 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$.



5.2 Resultados del efecto de corticosterona

Los resultados muestran el efecto de la corticosterona sobre el metabolismo de ^3H -dehidroepiandrosterona (^3H -DHEA) por los cisticercos de *T. crassiceps* WFU. Los metabolitos evaluados fueron androstendiol, androstenediona, testosterona, estradiol y estrona.

Los cisticercos (4 meses) en cultivo sintetizaron gran cantidad de androstendiol a las 6 horas de incubación, que se incrementó a las 24 horas. En estos parásitos sólo el tratamiento con 100 nM de corticosterona resultó en un aumento en la secreción de este andrógeno a las 6 horas. Dicho efecto no se observó cuando los parásitos se dejaron por 24 horas (Figura 17).

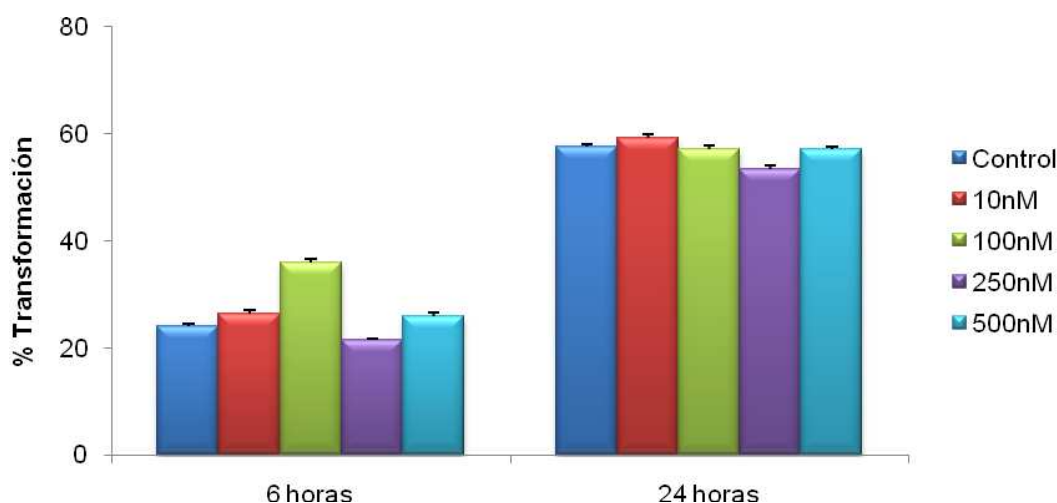


Figura 17. Porcentaje de transformación a 3H-Androstendiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ^3H -DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$. Se realizaron dos repeticiones del experimento.

En la figura 18 se observa que en el medio de cultivo de cisticercos de *T. crassiceps* WFU incubados por 6 y 24 horas se presentó poca concentración de testosterona. En estos parásitos el tratamiento con diferentes dosis de corticosterona resultó en una disminución en la concentración de testosterona a las 6 horas. Sólo las dosis de 100 y 250 nM a las 24 horas mostraron la misma tendencia.

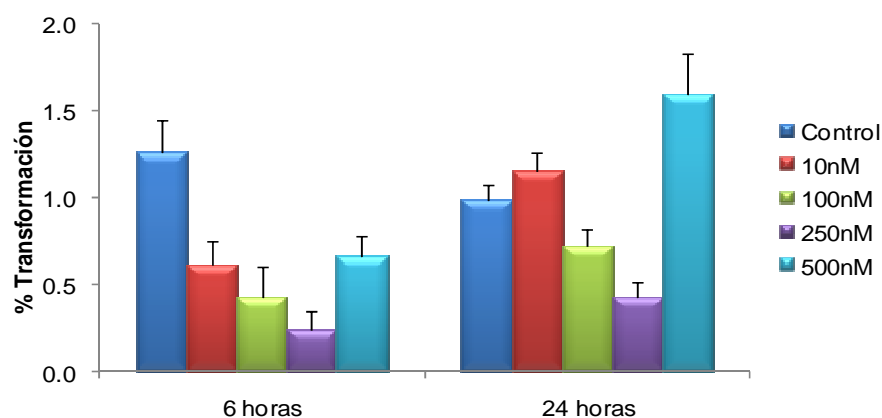


Figura 18. Porcentaje de transformación a 3H-testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ^3H -DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$. Se realizaron dos repeticiones del experimento.

