



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**EFFECTO DE LA HIPOFISECTOMÍA TOTAL Y PARCIAL SOBRE LA
RESISTENCIA Y/O SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR *Trichinella
spiralis* EN EL HÁMSTER DORADO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ROSALÍA HERNÁNDEZ CERVANTES

ASESORES: DR. JORGE MORALES MONTOR

DR. LENIN PAVÓN ROMERO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis:**
Efecto de la hipofisectomía total y parcial sobre la resistencia y/o susceptibilidad a la infección por Trichinella spiralis en el hámster dorado

Que presenta la pasante: Rosalía Hernández Cervantes
Con número de cuenta: 302256037 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 03 de octubre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. J. Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	Dr. Jorge Morales Montor	
1er SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do SUPLENTE	MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Máxima Casa de Estudios, y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haber puesto a mi disposición sus instalaciones y todos los recursos humanos que me han permitido tener una formación profesional. Asimismo, gracias a todos y cada uno de los profesores de la FES Cuautitlán, por aportar su granito de arena en nuestro desarrollo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la fuente Muñiz" por haberme abierto sus puertas.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, por la beca de tesis de licenciatura otorgada al proyecto IN213108.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada como ayudante de SNI III.

Agradezco a la RedFarmed-Conacyt por la beca de licenciatura que recibí para la realización de este trabajo.

A mis tutores, Dr. Jorge Morales Montor y Dr. Lenin Pavón Romero.

A los honorables miembros del jurado: M. en C. J. Pablo Martínez Labat, Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón, Dr. Jorge Morales Montor, Dr. Salvador Fonseca Coronado y MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana.



Gracias al Dr. Jorge Morales Montor por permitirme formar parte de su gran grupo de trabajo, además de brindarme la oportunidad y confianza para desarrollar este trabajo de tesis, y sobre todo, por ser la gran persona que es.

Al Dr. Lenin Pavón Romero no me queda más que agradecerle todo el apoyo que recibí de él.

Al Dr. Andrés Quintanar Stephano, de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por compartir una pequeña parte de todos sus conocimientos con nosotros y por todos sus sabios consejos.

A la Dra. Norma Moreno Mendoza, del Departamento de Biología Celular y Fisiología por permitirme trabajar en su laboratorio, y hacerme sentir parte de él.

Al Dr. Armando Pérez Torres, Dr. Julio César Carrero y al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, que de alguna u otra forma he pisado sus respectivos laboratorios en busca de ayuda, y muy amablemente la he recibido. Gracias a ellos y a sus equipos de trabajo.

A los honorables miembros del jurado: M. en C. J. Pablo Martínez Labat, Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón, Dr. Jorge Morales Montor, Dr. Salvador Fonseca Coronado y MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana, por el tiempo invertido en la revisión de mi tesis, así como por sus acertadas correcciones y comentarios.

Agradezco a la Bióloga Lorena López Griego, Técnico Académico del laboratorio; por su ayuda, enseñanza y asesoría durante el desarrollo de las técnicas que ocupé durante el desarrollo de mi tesis, y más aún por la amistad y confianza que me brinda.

Un agradecimiento especial a la Maestra en Ciencias Esmeralda Lira Romero, por la asesoría brindada con técnicas de inmunofluorescencia. Gracias Esme.

A la Histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata, por las facilidades brindadas para trabajar en el laboratorio de Técnicas Histológicas, en la Facultad de Medicina.

Al C. a Dr. Miguel Tapia Rodríguez, de la Unidad de Microscopía del IIB, por la ayuda recibida y por la paciencia que me tiene.





Dedicatorias y agradecimientos especiales

A mis padres y hermano, que siempre me han dado su apoyo incondicional y a quienes debo este triunfo profesional, por todo su trabajo y dedicación para darme una formación académica y sobre todo humanista y espiritual. De ellos es este triunfo y para ellos es todo mi agradecimiento.

A todos mis amigos de la FES, sin excluir a ninguno, pero en especial a Nelly, Evelyn, Marisol, Rosa Laura, Karla, Gaby, Nely, Bárbara, Omar, José, Giovanni y Rodolfo, por haber hecho amena mi estancia dentro y fuera de las aulas, y por haber vivido conmigo esta experiencia de llegar a ser un QFB.

Al Dr. Romel Hernández Bello, mi sensei en un comienzo, que se convirtió en un gran amigo.

A todos los del labo: al Doc, Romel, Lore, Eli, Cristian, Saé, Karen, Nelly, Vale, Itztli, Ana Gaby, Ricardito, Karencita, Paul, Nancy, Yolandita y Angie; además de las chicas del labo de la Dra. Norma, ella, Esme, Alma y Sandy, que de una u otra manera he aprendido algo de cada uno, he tenido la oportunidad de convivir con ustedes y he comprobado que son personas muy talentosas y agradables, como toda la gente en Biomédicas.

Si me faltó por mencionar a alguien, una disculpa. Gracias a todos y cada uno de los que lean y han leído este trabajo porque, por ese simple hecho, ya forman parte de él.

Rosalía



ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Abreviaturas	2
I. Marco teórico	4
1.1 Hipófisis	4
1.1.1 Localización y anatomía	4
1.1.2 Hormonas hipofisarias	6
1.1.3 Problemas relacionados con la hipófisis	8
1.1.4 Papel inmunomodulador de las hormonas hipofisarias	10
1.2 <i>Trichinella spiralis</i>	11
1.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Trichinella spiralis</i>	11
1.2.2 Morfología general	12
1.2.3 Reproducción y ciclo de vida	15
1.2.4 Respuesta inmunológica ante la triquinosis aguda	18
1.2.5 Manifestaciones clínicas	19
1.2.6 Diagnóstico	20
1.2.7 Tratamiento	21
1.2.8 Importancia médica y veterinaria	21
1.2.9 Prevalencia de la triquinelosis	22
1.3 Interacción Neuroinmunoendocrina	22
II. Resumen del marco teórico	24
III. Hipótesis y objetivos	25
3.1 Hipótesis	25
3.2 Objetivo general	25
3.3 Objetivos particulares	25
IV. Materiales y métodos	26
Esquema del trabajo experimental	26
4.1. Material biológico	27
4.1.1 Grupos experimentales	27
4.2. Microcirugías	28
4.2.1 Cuidados post-operatorios y recuperación	30
4.3 Parásitos e infección	30
4.3.1 Conservación de cepa	30
4.3.2 Obtención y aislamiento de LM	30
4.3.3 Infección	32

	Página
4.4 Sacrificio y obtención de órganos	32
4.5 Conteo de adultos de <i>T. spiralis</i> a nivel intestinal	33
4.6 RT-PCR de bazo	34
4.6.1 Obtención y cuantificación de RNA	34
4.6.2 Obtención de cDNA	35
4.6.3 Determinación de la expresión de citocinas por RT-PCR	36
4.6.4 Cuantificación de la expresión relativa de citocinas	37
4.7 Procesamiento de muestras de intestino para Histología	37
4.7.1 Deshidratación de tejidos	37
4.7.2 Inclusión en parafina	37
4.7.3 Obtención de cortes	37
4.8. Tinción de Hematoxilina-Eosina	38
4.8.1 Obtención de imágenes	38
4.9. Inmunohistoquímica de diferentes citocinas de intestino	38
4.9.1 Obtención de imágenes	40
4.9.2 Cuantificación de la intensidad de señal	40
4.10 Análisis estadístico	41
V. Resultados y discusión	42
5.1 Número de parásitos en el intestino delgado	42
5.2 Expresión relativa de IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-10 en bazo	42
5.3 Morfología e integridad del intestino delgado	48
5.4 Patrón de expresión de citocinas en intestino	50
VI. Conclusiones	64
VII. Bibliografía	65
VIII. Anexos	69
Anexo A. Preparación de Soluciones	69
Anexo B. Lista de anticuerpos utilizados	72
Anexo C. Lista de figuras y tablas	73

RESUMEN

La influencia de las hormonas de la hipófisis anterior en el tracto gastrointestinal de humanos y animales ha sido reportada. La hipofisectomía en la rata produce atrofia de la mucosa intestinal, la reducción de la secreción gástrica y la absorción intestinal, así como una mayor susceptibilidad a las infecciones. Hasta donde sabemos, no existen estudios sobre la respuesta inmune del tejido linfoide asociado al intestino después de una hipofisectomía.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que ejerce la hipófisis sobre la respuesta inmune en una infección por *T. spiralis* a nivel intestinal en el hámster dorado.

Para ello se utilizaron hámsters dorados machos prepúberes que se dividieron en: intactos, infectados, sometidos a una cirugía simulada, hipofisectomizados (HPX), sometidos a una lobectomía hipofisaria anterior (LA) y sometidos a una lobectomía posterior (LP). Después de la cirugía fueron infectados con 1500 larvas de *Trichinella spiralis* por vía intragástrica, y a los 5 días PI fueron sacrificados. Se obtuvo el número de parásitos en el intestino delgado, una muestra del mismo se fijó en paraformaldehído al 4%, y fue procesado e incluido en parafina, obteniéndose cortes para tinción de hematoxilina y eosina, y otros usados para Inmunohistoquímica para IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-5, IL-13, IL-6, IL-4 e IL-10.

Los grupos con mayor resistencia fueron los sometidos a cirugía simulada y los carentes de LP, mientras que los grupos más dañados morfológicamente, HPX y LA, presentan mayor expresión de TNF α , IL-13, IL-4 e IL-12 y de IL-1 β e IFN- γ , respectivamente. Existe un efecto diferencial sobre la capacidad del hámster para controlar la infección por *T. spiralis* vía la respuesta inflamatoria local del intestino.

VIII. ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
Ac	Anticuerpo
CE	Células enterocromafines
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cdNA	DNA complementario al RNA mensajero (Ácido desoxirribonucleico complementario)
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
EtOH	Etanol
Fig.	Figura
g	Gravedad
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
HPX	Hipofisectomía total
ICC	Células Interciliales de Cajal
IFN γ	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
LA	Lobectomía hipofisaria anterior
LI	Larva infectante
LM	Larva muscular
LP	Lobectomía hipofisaria posterior
LRN	Larvas recién nacidas
M	Molar
μ g	Microgramo
μ m	Micrómetro
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
NaCl	Cloruro de Sodio
Ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
p.i.	Post infección
pb	Pares de bases

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena
s	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
TBE	Amortiguador Tris-borato-EDTA
T _m	Temperatura de fusión (temperatura a la que la mitad de las moléculas complementarias se encuentran unidas)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	T reguladoras
UI	Unidades Internacionales
5-HT	5-Hidroxitriptamina, también conocida como Serotonina

Símbolos

♂	Machos
α	Alfa
γ	Gamma

MARCO TEÓRICO

1.1 Hipófisis

1.1.1 Localización y anatomía

La hipófisis, también conocida como glándula pituitaria, es una glándula con forma de frijol, y debido a que controla el funcionamiento de la mayoría de las demás glándulas endocrinas, recibe el nombre de glándula maestra.

Se sitúa sobre la base del cráneo, en la parte superior del hueso esfenoides, la silla turca. No posee paredes óseas, sin embargo, la duramadre es la que se encarga de cerrar el habitáculo de la hipófisis, formando una especie de saco que está abierto en su parte superior, parte por la que se encuentra unida funcionalmente con el hipotálamo por medio del tallo hipofisario (Figura 1).