Los cisticercos de 4 meses de infección secretaron poca cantidad de estradiol a las 6 horas de cultivo, que se incrementó cuando los cisticercos se cultivaron por 24 horas. La respuesta de los parásitos al tratamiento con corticosterona fue diferente entre los dos tiempos de cultivo, ya que a las 6 horas se observó una tendencia a la baja en el porcentaje de transformación de estradiol, y después de 24 horas, la corticosterona mostró un efecto estimulante en la síntesis de estradiol (Figura 19).

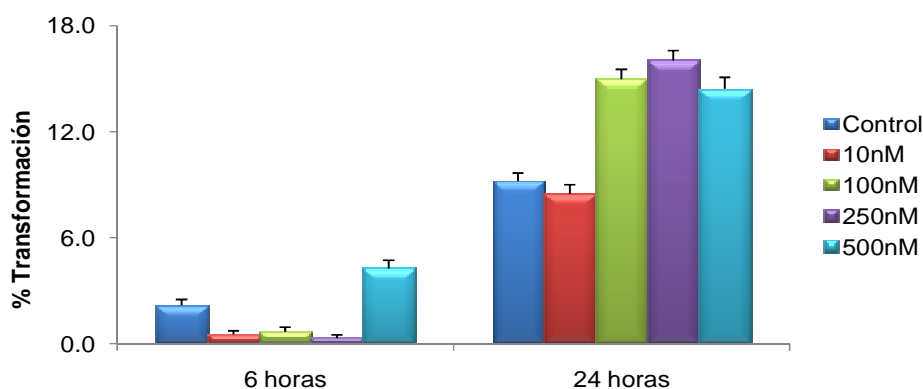


Figura 19. Porcentaje de transformación a 3H-Estradiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ^3H -DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$. Se realizaron dos repeticiones del experimento.



No se detectó síntesis de androstenediona.

La síntesis de estrona mostró valores inferiores al 1%, en ambos tiempos de incubación (6 y 24 horas), es por ello que se piensa que no representa una transformación considerable a partir de ³H-DHEA. La tabla 3 hace referencia a los valores obtenidos.

Tabla 3. Porcentaje de transformación a 3H-Estronal por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (4 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4. Se realizaron dos repeticiones del experimento.

| | 6 horas | 24 horas |
|----------------|---------------|---------------|
| Control | 0.2 \pm 0.3 | 0.4 \pm 0.3 |
| 10 nM | 0.5 \pm 0.5 | 0.2 \pm 0.2 |
| 100 nM | 0.8 \pm 0.6 | 0.0 |
| 250 nM | 0.6 \pm 0.4 | 0.2 \pm 0.3 |
| 500 nM | 0.2 \pm 0.2 | 0.0 |

Para el estudio con parásitos de 7 meses con *T. crassiceps* WFU tratados con corticosterona y ³H-DHEA por 6 y 24 se observó que a las 6 horas de incubación (figura 20) se incrementó la síntesis de androstenediol en forma proporcional a la concentración de corticosterona empleada si se la compara con el grupo control.

A las 24 horas de tratamiento con corticosterona la síntesis de androstenediol mostró la misma tendencia que a 6 horas, salvo la concentración de 500nM.

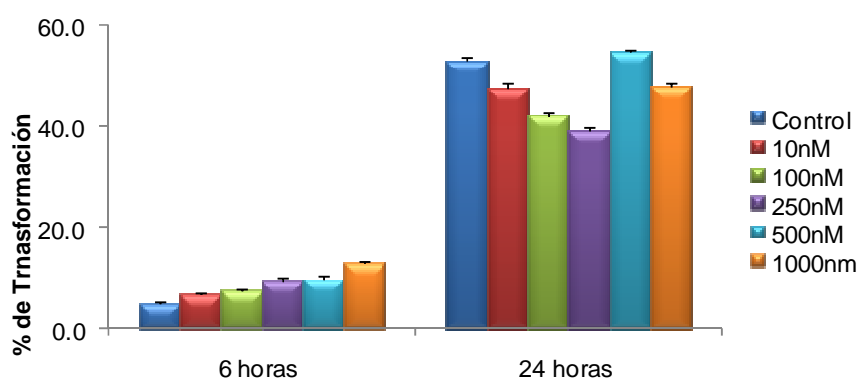


Figura 20. Porcentaje de transformación a 3H-Androstenediol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con n = 4. Se realizaron tres repeticiones del experimento.



La síntesis observada de 3H-DHEA para testosterona (figura 21) a 6 horas de incubación indica que hay variaciones en todas las dosis, es decir no presenta alguna tendencia, y las dosis donde hay un mayor porcentaje de transformación corresponden a 100 y 250nM con altos porcentajes de síntesis.

A 24 horas de incubación hay una disminución de testosterona con respecto al control en todas las dosis menos en la de 1000nM, además los valores de porcentaje de transformación son muy pequeños comparados con los registrados a 6 horas.

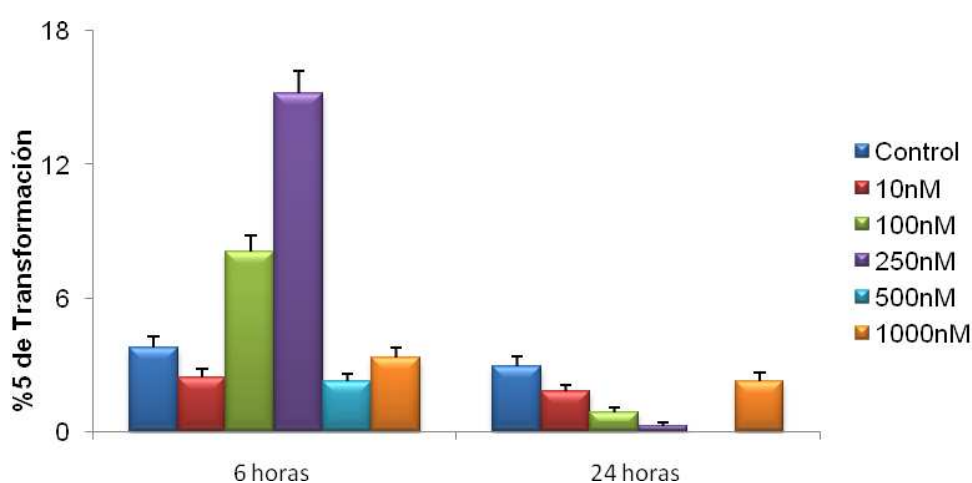


Figura 21. Porcentaje de transformación a 3H-Testosterona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media ± e.e.m. con n = 4. Se realizaron tres repeticiones del experimento.

En cuanto a la síntesis de estradiol a partir de ³H-DHEA (figura 22) se observó que a las 6 h de incubación la síntesis de estradiol no fue significativa porque la mayoría de los valores de transformación registrados con las dosis de corticosterona oscilaban en porcentajes menores al 1%, salvo la dosis de 500nM adonde se veía un claro incremento. La incubación por 24 horas tuvo un cambio drástico con lo sucedido a las 6 horas ya que el aumento del porcentaje de transformación de ³H-DHEA a estradiol fue muy elevado comparado con lo observado tanto con el control, como por los valores obtenidos a las 6 horas.

El incremento de la transformación a estradiol en presencia de corticosterona fue proporcional a la dosis de hormona empleada en el estudio. En la dosis de 500nM hubo



una disminución con respecto a las otras concentraciones, sin embargo mostró un porcentaje de transformación más elevado que el control.

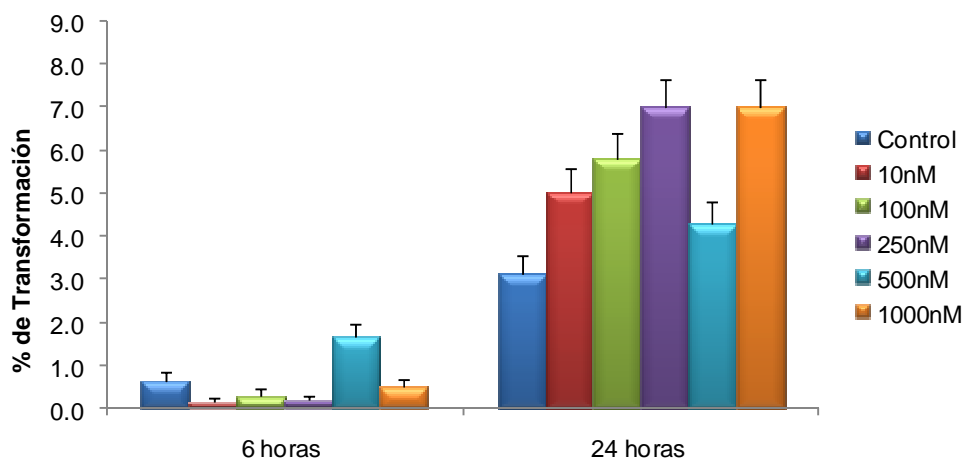


Figura 22. Porcentaje de transformación a 3H-Estradiol por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$. Se realizaron tres repeticiones del experimento.