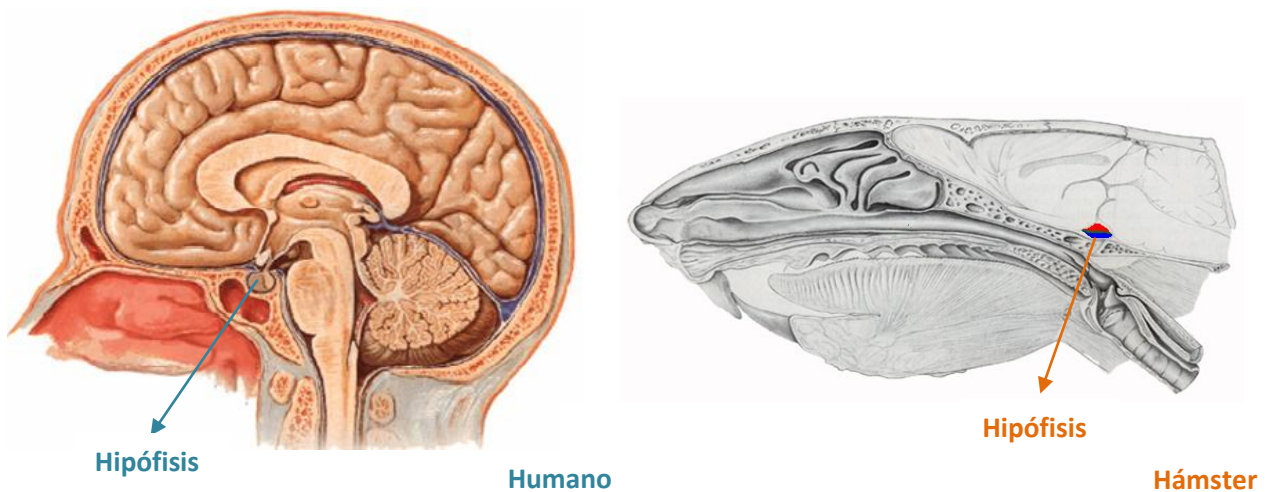


Figura 1. Localización de la hipófisis en el humano y en el hámster

La hipófisis se encuentra en la cavidad craneal, por debajo del hipotálamo. (Figuras aportadas por el Dr. Andrés Quintanar Stephano)

En el humano la hipófisis está formada por dos secciones anatómicas: el lóbulo anterior (también llamado adenohipófisis) y el lóbulo posterior (o conocido como neurohipófisis), mientras que en el hámster la glándula pituitaria se compone de tres lóbulos: el lóbulo anterior o adenohipófisis, que sintetiza y secreta hormona del crecimiento (GH, por sus siglas del inglés: Growth hormone), prolactina (PRL), hormona adrenocorticotropa (ACTH, del inglés: adrenocorticotropic hormone), la tirotrópina (TSH, por sus siglas en inglés: Thyrotrophin-stimulating hormone), hormona foliculoestimulante (FSH, por sus siglas en inglés: Follicle-stimulating hormone), y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés: Luteinizing hormone); el lóbulo intermedio, que sintetiza y secreta hormona estimulante de melanocitos (MSH, por sus siglas en inglés: melanocyte-stimulating hormones) y el lóbulo posterior o neurohipófisis, que almacena y libera hormonas hipotalámicas, la vasopresina (AVP, del inglés: arginine vasopressin) y la oxitocina. Anatómicamente, el lóbulo anterior está ligeramente unido al lóbulo intermedio, mientras que los lóbulos intermedio y posterior están estrechamente unidos entre sí, formando un solo lóbulo neurointermedio (Figura 2). La disposición anatómica de los lóbulos anterior y neurointermedio, el tallo hipofisario largo, y la eminencia media, permiten con relativa facilidad la realización de la hipofisectomía completa o la separación selectiva quirúrgica de los dos lóbulos pituitarios sin dañar las estructuras vecinas (Campos *et al.*, 2006).

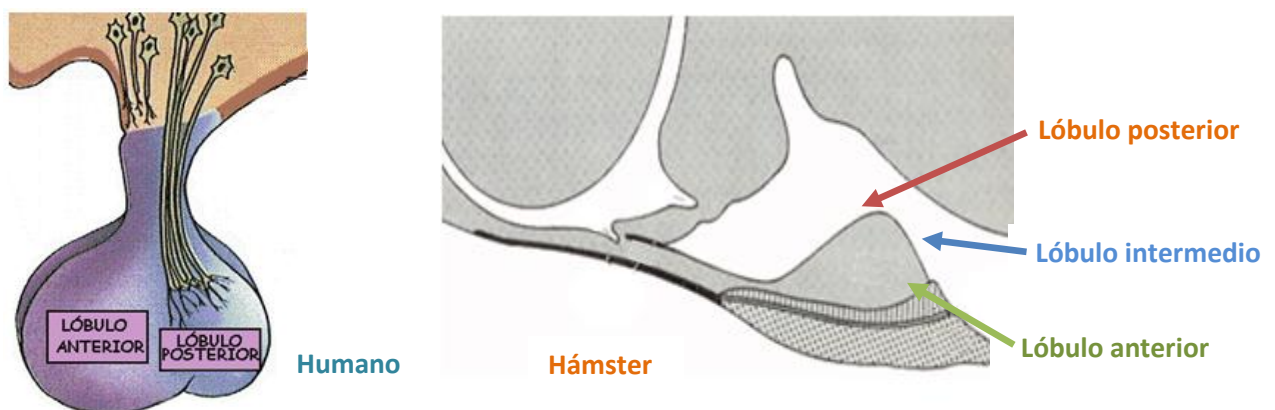


Figura 2. Anatomía de la hipófisis en el humano y en el hámster

En el humano la hipófisis se divide en lóbulo anterior y lóbulo posterior, mientras que en el hámster hay un lóbulo adicional, el lóbulo intermedio. (La figura correspondiente a la anatomía en el hámster fue aportada por el Dr. Andrés Quintanar Stephano).

En gran parte, la hipófisis controla el funcionamiento de las demás glándulas endocrinas, y asimismo es controlada por el hipotálamo, el cual controla las actividades de la adenohipófisis mediante la emisión de sustancias similares a hormonas; también controla a la neurohipófisis mediante impulsos nerviosos.

1.1.2 Hormonas hipofisarias

La adenohipófisis produce hormona del crecimiento, prolactina, hormona adenocorticotrópica, hormona estimulante de la tiroides, hormona folículoestimulante, hormona luteinizante; el lóbulo intermedio produce principalmente hormona estimulante de melanocitos; mientras que la neurohipófisis almacena vasopresina y oxitocina, que son producidas en el hipotálamo (Hernández *et al.*, 2010).

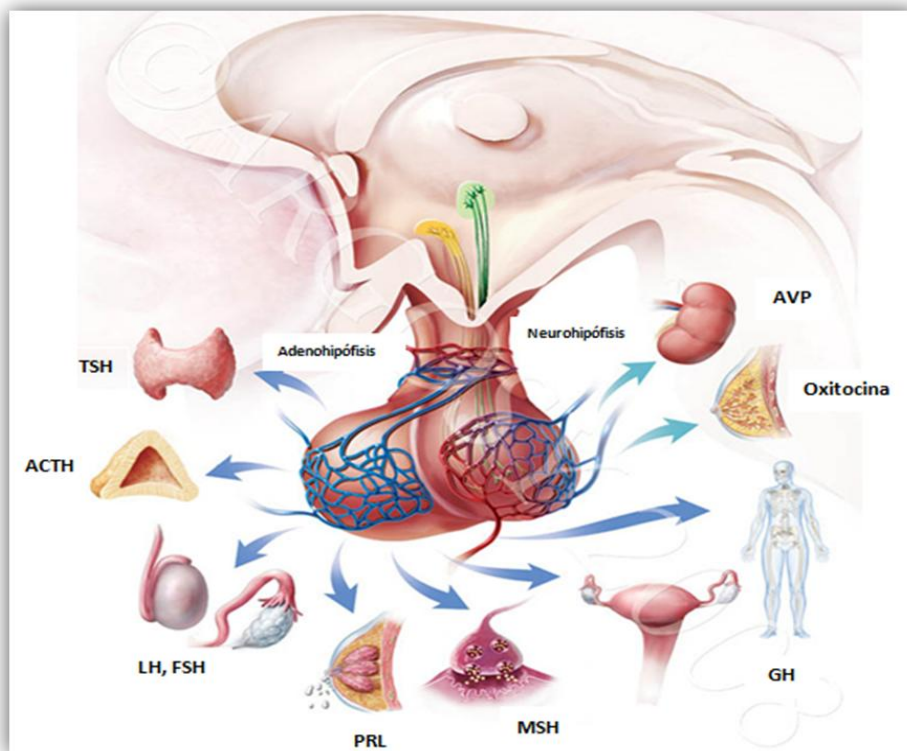


Figura 3. La hipófisis y su funcionamiento

La adenohipófisis produce hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona luteinizante (LH), hormona folículoestimulante (FSH), prolactina (PRL), hormona estimulante de melanocitos (MSH) y hormona de crecimiento (GH); mientras la neurohipófisis almacena vasopresina (AVP) y Oxitocina provenientes del hipotálamo (Obtenida y modificada de <http://to2qui.blogspot.com/2010/06/endocrinologia.html>)

En el Cuadro 1 se puede observar las hormonas hipofisarias provenientes de cada lóbulo de la hipófisis, así como la abreviatura correspondiente, su órgano blanco, y la función que cada hormona posee.

Cuadro 1. Hormonas hipofisarias

Donde se produce o almacena	Hormona	Abreviatura	Órgano blanco	Función
Adenohipófisis (producción)	Hormona estimulante del tiroides o tirotrófina	TSH	Glándula tiroides	Estimula la producción de las hormonas tiroideas
	Hormona adrenocorticotropa o adrenocorticotropina	ACTH	Glándula suprarrenal	Estimula las glándulas suprarrenales a secretar cortisol (cortisol en humanos, corticosterona en hámsters), y varios esteroides androgénicos, semejantes a la testosterona
	Hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante	LH, FSH	Ovarios, testículos	En las mujeres, estimulan la producción de estrógenos y de progesterona y la liberación mensual de un óvulo desde los ovarios (ovulación). En los varones, la hormona luteinizante estimula la producción de la testosterona en los testículos, y la hormona foliculoestimulante, por su parte, los estimula para que produzcan esperma
	Prolactina	PRL	Glándulas mamarias	Inicia y mantiene la producción de leche en la glándula mamaria
	Hormona de crecimiento	GH	Músculos y hueso	Controla el crecimiento y desarrollo. Promueve la producción de proteínas

Lóbulo intermedio	Hormona estimulante de melanocitos	MSH	Piel, ojos, cabello	En el humano estimula la síntesis de melanina dentro de los melanocitos
Neurohipófisis (almacenamiento)	Antidiurética o vasopresina	AVP o ADH	Riñón	Promueve la acumulación de líquidos por parte de los riñones y contribuye a retener la cantidad adecuada de agua. Junto con la aldosterona controla la presión arterial.
	Oxitocina		Útero y glándula mamaria	Contrae los músculos del útero y de los conductos de la glándula mamaria

Fuente: Cohen, B.J.; 2009.

1.1.3 Problemas relacionados con la hipófisis

Las enfermedades de la glándula pituitaria pueden conducir a la disfunción de los distintos ejes hormonales y de las manifestaciones clínicas correspondientes. La disfunción hipofisaria puede ser causada por una gran variedad de enfermedades que afectan a la glándula hipófisis y el hipotálamo y pueden producir manifestaciones clínicas principales, incluyendo coma pituitario (Hernández *et al.*, 2010). Los adenomas hipofisarios son probablemente mucho más comunes que como antes se suponía, su prevalencia es aproximadamente de 1 caso por cada 1000 personas (Daly *et al.*, 2007). Las causas conocidas de disfunción de la hipófisis incluyen tumores, hemorragia, cirugías y radioterapia. En los últimos años el déficit de los distintos ejes de la hipófisis después de un traumatismo en la cabeza ha llegado a ser reconocido como un problema clínicamente relevante (Petersenn *et al.*, 2010).

Debido a esta entidad recientemente apreciada, la prevalencia de la disfunción de la hipófisis es probable que sea mucho más alta que la estimada previamente de 0.5 por cada 1000 habitante (Schneider *et al.*, 2007). Una vez que los déficits hormonales han sido

diagnosticados, pueden ser tratados por suplementación, de modo que la calidad de vida del paciente se vuelve casi normal (Petersenn *et al.*, 2010). Los adenomas hipofisarios son neoplasias benignas asociadas con una morbilidad considerable debido a los efectos de masas, la sobreproducción hormonal y la insuficiencia hipofisaria. En adenomas hipofisarios no funcionantes (NFMA), la morbilidad es causada por los efectos de masa del tumor que conducen a defectos del campo visual, disminución de la agudeza visual y la insuficiencia hipofisaria en la mayoría de los pacientes. En funcionalidad de los adenomas de hipófisis, la morbilidad es causada por la sobreproducción hormonal, además de los efectos de masa tumoral en los casos de macroadenomas. En la enfermedad de Cushing, el exceso de cortisol causa obesidad central, resistencia a la insulina, hipertensión, hiperlipidemia y osteoporosis. Por otra parte, la sobreproducción de cortisol se asocia con mayor riesgo cardiovascular, continúa incluso después de la remisión de la enfermedad (Dekkers *et al.*, 2007).

El hipopituitarismo es la insuficiencia parcial o total de la secreción de hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis y puede deberse a una enfermedad hipotalámica o hipofisaria. Hay una incidencia reportada de 12 a 42 nuevos casos por millón, cada año, y una prevalencia de 300 a 455 por millón. Las manifestaciones clínicas dependen del grado de la deficiencia de la hormona y pueden ser no específicas, tales como fatiga, hipotensión, intolerancia al frío o pueden ser más indicativos como el retraso del crecimiento, en el caso a una deficiencia de GH. Un número de enfermedades inflamatorias, granulomatosas o neoplásicas, así como traumáticas o lesiones debidas a radiaciones involucran la región hipotálamo-hipófisis. Disfunciones gonadales inexplicables, anomalías del desarrollo craneofacial, el síndrome de la silla vacía y la hemorragia asociada al embarazo o los cambios de la presión arterial pueden estar asociados con un funcionamiento defectuoso de la adenohipófisis (Hernández *et al.*, 2010).

1.1.4 Papel inmunomodulador de las hormonas hipofisarias

Las hormonas hipofisarias no sólo actúan sobre sus órganos blancos, sino que también se ha reportado que pueden poseer efectos inmunomoduladores en determinadas enfermedades parasitarias.