No se detectó síntesis de androstenediona.

No hubo presencia de estrona a las 6 horas de incubación , pero sí se pudo apreciar a las 24 horas en porcentajes muy pequeños.

Tabla 4. Porcentaje de transformación a 3H-Estrona por cisticercos de *T. crassiceps* WFU (7 meses de infección), tratados en cultivo por 5 días con diferentes dosis de corticosterona, e incubados con ³H-DHEA por 6 ó 24 horas. Benceno : Metanol (9:1 v/v). Los datos representan la media \pm e.e.m. con $n = 4$. Se realizaron tres repeticiones del experimento.

| | 6 horas | 24 horas |
|----------------|---------|---------------|
| Control | 0.1 | 0.4 \pm 0.2 |
| 10nM | 0.0 | 0.4 \pm 0.2 |
| 100nM | 0.0 | 0.3 \pm 0.1 |
| 250nM | 0.0 | 0.4 \pm 0.1 |
| 500nM | 0.0 | 0.4 \pm 0.1 |
| 1000nM | 0.0 | 0.3 \pm 0.1 |



5.2.1 DISCUSIÓN

Efecto de AMPc

Los resultados obtenidos muestran que los grupos control de los parásitos de mayor edad sintetizan significativamente menos testosterona que los de cuatro meses de infección. Estos datos sugieren que dentro del estadio larvario en que se encuentran estos parásitos, existe un proceso de envejecimiento que hace que probablemente redunde en una disminución de la cantidad o de la eficiencia de las enzimas esteroideogénicas involucradas.

En los experimentos adonde se adicionaron diferentes dosis de AMPc se observaron también diferencias en la síntesis de esteroides entre los parásitos de 4 y 7 meses de edad.

Cuando se adicionaron diferentes concentraciones de AMPc (1, 10, 78, 100 y 500 ng/ml) a los parásitos de 4 meses de infección, en un tiempo de incubación de 3 horas, se encontró un efecto inhibitorio de la síntesis de testosterona y de estrona conforme aumenta la concentración del AMPc. Es posible que las dosis utilizadas fueran altas para estos organismos y produzcan una regulación a la baja de la síntesis de esteroides. Tales comportamientos se han observado en mamíferos cuando se administran dosis elevadas de LH a cultivos de células de Leydig del testículo; el AMPc es el segundo mensajero en el efecto de estas hormonas proteicas que no ingresan a la célula por su tamaño molecular y poca solubilidad en los lípidos de membrana.

Cuando se ensayaron tiempos más prolongados de incubación con parásitos de cuatro meses de infección desapareció el efecto inhibitorio de AMPc sobre la síntesis de testosterona observado a las 3 h de incubación, y se encontró más bien una ligera estimulación con dosis altas. Tampoco hubo inhibición clara de la síntesis de estrona. Estos resultados sugieren que el compuesto fue degradado en el interior del cisticerco, ya que se sabe que es muy sensible al efecto de las fosfodiesterasas endógenas. En posteriores experimentos sería necesario utilizar inhibidores de dichas enzimas como la forskolina que inhibe a las fosfodiesterasas.



Teniendo en cuenta esta posibilidad de una regulación negativa, se incubaron los parásitos de 4 meses con dosis más bajas de AMPc por 24 o 48h y tampoco hubo efectos inhibitorios de AMPc, que sugiere que a tiempos más altos de incubación se pierde el efecto inhibitorio de este mensajero intracelular por la misma razón descrita de degradación del AMPc por fosfodiesterasas. Se necesita realizar experimentos con dosis bajas de este compuesto y tiempos cortos de incubación en presencia de forskolina, para profundizar sobre estos resultados.

En otro de los ensayos utilizamos parásitos de siete meses de infección porque como se comentó más arriba existe una clara diferencia en la capacidad de síntesis de esteroides cuando se los compara con cisticercos más jóvenes. Los tratamientos con dosis de 1 y 500 ng/mL de AMPc, que en los parásitos de cuatro meses inhibieron la síntesis de testosterona, no afectaron a estos organismos más viejos ni a las 3 ni a las 6, y tampoco se observó inhibición alguna a 24 o 48h de incubación con el compuesto.

Estos datos sugieren que los parásitos de esta edad carecen de un mecanismo controlado por AMPc. Otra posibilidad es que el tegumento que rodea al cisticerco inhiba la entrada de este compuesto. No se descarta tampoco la presencia de una fosfodiesterasa más activa que la del cisticerco de 4 meses, que estuviera degradando activamente al AMPc.

Efecto de Corticosterona

Cuando se utilizó como precursor a la $^3\text{H-DHEA}$, los resultados mostraron otra vez diferencias entre la capacidad de sintetizar esteroides sexuales entre cisticercos de 4 y de 7 meses de infección; los parásitos más jóvenes sintetizaron más estradiol que los de 7 meses.

Los resultados indican que a partir de $^3\text{H-DHEA}$ los parásitos siguieron la ruta Δ_5 ya que se encontró androstendiol. La síntesis de testosterona seguramente también siguió esta misma ruta ya que no se encontró síntesis de androstenediona que también es producida en otras especies a partir de $^3\text{H-DHEA}$ por la actividad de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (figura 23). La síntesis de estradiol que claramente se observa en



cisticercos de 4 y 7 meses de edad es altamente probable que provenga de la testosterona que se sintetizó desde androstendiol.