Se ha reportado que el control del parasitismo por *Trypanosoma cruzi* en la fase aguda de la infección se considera extremadamente dependiente de la activación de los macrófagos por citocinas. Un experimento con ratas macho de la cepa Wistar infectadas con *Trypanosoma cruzi* y tratadas con GH mostró una reducción significativa de tripomastigotes en sangre durante la fase aguda de la infección en comparación con los animales no tratados. Las observaciones histopatológicas de tejido cardíaco revelaron que la administración de GH también resultó en una menor carga de amastigotes, así como de menor tamaño. Estos resultados mostraron que la GH puede ser considerada como una sustancia inmunomoduladora para controlar la replicación del parásito, y en combinación con el fármaco comúnmente utilizado puede representar en el futuro una nueva herramienta terapéutica para reducir los efectos nocivos de la enfermedad de Chagas (Frare *et al.*, 2009).

La PRL mantiene una marcada interacción bidireccional con el sistema inmunológico: estimula la proliferación linfocitaria, estimulando de este modo la respuesta inmunitaria, mientras que sus propias acciones biológicas se hallan bajo el control de citocinas capaces de modificar la concentración plasmática de PRL. Estos efectos recíprocos implican la presencia de receptores específicos para PRL, presentes en la membrana celular de numerosas clases de linfocitos y células accesorias (Sandoval *et al.*, 1997; Clevenger *et al.*, 1998). En 2008 Dzitko, Malicki y Komorowski reportaron que un alto nivel de PRL (>86 ng/ml) puede ser uno de los factores importantes para prevenir la infección por *Toxoplasma gondii* en las mujeres (Dzitko *et al.*, 2008).

1.2 *Trichinella spiralis*

Los parásitos gastrointestinales incluyen a los agentes infecciosos más importantes en términos de su prevalencia global y su habilidad de causar enfermedades. Además de sus efectos dañinos en humanos, los parásitos gastrointestinales son responsables de extensas enfermedades y pérdidas económicas en animales domésticos. Entre los parásitos gastrointestinales, las infecciones por nemátodos tienen una gran prevalencia, infectando a millones de personas en el mundo entero, particularmente en los países en desarrollo.

Trichinella spiralis es un nemátodo que puede infectar a todos los mamíferos, y la enfermedad que produce, junto con las demás especies del género *Trichinella*, se denomina triquinelosis, o triquinosis, la transmisión de la enfermedad se debe al consumo de carne infectada conteniendo larvas infectantes de ese nematodo.

1.2.1 Clasificación taxonómica de *Trichinella spiralis*

James Paget, estudiante del primer año de medicina, en el Hospital San Bartolomé de Londres, observó en los músculos de un hombre muerto por tuberculosis “el gusano en su cápsula”. El zoólogo británico Richard Owen estudió porciones de músculo del caso de Paget y describió al parásito, al cual denominó *Trichina spiralis* en 1837 (Owen, 1835).

En el año de 1895, Railliet sugirió cambiar el nombre del género de *Trichina* a *Trichinella*, debido a que el primero había sido dado a otro organismo (Railliet, 1895).

La taxonomía de *Trichinella spiralis* es:

Reino: *Animalia*, Phylum: *Nematoda*, Clase: *Adenoforea*, Orden: *Enoplida*, Familia: *Trichinellidae*, Género: *Trichinella*, Especie: *spiralis* (Poizio et al., 1992).

1.2.2 Morfología general

Trichinella spiralis tiene una forma cilíndrica y delgada, pudiéndose identificar tres estadios: adulto (hembras y machos), larva recién nacida (LRN) y larva muscular (LM) o larva infectante (LI); presentando cada estadio características morfológicas específicas. Cuando se encuentra encapsulada en el músculo es capaz de inducir la formación de una cápsula de colágena, y a dicha estructura, junto con el miocito infectado que la formó, se le conoce como célula nodriza.

Hembras adultas

Las hembras miden aproximadamente 3 mm de largo por 30 a 36 μm de ancho. La porción anterior termina en una punta y la posterior es más ancha, la vulva se abre en un cuartil de distancia del extremo anterior, en la porción ventral; la vagina se extiende en la parte posterior hasta el útero, que contiene en su porción anterior larvas y huevos; en la región posterior atrás del útero y cerca de la abertura anal, se encuentra el ovario (Moreno *et al.*, 2004).



Figura 4. Hembra adulta de *Trichinella spiralis*

Mide aproximadamente 3 mm de largo por 30 a 36 μm de ancho, en la hembra grávida la porción anterior del útero contiene numerosas larvas en etapas diversas de desarrollo; mientras que en la parte posterior contiene huevos también en grados diversos de desarrollo. (Obtenida y modificada de <http://www.trichinella.org>)

Larvas recién nacidas

Las LRN miden aproximadamente 0.08 a 0.12 mm de longitud y 6 μm de ancho, son solo un estado no-intracelular y existen como organismos que nadan libremente dentro del lumen de los vasos sanguíneos y linfáticos. La larva recién nacida presenta un pequeño espolón cefálico, un estilete bucal y un esticosoma formado por 30 a 40 esticocitos que contienen gránulos de distinto tamaño cuya importancia radica en su poder antigénico al ser excretados.

Machos adultos

Los machos miden entre 1.4 a 1.6 mm de longitud por 40 a 60 μm de ancho, se le identifica un cuerpo cuticular o cutícula abierta, abertura oral, anillo nervioso, esticosomas, que forman un largo esófago moniliforme, también poseen un intestino medio, intestino grueso y cloaca en la última porción, vesículas seminales, además de dos pares de papilas genitales o cloacales, tiene un solo testículo, por lo que es monorquideo y con espermatozoides no flagelados de 2 a 3 cromosomas (De la Rosa *et al.*, 2004).

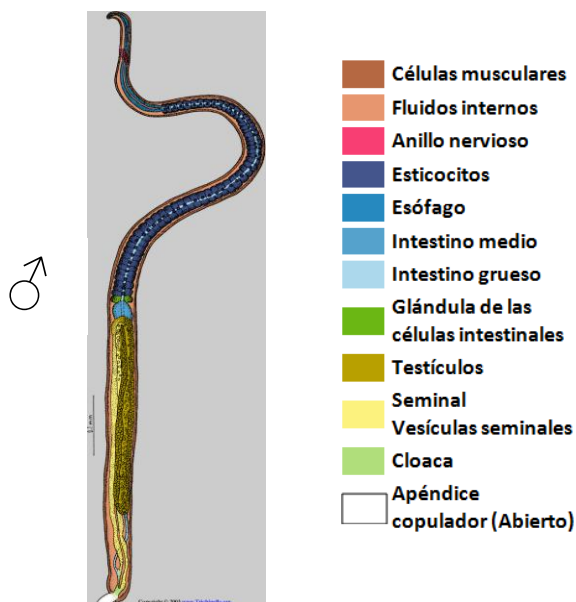


Figura 5. Macho adulto de *Trichinella spiralis*

Los machos de *Trichinella spiralis* son más pequeños que las hembras, ya que miden entre 1.4 a 1.6 mm de longitud por 40 a 60 μm de ancho. Tienen un solo testículo que ocupa la mitad posterior de la cavidad del cuerpo. (Obtenida y modificada de <http://www.trichinella.org>)

Larvas Musculares

Las larvas musculares son hialinas, se encuentran enrolladas en espiral en lo que se conoce como célula nodriza, que mide de 300 a 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho, del enrollamiento típico de la larva se deriva el nombre específico; tiene vaina elipsoidal que las cubre, su eje longitudinal es paralelo a las fibras musculares.

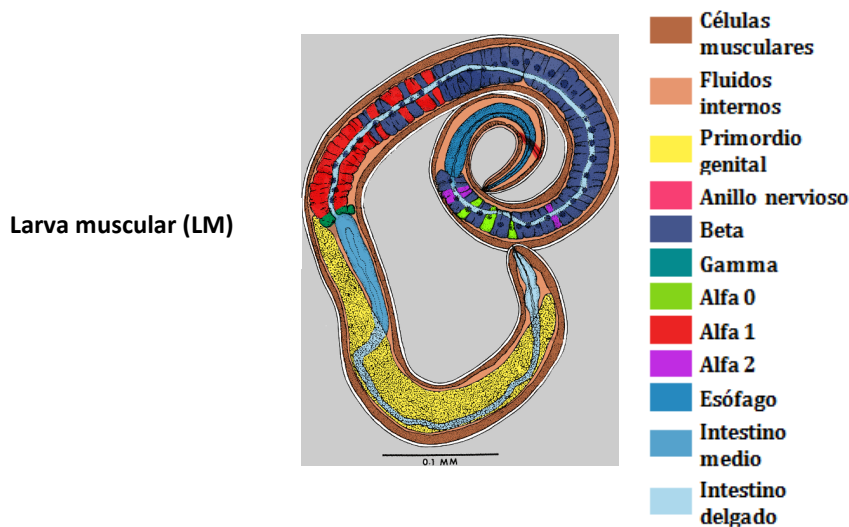


Figura 6. Larva muscular de *Trichinella spiralis*

Miden de 300 a 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho, se encuentran dentro de la célula nodriza, y debido a su forma enrollada es que le dio el nombre al género *spiralis*. (Obtenida y modificada de <http://www.trichinella.org>)

Célula nodriza

La célula nodriza está constituida por una membrana interna procedente de la fibra muscular invadida y una membrana externa homogénea y hialina, derivada del sarcolema y sobre la superficie se forma una red capilar, el tamaño de los quistes varía con la especie del hospedero; en el ratón es de 0.23 por 0.13 mm, mientras que en el hombre mide 0.4 por 0.26 mm aproximadamente. La célula nodriza es una consecuencia exclusiva de la

asociación de la célula hospedera con la larva muscular de *Trichinella spiralis*; su función es alimentar a la larva, así como de protegerlo de las respuestas inmunitarias del hospedero. La célula nodriza madura es morfológicamente distinta de cualquier tipo de célula de mamífero, sin otra condición patológica induce una célula radicalmente diferente y funcional. El complejo de célula nodriza y el parásito puede sobrevivir en el hospedero humano durante un máximo de 30 años y en la mayoría de otras especies de mamíferos (www.trichinella.org).

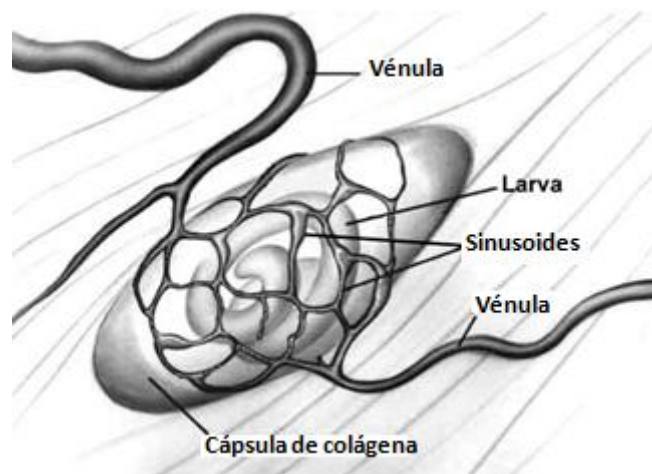


Figura 7. Célula nodriza de *Trichinella spiralis*

Poseen la capacidad de ser angiogénicas, forman una cápsula de colágena, albergando dentro una larva. (Obtenido y modificado de http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm)

1.2.3 Reproducción y ciclo de vida

El ciclo de vida de *Trichinella spiralis* (Figura 8) comienza una vez que el hospedero, siendo los mamíferos la mayoría de los que se han reportado como hospederos, y entre ellos el humano, consume carne cruda o mal cocida, en donde están presentes las larvas musculares viables, en la célula nodriza correspondiente. Una vez que llegan al estómago, los ácidos gástricos favorecen la liberación de las LM de su célula nodriza, liberando de ésta manera a los parásitos, mismos que son resistentes a los ácidos y pasan al intestino

delgado, perforando las células columnares epiteliales, una vez ahí sufren 4 mudas de cutícula para diferenciarse entre machos y hembras y alcanzar su estado sexualmente maduro. Ya que se encuentran en el intestino, hembras y machos copulan, las hembras quedan grávidas. Durante este proceso la respuesta inmunitaria innata del hospedero se hace presente: se aumenta la peristalsis intestinal, ocasionando diarrea en los primeros días de la infección para poder eliminar al mayor número de parásitos posibles. Hasta este punto se considera que se ha llevado a cabo la fase entérica de la infección, en donde ya que se cuenta con hembras grávidas, al cabo de 7 días pasan por un proceso de larviposición, las larvas recién nacidas (LRN) penetran a través de las microvellosidades, la difusión se realiza a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo, y una vez ahí pueden diseminarse por todo el cuerpo: si llegan a el SNC producen lo que se conoce como neurotriquinelosis y si lo hacen en corazón producen miotriquinelosis. Sin embargo, las LRN tienen tropismo por el músculo estriado, así que llegan hasta él y penetran en la primera célula que encuentren, empiezan a formar su cápsula de colágeno, y ya que poseen propiedades angiogénicas, empiezan a formar una red de capilares, con la finalidad de seguir nutriendo a la célula. La fase parenteral abarca desde la migración de las larvas que liberan las hembras hasta su establecimiento en el músculo estriado. Una vez formada la célula nodriza, el parásito jamás abandona al hospedero, sólo que esa carne sea consumida por un nuevo hospedero, el ciclo de vida se vuelve a presentar.