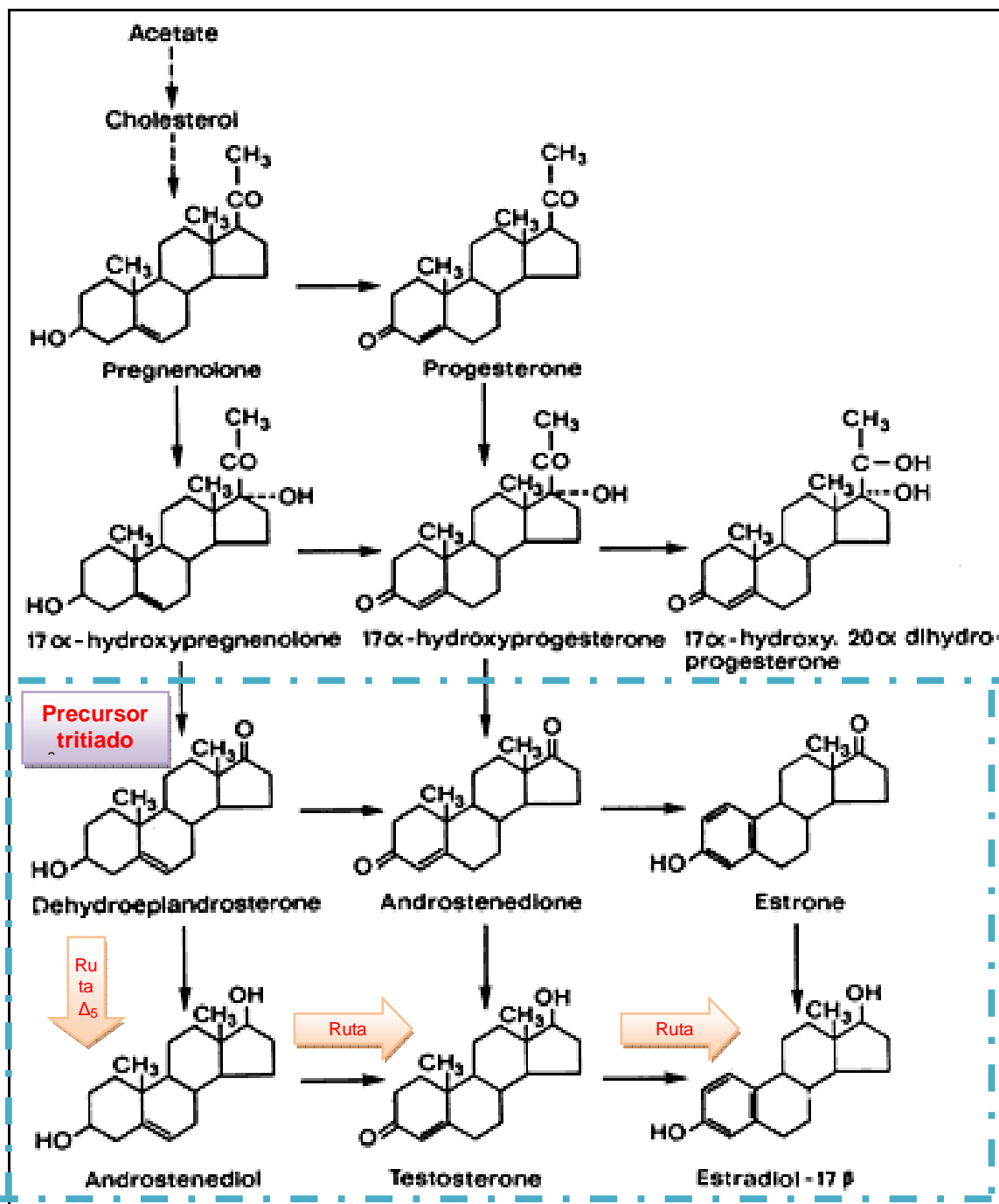


Figura 23.- Ruta metabólica seguida por los cisticercos para sintetizar andrógenos y estrógenos a partir de ^3H -DHEA. Muestra además los metabolitos encontrados.



Con esto se deduce entonces que la síntesis de hormonas sexuales en los cisticercos es un proceso dinámico donde el porcentaje de transformación se relacionó principalmente a las enzimas esteroideogénicas con que cuenta el organismo y del tiempo de incubación con el precursor tritiado. Es importante remarcar que la síntesis de esteroides es un proceso dinámico donde un metabolito sintetizado a partir del precursor que se adicionó, se transforma en el que sigue en la ruta diseñada por la existencia de las correspondientes enzimas, y así sucesivamente. Por lo tanto por ejemplo en el caso de la síntesis de estradiol se verá que a medida que aumenta la síntesis de estradiol disminuye la de testosterona que es el precursor inmediato y por lo tanto se consume.

Los resultados obtenidos con el tratamiento con diferentes dosis de corticosterona indican que el glucocorticoide estimuló significativamente la síntesis de estradiol tanto en los cisticercos de 4 como de 7 meses de infección. El tratamiento no modificó importantemente la síntesis de androstendiol, pero en cambio la de testosterona fue disminuyendo a medida que aumentaba la de estradiol. Este hecho sugiere fuertemente que la corticosterona regula a la alta a la aromatasas y no a la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, enzima que sintetiza testosterona a partir de androstendiol. En tejidos de mamíferos, como la piel humana pero no en otros que también expresan la enzima, se ha demostrado que el cortisol estimula la actividad de aromatasas.

En resumen los datos de este trabajo demuestran por primera vez que la corticosterona puede regular la síntesis de esteroides en un parásito.



6 CONCLUSIONES

Los experimentos confirmaron que los cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU sintetizan andrógenos y estrógenos a partir de esteroides precursores tritiados, en el caso de este trabajo a partir de ^3H -andostenediona y de ^3H -DHEA.

El tiempo de infección del huésped incide en la capacidad de sintetizar esteroides sexuales por los parásitos, ya que a mayor tiempo se detectó menor síntesis.

El AMPc inhibe la síntesis de testosterona y de estrona en cisticercos de 4 meses de infección, pero no afecta o más bien aumenta la de los parásitos de 7 meses de infección.

La presencia de corticosterona en el medio de cultivo de los cisticercos aumenta significativamente la síntesis de estradiol en los cisticercos de 4 y de 7 meses de infección.

El efecto de corticosterona es dosis-dependiente y aunque ya se observa desde las 6h de incubación en presencia del precursor tritiado (^3H -DHEA), se hace más evidente cuando los parásitos están 24 horas en presencia del mismo.

Los resultados sugieren fuertemente que la corticosterona estimula la síntesis de estradiol actuando sobre la aromatasa, enzima que es responsable de la síntesis de estrógenos.

Los resultados obtenidos con el tratamiento con un glucocorticoide como la corticosterona evidencian la necesidad de reevaluar el efecto de estas hormonas en el tratamiento de la neurocisticercosis.