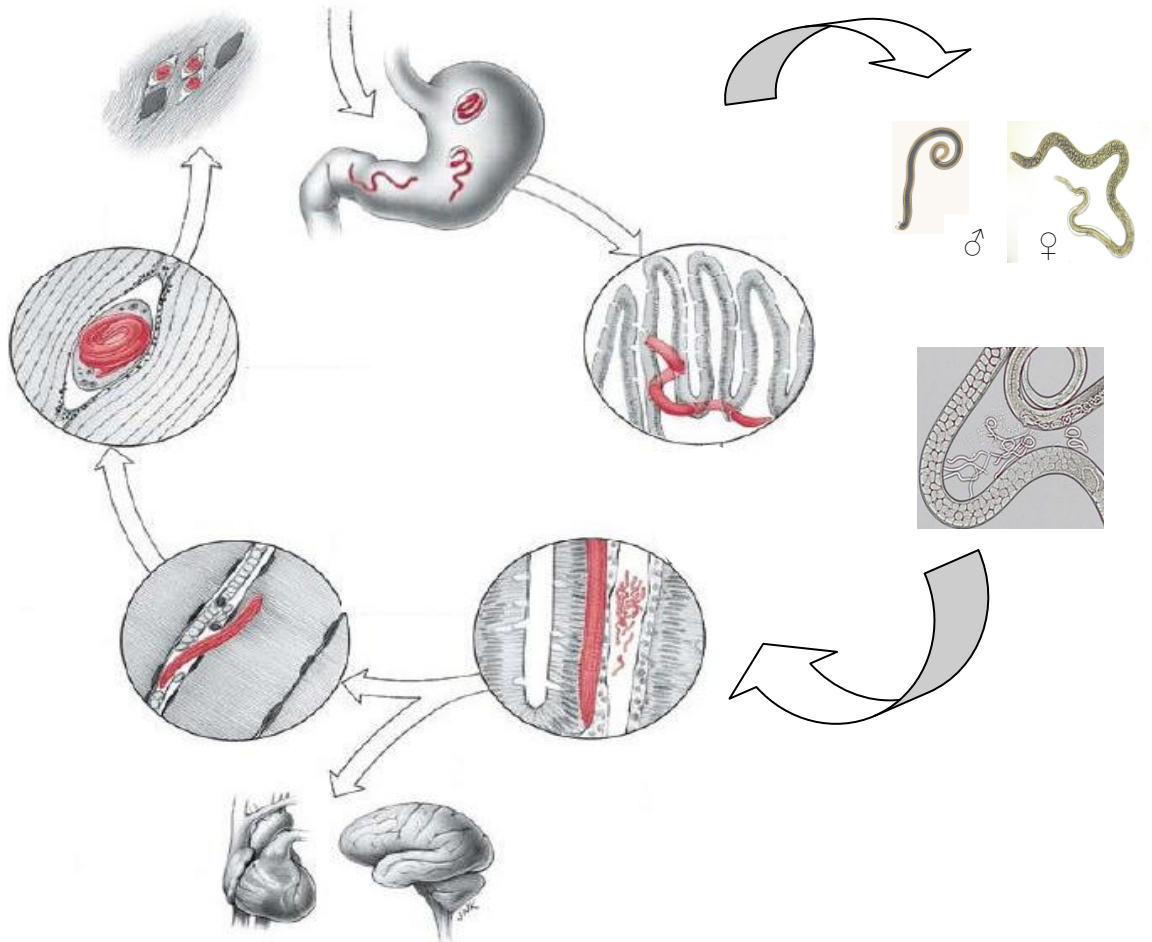


Figura 8. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

Una vez que el hospedero come carne infectada, los parásitos llegan al estómago y se liberan de su célula nodriza, migran al intestino, se desarrollan a su fase adulta, machos y hembras se aparean, quedando las hembras grávidas. Cuando se da el proceso de larviposición, las LRN migran hacia el torrente sanguíneo y llegan al músculo estriado, invadiendo un miocito por larva, formándose la célula nodriza correspondiente, y el ciclo se repite si esta carne es comida por otro hospedero. (Obtenido y modificado de <http://www.trichinella.org/>)

1.2.4 Respuesta inmunológica ante la triquinelosis aguda

Una vez que las larvas musculares, contenidas en la carne cruda o mal cocida, llegan al estómago, se liberan de su respectiva célula nodriza y migran hacia el intestino delgado.

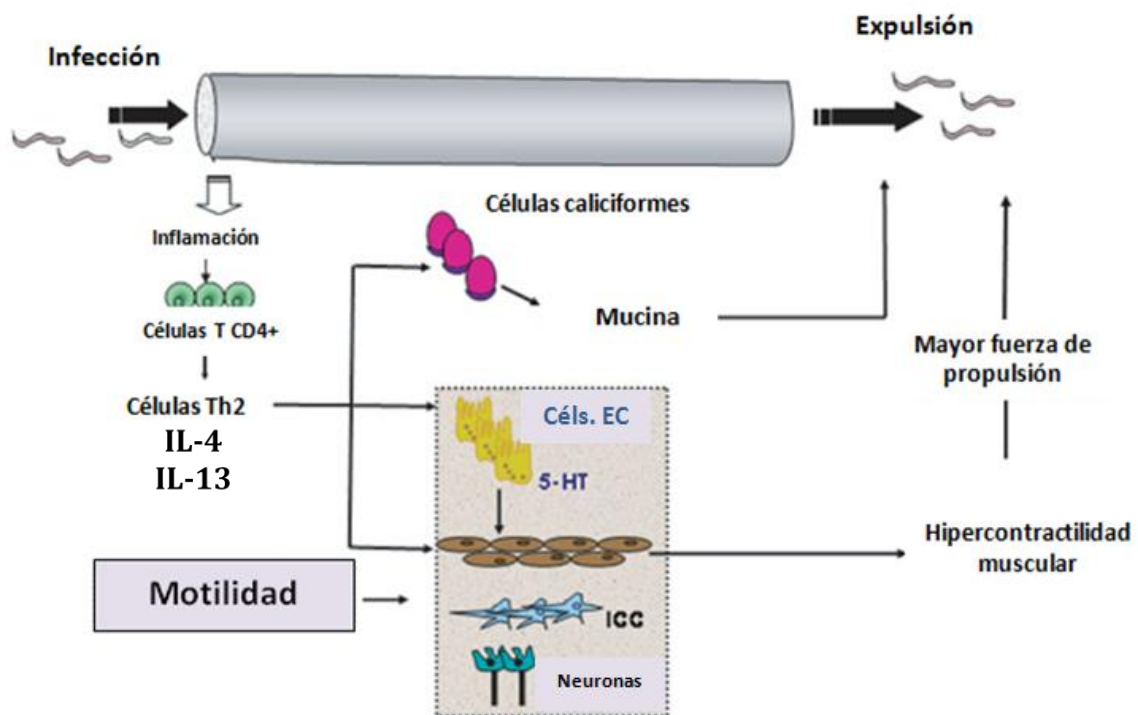


Figura 9. Respuesta inmunológica ante la triquinelosis a nivel intestinal

La infección con *Trichinella spiralis* produce inflamación de la mucosa, activándose una respuesta inmune tipo Th2, la cual induce una mayor producción de mucina, asimismo aumenta la contractilidad del músculo intestinal, creando cambios en otros componentes del aparato de la motilidad, como las CE (células enterocromafines) que secretan más serotonina (5-HT), también intervienen las CCI (células intersticiales de Cajal) y neuronas motoras, creando una mayor fuerza de propulsión que ayuda a expulsar más parásitos. (Obtenida y modificada de W. I. KHAN, 2008)

La infección con *Trichinella spiralis* produce inflamación de la mucosa y activa la respuesta inmunitaria de tipo Th2, siendo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 las interleucinas que se sabe que actúan durante la infección. La respuesta de tipo Th2 induce una alza en la producción por parte de las células caliciformes de mucina, la cual puede desempeñar un

-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----

papel importante en la defensa del hospedero durante la infección por *Trichinella spiralis*, al ser un medio para desalojar a los parásitos, ya sea atrapándolos en el moco, inhibiendo la motilidad del parásito y su alimentación, de tal modo que lo excluyen de su nicho, favoreciendo su expulsión. Las citocinas del tipo Th2 también inducen cambios en otros componentes de la motilidad intestinal, como las células enterocromafines (Céls. EC) que producen serotonina, también conocida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), la cual actúa sobre las células musculares a través de sus receptores, activando reflejos peristálticos, las células intersticiales de Cajal (ICC, del inglés Interstitial cell of Cajal) coordinan la motilidad gastrointestinal, y las neuronas motoras estimulan las células musculares del intestino; todas estas células aumentan la contractibilidad muscular, así como la fuerza de propulsión, con lo que se permite expulsar a los parásitos (Khan *et al.*, 2008).

Se ha reportado que en ratones, una eosinofilia, una producción de IgE y la hiperplasia de mastocitos son conocidos como las tres características de una respuesta inmunológica que se desencadena por parásitos nemátodos gastrointestinales, en particular a la infección por *Trichinella spiralis* (Else y Finkelman, 1998). En primer lugar, una importante inflamación eosinofílica se induce durante la infección por el nematodo *T. spiralis* y hay un gran incremento en los niveles de IL-5, una de las citocinas de tipo Th2 responsable de la producción de eosinófilos (Suzuki *et al.*, 2008).

1.2.5 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación (desde que la larva entra en el organismo hasta que aparece la enfermedad) es de unos 10 días. La infección puede durar de 10 días a un mes.

Los síntomas gastrointestinales pueden ocurrir durante la primera semana (días 2-7) después de la ingestión e incluyen náuseas, dolores abdominales, anorexia, vómitos, y diarrea o estreñimiento.

Las manifestaciones sistémicas se presentan en la semana siguiente (días 9 a 28), debido a la diseminación de las larvas recién nacidas, provocando síntomas de fiebre, mialgias,

conjuntival y hemorragias en astilla, y edema periorbital (El-Beshbishi 2011; Kociecka 2000; Pozio *et al.*, 2003).

La invasión muscular puede causar mialgias, hinchazón y debilidad, la presencia y la severidad de estos síntomas están relacionadas con el número de larvas por gramo de músculo; menos de 10 larvas/g de músculo a menudo son asintomáticos, mientras que los niveles mayores a 50 larvas/g generalmente están asociados con síntomas musculares.

La miositis se produce inicialmente en los músculos extraoculares, seguido de los maseteros y los músculos del diafragma, el cuello y la laringe, así como los músculos estriados de las extremidades (Capo y Despommier, 1996).

1.2.6 Diagnóstico

El diagnóstico en humanos se fundamenta en la anamnesis, el cuadro clínico y los datos de laboratorio.

Se debe de hacer una anamnesis, el diagnóstico definitivo es encontrar a las larvas musculares en una biopsia muscular; mientras que el diagnóstico clínico se apoya en métodos auxiliares de laboratorio como la serología, así como hallazgos de laboratorio como hipereosinofilia, IgE total, y niveles de enzimas musculares elevados que pueden ayudar en el diagnóstico, para lo que se utilizan diferentes técnicas como enzimoimmunoanálisis (EIA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o Western blot (WB). Pruebas como ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para determinar la presencia de anticuerpos ayudan a mejorar el diagnóstico,

En México, en el apartado 8.5 de la Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004 están las especificaciones para la detección de *Trichinella spiralis* en establecimientos dedicados al sacrificio de ganado porcino y equino, en donde explica que se debe de tomar mensualmente dos muestras por canal de equino o porcino, de un tamaño mínimo de 3 cm², procedentes de ambos pilares del diafragma en su paso a la porción tendinosa y depositarlas en recipientes limpios y con tapadera, debidamente identificados conforme a la canal, y enviarlas a un laboratorio de pruebas autorizado por la SSA para la

-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----

determinación correspondiente, el cual por medio de un proceso de digestión artificial con agitación magnética, en una solución de pepsina y solución de ácido clorhídrico concentrado en proporción de 1:19 en la que el jugo gástrico digiere eficazmente el tejido muscular y la membrana del quiste, permitiendo la liberación de las larvas del parásito, expresando como resultado si hay ausencia o presencia de *Trichinella sp.*(Obtenido en <http://www.salud.gob.mx>)

1.2.7 Tratamiento

El tratamiento médico incluye antihelmínticos (mebendazol o albendazol) y glucocorticoides. El mebendazol se administra generalmente en dosis diarias de 5 mg / kg. El albendazol se utiliza en una cantidad de 800 mg / día (15 mg / kg / día), administrado en dos dosis. Estos medicamentos se deben tomar durante 10-15 días. El uso de mebendazol o albendazol está contraindicado durante el embarazo y no se recomienda en niños menores de 2 años. El esteroide más comúnmente utilizado es la prednisolona, que puede aliviar los síntomas generales de la enfermedad, se administra en una dosis de 30-60 mg / día durante 10-15 días. (Dupouy *et al.*, 2002)

1.2.8 Importancia médica y veterinaria

La triquinelosis ha sido un problema de salud pública por más de 150 años y es por eso que en muchos sectores no se le considera como una zoonosis emergente. Sin embargo, su reaparición, en muchas zonas de todo el mundo durante los últimos 20-30 años, a pesar de muchos esfuerzos por parte del sector de la salud pública veterinaria para controlar y erradicar a la triquinelosis, se justifica el hecho de que hoy en día se considera como una enfermedad reemergente. Las razones para este resurgimiento son diversas, e incluyen la perturbación humana y la manipulación de los ecosistemas, la guerra y la agitación política, que cambia rápidamente la distribución de alimentos y sistemas de comercialización, e incluso, sorprendentemente, el aumento de la riqueza en los países en desarrollo (Murrell *et al.* 2000).

1.2.9 Prevalencia de la triquinelosis

De acuerdo con la International Commission on Trichinellosis, diez millones de personas podrían estar infectadas con *Trichinella spiralis* en todo el mundo, sin embargo se considera que esta cifra está subestimada, ya que, como ya se ha mencionado, dentro de las manifestaciones clínicas se presenta diarrea, y esto puede ser confundido con algún otro padecimiento causado por otro parásitos gastrointestinal o de tipo bacteriano, además de que no es una enfermedad que suele diagnosticarse de rutina.

En México se han informado casos y brotes epidémicos aislados y en general se considera una enfermedad con baja prevalencia (0.1 por 100 mil habitantes), pero con una mortalidad potencial. (International Commission on Triquenellosis).

1.3 Interacción neuroinmunoendocrina

El sistema inmunológico es un sistema homeostático que contribuye a mantener la constancia de los componentes moleculares y celulares del organismo. Las células del sistema inmunitario pueden detectar la presencia de antígenos extraños o la alteración de auto-componentes y enviar información al sistema nervioso central (SNC) sobre este tipo de perturbaciones, el cual actúa como órgano receptor sensorial. El cerebro puede responder a estas señales mediante la emisión de señales neuro/endocrinas que puedan afectar a la reactividad inmunológica. Así, el sistema inmunológico, como los otros sistemas fisiológicos, está bajo el control del cerebro. En condiciones de enfermedad, el sistema inmunitario puede, dentro de límites definidos, restablecer el cerebro integrando mecanismos neuroendocrinos con el fin de favorecer los procesos inmunológicos a expensas de otros sistemas fisiológicos (Besedovsky *et al.*, 2011).

La interacción multidireccional entre los sistemas nervioso, endocrino, y el sistema inmunitario en la salud y en el curso de enfermedades inflamatorias y las enfermedades infecciosas han sido establecidas. Hay señales del sistema nervioso central (SNC) al sistema inmunitario a través de vías hormonales y neuronales, mientras que las señales del sistema inmunitario en el SNC son a través de diversas citocinas.

El SNC regula el sistema inmunitario a través de las hormonas pituitarias, principalmente la GH y PRL, que son inmunoestimulantes, y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA, por sus siglas en inglés *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis*), que inhibe la respuesta inmunitaria y actúa como un inmunomodulador, inmunosupresor. Mientras que la mayoría de la información con respecto a estas interacciones está relacionada con la respuesta inmunitaria sistémica, se sabe mucho menos acerca de las interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis, y las reacciones inmunológicas gastrointestinales (Campos *et al.*, 2006).

Los sistemas inmunológico y neuroendocrino comparten muchos receptores, citocinas, hormonas peptídicas y neurotransmisores como medios moleculares de comunicación, y por lo tanto, hablan un mismo lenguaje bioquímico. Así mismo, es indiscutible que las respuestas inmunológicas alteran las funciones neuroendocrinas, y a su vez, el sistema neuroendocrino regula el sistema inmunológico. Por lo tanto, las interacciones entre los sistemas inmunológico y neuroendocrino son bidireccionales. Estas interacciones pueden ocurrir a través de la inervación directa de compartimentos linfoides, en forma paracrina a través de la liberación de mediadores por los nervios situados próximos a las células del sistema inmunológico (o viceversa), y por la acción endocrina de diversas hormonas y citocinas. La Neuroendocrinoinmunología es la ciencia que estudia las influencias del sistema neuroendocrino sobre la función inmunológica (neuroinmunomodulación) y las influencias del sistema inmunológico sobre la función neuroendocrina.

Desde hace mucho tiempo se ha atribuido al sistema inmunológico la función de defensa frente a las lesiones causadas por agentes extraños (infecciosos, físicos, químicos, e incluso células propias que han sufrido transformación). Sin embargo, erróneamente suele no considerarse al sistema neuroendocrino como protagonista de los mecanismos de defensa. El estudio de la Inmunología requiere pues, considerar la función del sistema inmunológico dentro del amplio contexto de la fisiología humana, fundamentalmente de la neuroendocrinología (Chirinos *et al.*, 1996).

II. Resumen del marco teórico

La hipófisis juega un papel importante en la homeostasis, mediante la secreción de hormonas, que a su vez regulan diversas funciones en el organismo; además se ha reportado que algunas de estas hormonas poseen propiedades inmunomoduladoras.

Las enfermedades parasitarias gastrointestinales tienen una alta prevalencia a nivel mundial, lo cual representa problemas en la calidad de vida de los humanos, así como pérdidas económicas en el sector veterinario; siendo la triquinelosis una enfermedad zoonótica que actualmente se considera como reemergente.

La red neuroinmunoendocrina ejerce efectos sobre la susceptibilidad o resistencia a las infecciones parasitarias, en este trabajo se abordará el papel que tiene la hipófisis sobre la respuesta inmunológica durante la infección aguda por el nematodo *Trichinella spiralis*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La hipófisis regula la respuesta inmunológica, por lo tanto la ausencia de la misma modificará el establecimiento, así como el curso de la infección por *Trichinella spiralis* a nivel intestinal.

3.2 OBJETIVO GENERAL

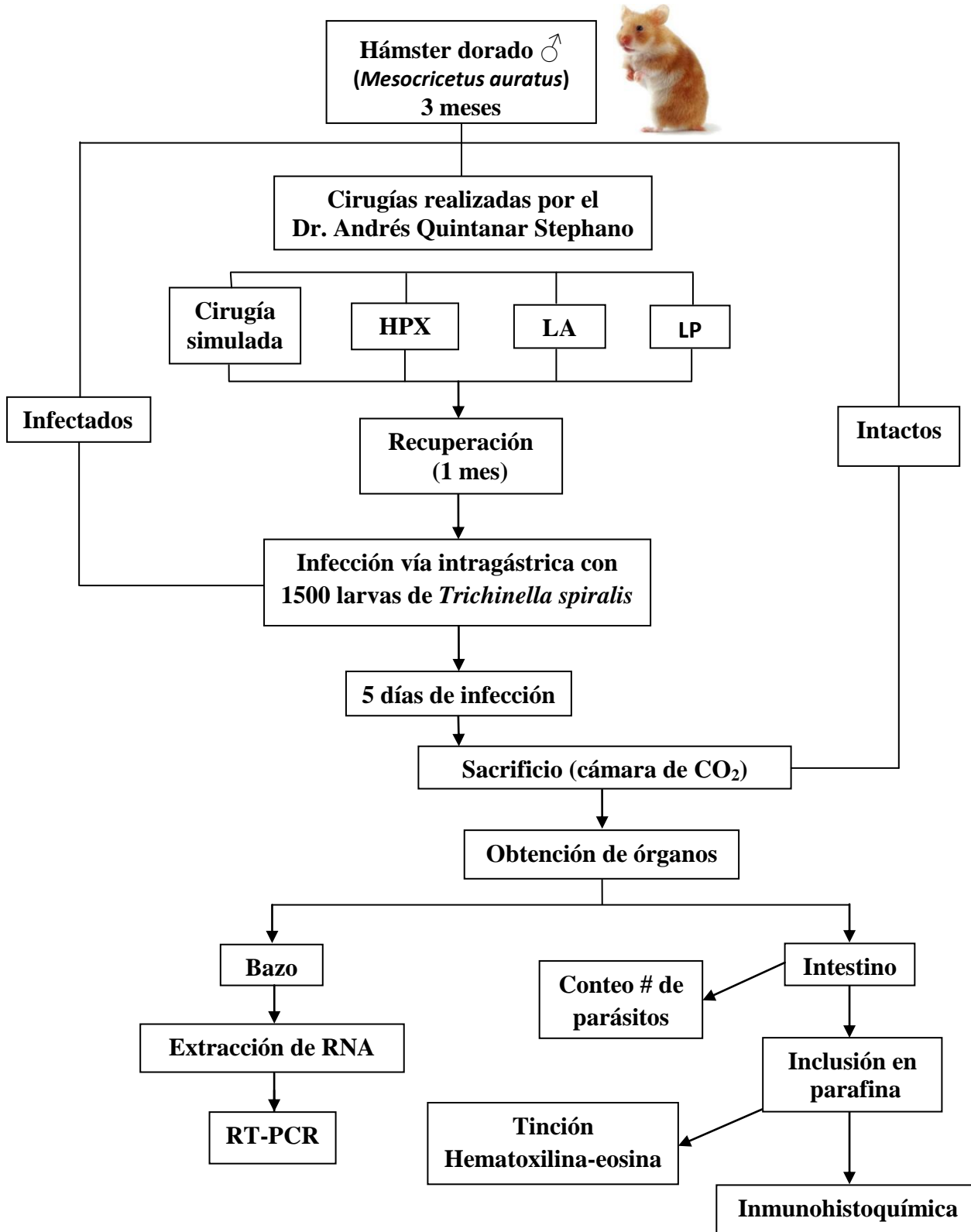
Determinar el efecto que ejerce la hipofisectomía total o parcial sobre la respuesta inmunológica en la infección por *Trichinella spiralis* a nivel intestinal en el hámster dorado.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Medir las cargas parasitarias en los animales infectados, los sometidos a cirugía simulada, y en los hipofisectomizados (HPX), los carentes de lóbulo anterior (LA) y lóbulo posterior (LP).
- ✓ Describir el perfil de expresión de TNF- α , IL-6 e IL-10 en el bazo de los animales intactos, infectados, los sometidos a cirugía simulada, hipofisectomizados (HPX), los carentes de lóbulo anterior (LA) y lóbulo posterior (LP) por RT-PCR.
- ✓ Estudiar la morfología e integridad en el intestino de los animales intactos, infectados, los sometidos a cirugía simulada, hipofisectomizados (HPX), los carentes de lóbulo anterior (LA) y lóbulo posterior (LP) por medio de tinción de Hematoxilina-Eosina.
- ✓ Observar el perfil de expresión de citocinas en el intestino de los animales intactos, infectados, los sometidos a cirugía simulada, hipofisectomizados (HPX), los carentes de lóbulo anterior (LA) y lóbulo posterior (LP) mediante Inmunohistoquímica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general que se llevó a cabo se puede apreciar en el siguiente diagrama de flujo:



4.1 Material biológico

Se utilizaron 60 hámsters dorados de Siria machos (*Mesocricetus auratus*), de 12 semanas de edad, y de aproximadamente 120 gr de peso. El cuarto de los animales estuvo bajo control de temperatura (22-24°C) y condiciones de luz-oscuridad (luz entre 0700-1900 hrs). La dieta consistió de Purina Diet 5015 y agua *ad libitum*. Después de las microcirugías, la dieta de los animales fue complementada con galletas de sabor, rebanadas de manzana y azúcar al 5% en el agua potable.

Los animales fueron habituados a las condiciones del bioterio al menos 7 días antes de la cirugía, y tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, y a la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, la cual es compatible con las normas de la ILAR (EE.UU.) de 1996.

Después de realizadas las microcirugías, los animales fueron trasladados al Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, el cuidado y las prácticas experimentales se llevaron a cabo bajo las normas internacionales del cuidado y manejo de animales de experimentación.

4.1.1 Grupos experimentales

Cuando se realiza la microcirugía y se pretende extirpar el lóbulo posterior, al hacer la aspiración del mismo, también se aspira el lóbulo intermedio, es por ello que a esa microcirugía se conoce como lobectomía hipofisaria neurointermedia, pero para fines prácticos se describe a la misma como lobectomía posterior (LP), mientras que a la lobectomía hipofisaria anterior se denominó lobectomía anterior (LA). Por las razones antes mencionadas, los animales destinados para microcirugía e infección fueron divididos de la siguiente manera: infectados, los sometidos a cirugía simulada, hipofisectomizados (HPX), los carentes de lóbulo anterior (LA) y lóbulo posterior (LP), todos éstos grupos se

infectaron con *Trichinella spiralis*, además se contó con un grupo adicional, que se utilizó como control intacto, tanto de cirugía como de infección.

El grupo de cirugía simulada fue tomado en cuenta para poder observar si el hecho de someter al animal al estrés de la cirugía influye en los resultados.