7 BIBLIOGRAFÍA

- Fisiología Humana, J. A. F Tresguerres, 2a Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid España, 2005, 1181pag. ISBN-84486-0237-4.
- Gómez Y, Valdez R A, Larralde C, Romano MC (2000). Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cisticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone in vitro. J. Steroid Biochem. & Mol. Biol. 74:143-147.
- Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. A., Brooks G. F., Butel J. S., Ornston N. L., Microbiología Médica, decimotercera edición ed. El manual moderno, México, D.F. 1990
- Jiménez P, Valdéz 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.
- Miller L., Walter(2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. Biochemica et Biophysica Acta 1771:663-676.
- Payne A. H., Hardy M. P., Russell L. D.. The Leydig cell. Editorial Cache River Press, USA, 1996, pp 802. ISBN0-9627422-7-9.
- Rivero O. Tratado de medicina interna, Vol., 2° edición ed. Manual Moderno, México, D.F1994.
- Romano M.C, Valdéz R.A, Cartas A.L, Gómez Y, Larralde C. (2003). Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. J. Steroid Biochem. & Mol. Biol. 85:221-225.
- Romero C. R. , Microbiología y parasitología humana, 1° edición ed. Editorial medica panamericana, México, D.F. 1993.
- Váldez RA, Jiménez P, Cartas AL, Gómez Y, Romano M.C. (2006) *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens in vitro. Parasitol Res. 98: 472-476.
- Simpson Evan R., Zhao Ying, Aguarwai Venna R., Michael M. Dodson, Bulun Serdar E., Hinshelwood Margaret M., Graham-Lorence Sandra, Sun Tiejun, Fisher Carolyn R., Qin Kenan and Mendelson Carole R. *Aromatase expresion in health and disease*

ANEXOS

Abreviaturas utilizadas

Esteroides

Nombre trivial

A4: androstenediona
DHEA: dehidroepiandrosterona
T: testosterona
E1: estrona
E2:estradiol

Nombre sistemático

4-androsten-3 α -hidroxi-17-ona
5-androsten-3 β -hidroxi-17-ona
4-androsten-17 β -ol-3-one
1, 3, 5 (10)-estratien-3-ol-17-ona
1, 3 5 (10)-estratien-17 β -diol

Reactivos

DMEM (Dulbecco's Modifield Eagle Medieum)
Gibco BRL, life Technologies, USA.

Suero bovino fetal (SBF)
GIBCO BRL, life Technologies, USA.

HEPES 25mM (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid])
SIGMA chemical St. Louis MO, USA

BSA (albumina serica Bovina)
SIGMA chemical St. Louis MO, USA

Antibiotico-Antimicotico (penicilinaG sodica, sulfato de estreptomycinay anfotericina B)
GIBCO chemical St. Louis MO, USA.

Hidroxido de sodio (NaOH)
SIGMA chemical St. Louis MO, USA

Carbonato de sodio (NaHCO₃)
SIGMA chemical St. Louis MO, USA

Cloroformo G.R
Health Hazard E.M. Science, Germany

B-estradiol (17 β -Estradiol; 1, 3, 5(10) Estratiene 3, 17 β -diol)
SIGMA chemical St. Louis MO, USA

Androstenediona (4-andrsten-3, 17Dione)

Steraloids, Inc. Newport, USA

Testosterona (Testosterone Δ^4 -Androsten- 17 β -ol-3-enol)
SIGMA chemical St. Louis MO, USA
3H-androstenediona (androst-4-ENE-3, 17 Dione[1, 2, 6, 7-3H(N)]).
NEN, Boston, MA, USA.

3H-Dehidroepiandosterona[1, 2, 6, 7-3H(N)]-dehidroepiandosterona
NEN, Boston, MA, USA.

Etil éter anhidro (Éter absoluto)
E:M: Science, Merck, Darmstadt, Germany

Acetona p.a.
Merck, Darmsadt, Germany

Etanol absoluto p.a
Merck, Darmsadt, Germany

Diclorometano 99.6%
Aldrich Chemical Co. Inc., USA

Acetato de etilo
Merck, Darmsadt, Germany

Benceno p.a.
Merck, Darmsadt, Germany

Materiales

Filtro (0.22 μ m)
Millipor corporation Bedford MA, USA.
Multipozos (24 well cell culture cluster)
Costar, New York, USA
Cromatofolios de aluminio de silica gel G-60 F254 con indicador fluorescente
Merck, Darmsadt, Germany
Material de disección
Viales de centelleo
Material de vidrio

Equipo

Contador de centelleo Beckman LS 600
Incubadora
Campana de flujo laminar
Baño María