4.2 Microcirugías

Las microcirugías fueron realizadas por el Dr. Andrés Quintanar Stephano, del Departamento de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Las microcirugías se realizaron de la siguiente manera:

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40mg/kg de peso) y debido a que se hace una incisión parafaríngea la tráquea fue canulada por vía oral para permitir que los animales pudieran respirar. Quince minutos antes de la anestesia los hámsters fueron administrados con 0.06 mg de atropina vía subcutánea para prevenir la secreción excesiva de las vías respiratorias. Se rasuró el área del cuello, se frotó una gasa humedecida con alcohol al 70% y con un bisturí se hizo una pequeña incisión parafaríngea. Los músculos estriados (hioides) del cuello se hicieron a un lado con ayuda de unos separadores curvos de liga para que se hiciera visible la base del cráneo. Los grupos cirugía simulada, HPX, LA y LP fueron realizados utilizando un microscopio de disección. Se utilizó un taladro dental para hacer un agujero pequeño en el cráneo y así poder visualizar la glándula pituitaria, la cual está cubierta con una membrana fina, misma que se quitó con ayuda de una aguja para liberar a la glándula (Figura 10 A). En los animales de cirugía simulada la operación se dio por concluida cuando la cápsula se abrió quirúrgicamente y la glándula pituitaria se pudo visualizar directamente (Figura 10 B). En el caso del grupo HPX, la glándula completa fue aspirada con vacío. Para el grupo LA la cápsula pituitaria se abrió ampliamente, y la adenohipófisis fue cortada en dos mitades, y luego cada mitad fue aspirada con vacío cuidadosamente, por lo tanto, el lóbulo posterior, el tallo infundibular y la eminencia media hipotalámica se mantuvieron intactos (Figura 10 C). Para el grupo LP, para poder visualizar la neurohipófisis, el borde posterior de la cápsula de la hipófisis se

cortó y el borde caudal de la glándula se levantó, después de una vista directa de la neurohipófisis, se aspiró cuidadosamente con una aguja curva especial (Figura 10 D). Después de lo antes mencionado se colocó cera para hueso en el orificio y se suturó con un hilo hecho a base de ácido poliglicólico.

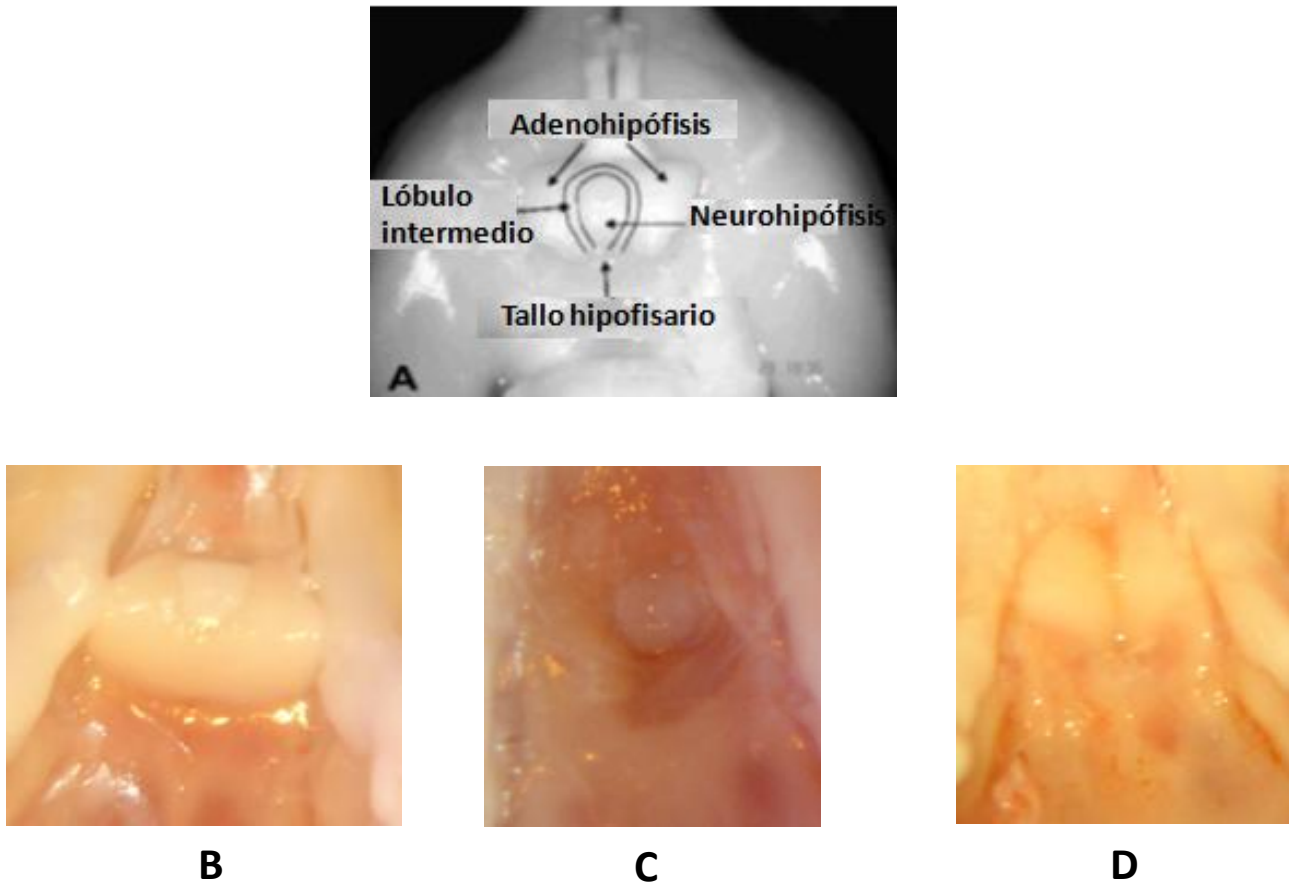


Figura 10. Anatomía de la hipófisis del hámster y como luce después de la microcirugía. (A) Vista al exponer la hipófisis completa. (B) Grupo Cirugía simulada, la hipófisis es expuesta y se procede a suturar al animal. (C) Grupo LA, en donde la adenohipófisis fue removida y solo se aprecia la neurohipófisis (D) Grupo LP, la neurohipófisis fue retirada y solo se aprecia la adenohipófisis. (Figuras aportadas por el Dr. Andrés Quintanar Stephano).

Los métodos empleados para los grupos HPX y LP fueron descritos anteriormente en ratas por Quintanar-Stephano y Quintanar, 1992 y LP por Ben-Jonathan y Peters, 1982 y Mena *et al*, 1996, respectivamente.

4.2.1 Cuidados post-operatorios y recuperación

El tiempo total de la anestesia no excedió más de 15 minutos y se produjo una recuperación completa dentro de 30 a 60 minutos. Después de la cirugía, todos los animales operados fueron inyectados con penicilina (Penprocilina; 5000 UI IM. Lacustre, México) una vez al día durante tres días. Una vez terminada la operación los animales tuvieron acceso a agua glucosada al 5%.

Una vez realizadas las cirugías se dejó transcurrir un lapso de un mes, con el propósito de que los animales se repusieran a la misma, tiempo en el cual los hámsters fueron monitoreados con el fin de observar cualquier cambio que pudieran haber presentado. En el transcurso de este tiempo los hámsters fueron trasladados al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y una vez ahí, se llevó a cabo la infección con *Trichinella spiralis* y las prácticas experimentales.

4.3 Parásitos e infección

4.3.1 Conservación de cepa

Para mantener la cepa de *Trichinella spiralis*, la cual fue obtenida del Centro Internacional de Referencia de Triquinosis (ITRC, de sus siglas en inglés: International Trichinellosis Reference Centre), se infectan constantemente en el laboratorio de Inmunología ratas *Sprague-Dawley* con una serie de pases con el fin de mantener la viabilidad y patogenicidad de la cepa.

4.3.2 Obtención y Aislamiento de LM

Las LM viables se obtuvieron de músculo de una rata *Sprague-Dawley* infectada con anterioridad con larvas de *Trichinella spiralis*, siendo lo más adecuado obtenerlas cuando la rata tiene 6 semanas de infección. Dicha rata se sacrificó, se quitó la piel y vísceras, de tal forma que sólo nos fue útil el músculo. Se trituró la carne en un procesador

de alimentos (MOULINEX), obteniéndose carne molida, se colocó en un matraz Erlenmeyer para someterla a una digestión artificial empleando una solución de digestión, la cual contenía Pepsina al 1% y HCl al 1% (Ver Anexo A), se colocó el matraz en una incubadora con agitación (Lab-Line 3525 Incubator Shaker) a 37°C durante 3 horas a 30 g (por cada 10gr de carne se emplearon 100ml de la solución de digestión), con el fin de simular las condiciones que hay en el estómago, como enzimas digestivas y el pH estomacal para que las larvas se liberaran de su célula nodriza. La solución, de color café y con apariencia lechosa se filtró para sedimentar las LM, mismas que se recuperaron con la ayuda de una pipeta. Se lavaron las LM con PBS (Ver Anexo A) hasta eliminar cualquier residuo de la solución de digestión y los residuos de carne, lo cual se pudo notar hasta que la solución perdió toda coloración.

Para poder saber cuántas LM se obtuvieron, se cortó la punta de una punta para micropipeta, a modo que las LM pudieran pasar por la abertura, se agitó el tubo en donde se recolectaron las LM, se tomaron muestras de 20 μ l y se colocaron sobre un portaobjetos, mismas que se observaron con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se contaron las LM que había en cada gota (en los 20 μ l), se hizo la cuenta en al menos 8 gotas para hacer un promedio de las LM que se tenían en 20 μ l, y se determinaron cuantas había en el volumen total del tubo en donde se recolectaron.

Se ajustó el volumen, de tal modo que al tomar un mismo volumen nos aseguramos que se tomaran las 1500 LM que se necesitaban para poder infectar a cada uno de los hámsters.

Los restos de la rata de la cual se obtuvieron las LM, así como el material no quirúrgico que haya estado en contacto con sangre o tejidos de la misma, se desechó en bolsas amarillas (residuos biológicos infecciosos) para su almacenamiento y posterior incineración. El material quirúrgico, así como las partes del procesador de alimentos en donde se trituro la carne se colocaron de 15-20 min en agua con cloro, para inactivar a las LM que estuvieran ahí; además de que el lugar de trabajo se limpió con una solución de agua con cloro, para el mismo fin.

Es importante mencionar que el mismo día que se planeó infectar a los hámsters, se hizo la obtención de LM, para asegurar que los parásitos estuvieran vivos y activos.

4.3.3 Infección

Una vez transcurrido un mes después de las microcirugías se procedió a infectar a los hámsters. Con LM recién obtenidas, se tomó con una jeringa de tuberculina el volumen que se ajustó de tal manera que tomaran 1500 LM, se adaptó la cánula intragástrica y se dejó un momento en posición vertical. Por otro lado se sujetó al hámster, fue necesario utilizar Sevorane (Sevoflurano), el cual es un anestésico volátil, con el fin de que el hámster se relajara un poco (no fue necesario llevarlo hasta la sedación) de tal modo que permitió introducir la cánula intragástrica, una vez introducida se depositaron las LM, y es así como el hámster quedó infectado.

A las LM sobrantes se les agregó una solución de agua con cloro para inactivarlas, se dejaron de 15 a 20 minutos como mínimo en esta solución y después pudieron desecharse.

4.4 Sacrificio y obtención de órganos

Pasados 5 días de infección, se realizó el sacrificio de los hámsters, el cual se llevó a cabo en una cámara de CO₂, de esta manera los animales no sufrieron y la muerte fue rápida. Una vez que se comprobó que el animal estuviera muerto (no se percibió latido del corazón y se los esfínteres se relajaron), se hizo una incisión en el abdomen y se dejaron expuestas las vísceras del animal, los órganos que se obtuvieron fueron los siguientes:

**Bazo*: se quitó toda la grasa y tejido conectivo que pudiera haber tenido, cada muestra fue colocada de manera individual en tubos Eppendorf de 1.5 ml que contenía Trizol (Invitrogen). Las muestras se colocaron a una temperatura de -70°C hasta el momento en que se utilizaron para obtener el RNA para hacer el RT-PCR.

* *Intestino delgado*: se obtuvo un segmento, se enjuagó en PBS y se fijó en paraformaldehído al 4% durante una noche, para posteriormente ser procesado en parafina, hacer cortes para ser teñidos con hematoxilina y eosina, así como llevar a cabo la técnica de Inmunohistoquímica. El resto del intestino delgado se utilizó para obtener la carga parasitaria por cada hámster.

4.5 Conteo de adultos de *T. spiralis* a nivel intestinal

Cuando se obtuvo el intestino delgado, se retiró el contenido intestinal ejerciendo cierta presión, desde el inicio hasta donde empieza el intestino grueso, entre los dedos índice y medio humedecidos en PBS, se cortó longitudinalmente y se enjuagó rápidamente en PBS, se cortaron fragmentos de entre 1 y 1.5 cm, colocándolos en una malla que estaba en contacto con PBS, se incubaron a 37°C por 3 horas. Transcurrido este tiempo se recuperaron los parásitos adultos con ayuda de una pipeta, se hicieron varias aspiraciones, dejando sedimentar un tiempo entre cada una de ellas. Se hizo un lavado con PBS y se realizó el conteo de adultos, de la misma forma que se hizo cuando se recuperaron de la solución de digestión (Ver Obtención y Aislamiento de LM).

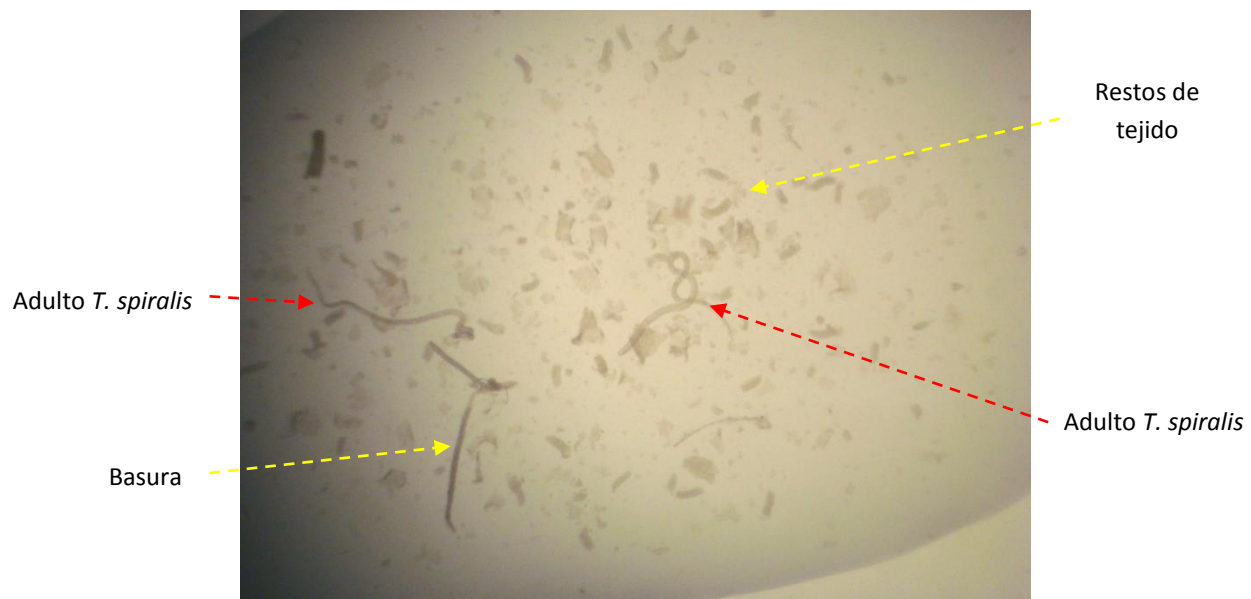


Figura 11. Conteo de adultos, vistos con microscopio estereoscópico

Imagen obtenida en el laboratorio al momento de contar las LM, después de haberlas recuperado.

(Figura aportada por Hernández Cervantes)

4.6 RT-PCR de bazo

4.6.1 Obtención y cuantificación de RNA

A cada muestra de bazo se le extrajo el RNA (utilizando la técnica fenol-cloroformo) siguiendo la instrucción del fabricante (Invitrogen).

Antes de empezar a homogenizar las muestras de bazo se limpiaron las cuchillas del Polytron con una serie de soluciones: saturada de NaCl, alcohol al 75%, solución de agua DEPC:Trizol. Una vez limpiadas las cuchillas, el bazo que se almacenó en tubos Eppendorf con Trizol a -70°C se transfirió a tubos de vidrio estériles y por cada 100 mg de tejido se agregó 1 ml de Trizol, se homogeneizó, manteniendo la temperatura a 4°C , lavando la cuchilla con agua DEPC entre cada muestra. Los homogeneizados se transfirieron a tubos nuevos Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 μl de cloroformo (SIGMA) por cada 1ml de homogeneizado, se agitó en el vórtex.

Se centrifugaron a 1500 g a una temperatura de 4°C , durante 15 minutos. Este paso permitió separar dos fases: la fase orgánica, compuesta por cloroformo y proteínas; y la fase acuosa, que contenía el RNA. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadieron 150 μl de fenol ácido y 30 μl de cloroformo, se agitó en el vórtex. Se centrifugó a 1500 g, a una temperatura de 4°C , durante 15 minutos. Al final se obtuvieron 2 fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol: cloroformo y la porción superior incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantuvieron en una interfase y en la fase orgánica. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se le agregó una cantidad equivalente de isopropanol (SIGMA) frío (4°C), manteniendo esta muestra a 4°C durante 8 horas mínimo para permitir la precipitación del RNA total. Al siguiente día se centrifugó a 1500 g, 10 minutos a 4°C , se decantó el isopropanol (la pastilla de RNA se queda adherida) y se lavó con etanol al 75% (para quitar las sales con el 25% de H_2O que contiene, y el etanol disuelve el RNA). Se centrifugó a 1500 g, durante 5 minutos a 4°C , decantando el sobrenadante, sin que se desprendiera la pastilla, mediante

inversión de los tubos sobre una gasa estéril, no se dejó secar por completo para evitar la insolubilidad de la misma. La pastilla de RNA se disolvió en 50 µl de agua MilliQ DEPC. Para determinar la cantidad de RNA obtenida en cada muestra, se extrajo una alícuota y ésta fue leída en un espectroscopio (GeneQuant) utilizando a una densidad óptica de 260 y 280 nm. Posteriormente, con la formula general ($RNA = ABS_{260} \times 1 \text{ D. O.} \times \text{dilución} = ng/\mu l$) utilizado en el software del espectroscópico, se obtuvo la concentración de cada muestra. Se verificó la integridad corriendo 2 µg de RNA en un gel de agarosa.

4.6.2 Obtención de cDNA

El RNA obtenido de todas las muestras fue transformado a cDNA utilizando la técnica RT o retro-trascricpción (Invitrogen) utilizando un Kit y siguiendo el instructivo del fabricante.

Se mezclaron en un tubo para PCR lo siguiente:

	1X	
Buffer FS 5X	4 µl	} Mix
MgCl ₂ 25mM	4 µl	
DTT 0.1M	2 µl	
dNTPs 10 mM	1 µl	
RNA	5 µl	
Oligo dT20 50 mM	1 µl	
MMLV (enzima)	1 µl	
H2O Milli Q DEPC	<u>2 µl</u>	
	20 µl	

Condiciones para hacer el RT:

Oligo dT							
Muestra	→ 80°C	→ Hielo	→ 60°C	→ Hielo	→ Mix +	→ 37°C	
H2O Milli Q DEPC	5 min	5 min	3 min	3 min	enzima	1 hora	

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (GenAmp PCR System 2700). Una vez terminada la reacción se guardó a -20°C .

4.6.3 Determinación de la expresión de citocinas por RT-PCR

Los primers $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-10 fueron amplificados por PCR de cDNA utilizando un kit (biotecnologías universitarias) siguiendo el instructivo del fabricante.

Los primers empleados fueron diseñados por la Bióloga Lorena López Griego, quien buscó en el GenBank la secuencia genómica del hámster, y definió la región del gen que se deseaba amplificar ($\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-10), y se mandaron a sintetizar a Accesolab (Marca Invitrogen) (Tabla 2).

Cuadro 2. Estandarización de la temperatura y ciclos de los cebadores utilizados para RT-PCR

Abreviatura	Nombre	Oligonucleótidos	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de alineamiento ($^{\circ}\text{C}$)	No. de ciclos
$\text{TNF}\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa	SENSE 5' GGGAAGAGAAGTTCCCAAC 3' ANTISENSE 5' TAAACCAGGTACAGCCCGTC 3'	229	57	30
IL-6	Interleucina 6	SENSE 5' CAACAAGTCGGAGTTTGGT 3' ANTISENSE 5' AGGGTTTTGATGGTGCTCTG 3'	302	40	35
IL-10	Interleucina 10	SENSE 5' AAGGACCAGCTGGACAACATA 3' ANTISENSE 5' CGCCTTCTCTTGAGCTTA 3'	289	61	35
18s	Gen constitutivo 18s	SENSE 5' CGCGGTTCTATTTTGGT 3' ANTISENSE 5' AGTCGGCATCGTTTATGGTC 3'	219	54	30

4.6.4 Cuantificación de la expresión relativa de citocinas

La expresión relativa se cuantificó tomando en cuenta al gen constitutivo 18s. Para todos los grupos experimentales se obtuvo el RT-PCR para 18s, además de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10. Como el gen constitutivo (18s) se presenta en todas las muestras se hizo una densitometría correspondiente para cada citocina, y lo que se graficó fue la densidad relativa, para ello se utilizó el Software Chemilmager. El análisis estadístico entre los grupos fue determinado por un ANOVA seguido por una prueba de Tukey.

4.7 Procesamiento de muestras de intestino para histología

4.7.1 Deshidratación de tejidos

Las muestras de duodeno obtenidas se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Después fueron sometidas a diferentes soluciones de alcoholes, una hora en cada una: etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, etanol absoluto, etanol absoluto (otro), y una solución de etanol:xilol (1:1); se dio un paso de 20 minutos en xilol; xilol:parafina (1:1) una hora y finalmente dos series de parafina a 60°C una hora cada una, hasta el momento de incluir.

4.7.2 Inclusión de tejidos en portamuestras

Una vez que los tejidos estaban en la última parafina, se colocaron sobre una platina, se orientaron los tejidos, se colocó encima de la platina un cassette y se agregó más parafina. Se dejó solidificar la parafina y se desmontó el bloque.

4.7.3 Obtención de cortes

Los cortes se hicieron en un microtomo (Retracting Microtome Rotary-One) a 6 μm para realizar la tinción de hematoxilina-eosina, y a 10 μm para llevar a cabo las inmunohistoquímicas. Se utilizaron portaobjetos para microscopio cargados o silanados. Los portaobjetos destinados a inmunohistoquímicas se guardaron a 4°C.

4.8 Tinción de hematoxilina-eosina

Los portaobjetos se colocaron 15 minutos en la estufa a 40°C y para hidratar los tejidos se siguió un tren de hidratación, el cual se llevó a cabo en una campana de extracción, en cada solución se dieron de 20 a 30 baños (1 baño: se sumergió la laminilla en el líquido y se sacó rápidamente), el tren fue: xilol, xilol, etanol absoluto, etanol absoluto, etanol 96%, etanol 96%, agua corriente, hematoxilina 5 min, agua corriente, 2 baños de alcohol ácido, agua corriente, 5 baños de agua amoniacal al 1%, agua corriente, eosina 2 min. Hasta este punto las muestras ya se encontraban teñidas y fue necesario deshidratar los tejidos nuevamente de la siguiente manera: 20 a 30 baños en etanol 96%, etanol 96%, dos pasos en etanol absoluto, y dos pasos en xilol. En este último se mantuvieron los portaobjetos con las muestras ya teñidas y deshidratadas hasta que se montaron las muestras, para ello se colocó resina (Entellan, Merck) a un lado del tejido y se colocó un cubreobjetos limpio, de tal modo que no quedaran burbujas. Se dejó secar la preparación.

4.8.1 Obtención de imágenes

Las imágenes de la morfología e integridad de los intestinos de todos los grupos experimentales fueron tomadas con el microscopio OLYMPUS DP71 de la Unidad de Microscopía del instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

4.9 Inmunohistoquímica de diferentes citocinas en el intestino

Para realizar las inmunohistoquímicas de las diferentes citocinas (IL-1 β , IL-2, INF- γ , TNF- α , IL-5, IL-13, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-12, ver Anexo B) de intestino de todos animales experimentales se siguieron los siguientes pasos:

* Hidratación de tejidos

Se colocaron los portaobjetos en la estufa a 60°C por 30 min, y se pasan por un tren de hidratación, en cual consiste en: dos pasos de 5 min. en xilol, un paso de etanol 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, agua bidestilada, 3 min. en cada uno.

Se delimitó el área de los tejidos con marcador PapPen, y se colocaron los portaobjetos dentro de una cámara húmeda. A partir de este paso se hizo uso de vacío para retirar las soluciones con que los portaobjetos se trataron. Se llevaron a cabo 3 lavados con PBS de 5 min cada uno.

*Detergente y bloqueo

Se colocó tritón al 1% en PBS (Anexo A) por 10 min. Se realizó un lavado con PBS por 10 min y se bloquearon los portaobjetos con albúmina al 1% en PBS (Anexo A) durante 2 horas, a TA.

* Primera incubación

Se incubó con el Ac primario (Anexo B), en una dilución de 1:200 (en albúmina al 1% en PBS) durante una noche a 4°C, a los controles negativos no se les adicionó ningún anticuerpo, se dejaron en albúmina 1% en PBS al igual que los demás portaobjetos, y el resto de la técnica se trataron de la misma manera.

* Lavados

Se quitó el exceso de Ac y se realizaron 4 lavados a cada laminilla con PBS durante 5 min cada uno, el primer lavado se realizó doble; se hizo otro lavado con albúmina al 1% por 5 min.

* Segunda incubación

Se incubó con el Ac secundario, en una dilución 1:100 en albúmina al 1% durante 1 hora. Se retiró el Ac secundario y se hicieron 4 lavados a cada laminilla con PBS durante 5 min cada uno.

* Montaje

Sobre un cubreobjetos limpio se colocó DAKO (Fluorescent mounting medium), a la laminilla se le decantó el exceso de PBS, y se pusieron en contacto, de tal modo que por capilaridad DAKO cubrió todos los tejidos y no quedaron burbujas. Se colocaron los portaobjetos a 4°C hasta el momento en que se observan con el microscopio confocal.

4.9.1 Obtención de imágenes

Las imágenes correspondientes fueron obtenidas con el Microscopio Confocal Zeiss LSM 5 Pascal, en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

4.9.2 Cuantificación de la intensidad de la señal

De los diferentes grupos experimentales, y por cada citocina, fueron capturadas varias imágenes, y para cada una se cuantificó la intensidad de la fluorescencia, utilizando el software Zeiss LSM Image Browser, que se expresó como la intensidad media del pixel.

De cada citocina por grupo experimental por lo menos cinco imágenes fueron analizadas, tomadas a la misma amplitud y en las mismas condiciones; y se obtuvo un promedio.

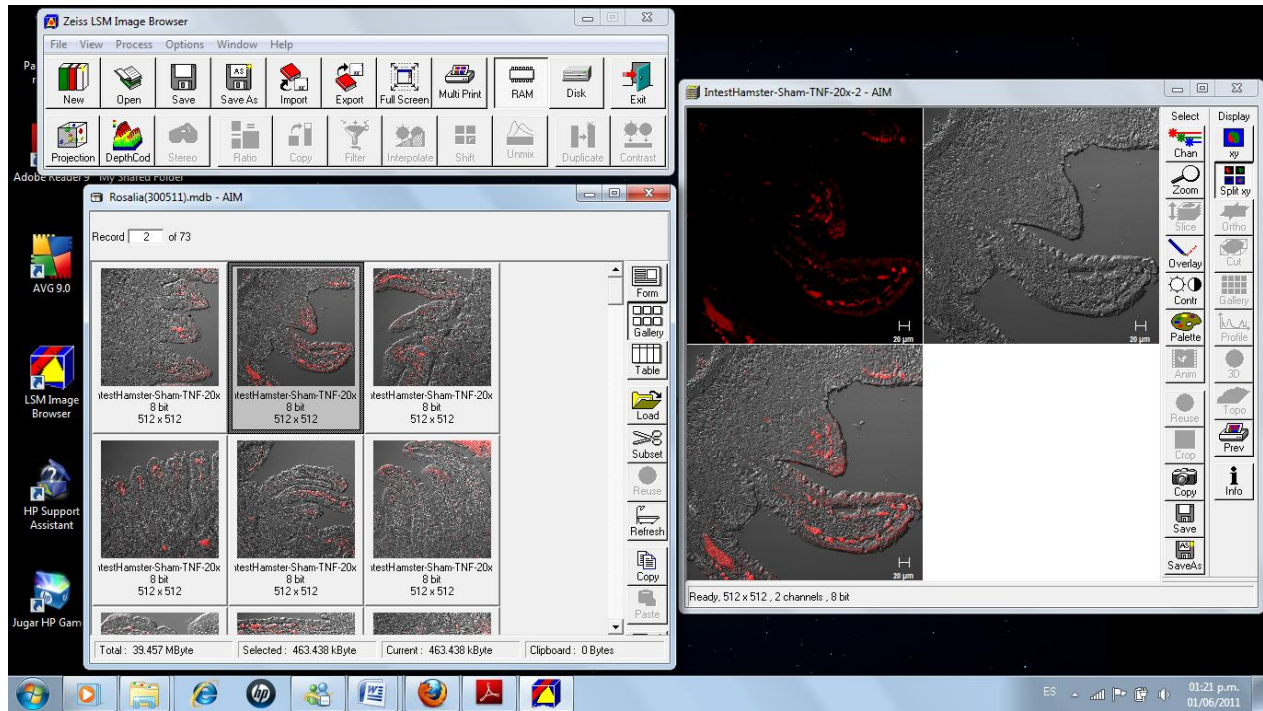


Figura 12. Software Zeiss LSM Image Browser

4.10 Análisis estadístico

La significancia estadística entre los grupos fue determinada por un ANOVA seguido por una prueba de Tukey. Los resultados fueron expresados como la media + la desviación estándar. Las diferencias significativas fueron consideradas a partir de una $P \leq 0.05$. El software utilizado para comparar el valor estadístico fue Prisma (GraphPad Software Incorporated).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue conocer como se ve alterado el sistema inmunitario cuando el sistema endócrino está afectado, ya sea total o parcialmente, y además se tiene presente una enfermedad parasitaria intestinal, como lo es la causada por *Trichinella spiralis*.

Para ello se tomó en cuenta el número de parásitos que se obtuvieron a los 5 días de la infección, la expresión relativa de TNF- α , IL-6 e IL-10 en bazo por RT-PCR, la morfología e integridad del intestino delgado mediante la tinción histológica de hematoxilina y eosina, así como el patrón de citocinas en el intestino delgado mediante la técnica de Inmunohistoquímica.

A los 5 días de infección por *Trichinella spiralis* los parásitos se encuentran alojados en el intestino delgado, aún no se han apareado, por lo tanto no ha habido larviposición y mucho menos las larvas recién nacidas han entrado a torrente sanguíneo. Es por ello que a los 5 días p.i. se procede a sacrificar a los hámsters, que es el tiempo adecuado en el cual se puede detener la infección e impedir que avance hasta una fase sistémica, y ese es el porqué determinamos ese tiempo de infección.

5.1 Número de parásitos en el intestino delgado

El grupo intacto nos mostró los parámetros normales para que podamos hacer comparaciones contra los demás grupos experimentales. El grupo infectado es el patrón de comparación en cuanto a la infección; el grupo cirugía simulada es el control con respecto a la microcirugía, y posee todas sus hormonas hipofisarias; el grupo hipofisectomizado carece de todas las hormonas hipofisarias; el grupo sometido a la Lobectomía Anterior no posee las hormonas ACTH, TSH, GH, FSH, Prolactina y LH;

mientras que el grupo de Lobectomía Posterior carece principalmente de la hormona vasopresina.

Como fue mencionado en la parte correspondiente a la metodología, los hámsters fueron infectados con 1500 LM de *Trichinella spiralis*, y a los 5 días p.i. fueron sacrificados y con el propósito de conocer el número de parásitos que fueron expulsados, se decidió contar los parásitos que estaban presentes en el intestino delgado.

En la figura 13 se puede apreciar el conteo realizado de los parásitos obtenidos de cada hámster con diferente tratamiento. En los primeros días de la infección el hámster pasa por un cuadro de diarrea, siendo un mecanismo que le permite eliminar algunos parásitos, sin embargo, no se llegan a eliminar todos; si se observa al grupo Infectado vemos que de tener en un principio 1500 LM, al cabo de 5 días p.i. la media del número de parásitos es cercana a 1000 LM, lo que nos da a entender que de manera normal, en un hámster que no ha sido sometido a ninguna microcirugía y que por lo tanto su sistema neuroinmunoendócrino funciona bien, el número de parásitos que se expulsan son alrededor de 500 LM.

Interesantemente en los grupos de cirugía simulada y LP los parásitos fueron expulsados en mayor cantidad, en comparación con el propio grupo de los hámsters infectados intactos, ya que presentan una media cercana a los 650 parásitos, es decir, que se expulsaron aproximadamente 850 parásitos, 350 parásitos más que los expulsados en el grupo infectado intacto.

Con respecto a los grupos HPX y LA no presentaron diferencias significativas con ningún otro grupo experimental, sin embargo hay que resaltar que tuvieron un comportamiento semejante al del grupo infectado.

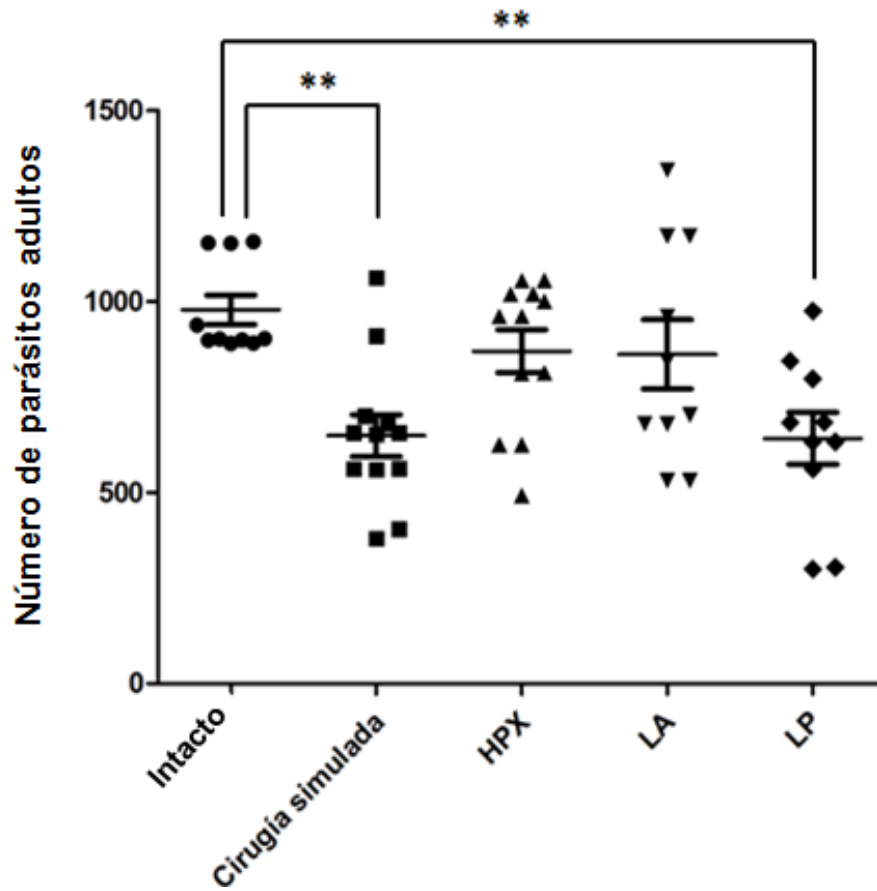


Figura 13. Número de parásitos adultos en el intestino delgado

Los hámsters se infectaron con 1500 LM de *Trichinella spiralis* y a los 5 días p.i. fueron sacrificados, se obtuvo el intestino delgado, mismo que se cortó en pedazos pequeños, incubándose a 37°C por 3 horas para poder recuperar las larvas. HPX: hipofisectomía total; LA: lobectomía anterior; LP: lobectomía posterior. $P \leq 0.05$

5.2 Expresión relativa de TNF- α , IL-6 e IL-10 en bazo

Con el fin de tener una visión de la respuesta inmunitaria sistémica se hicieron reacciones de RT-PCR en el bazo de todos los grupos experimentales, técnica que nos permite detectar y medir los niveles de RNAm que codifican para estas citocinas. Cada punto que se muestra corresponde a un hámster.

Podemos apreciar en la figura 14 que la expresión de TNF- α en el grupo Intacto es muy baja en comparación con los grupos que fueron infectados y sometidos a diferentes cirugías, siendo los grupos de los hipofisectomizados y el de lobectomía posterior son los que presentan una mayor expresión de esta citocina pro-inflamatoria.

Si nos enfocamos solo a aquellos grupos experimentales en los cuales los hámsters fueron infectados con *Trichinella spiralis* notamos que en el caso de la expresión relativa de TNF- α , el grupo LA es el que presenta una menor expresión que el resto de los grupos infectados, pudiéndonos sugerir que las hormonas que posee este grupo, vasopresina y oxitocina, sean las responsables de que la expresión de TNF- α no sea tan alta como los demás grupos.

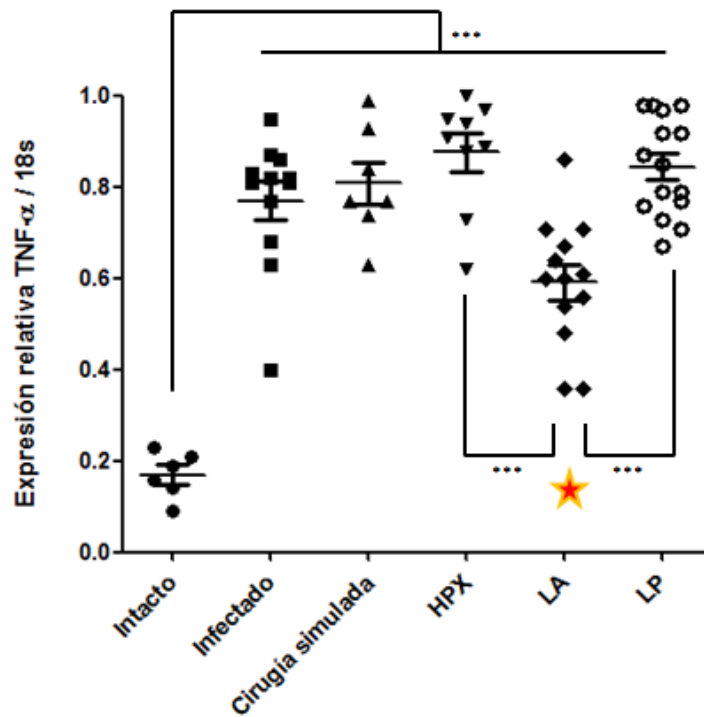


Figura 14. Expresión relativa de TNF- α / 18s

Se obtuvo el RNA de los bazos de los hámsters, mismo fue utilizado para hacer RT-PCR para TNF- α . Se tomó el 18s como control de carga. $P \leq 0.05$

Con respecto a la expresión relativa de IL-10 se puede observar en la figura 15 que el grupo de lobectomía posterior es el que posee una mayor expresión de esta citocina inmunosupresora que el resto de todos los grupos, también hay una expresión importante por parte del grupo hipofisectomizado, y de una forma similar a la expresión obtenida para TNF- α vemos que el grupo Intacto posee valores mínimos de esta citocina. El grupo infectado y el de cirugía simulada expresan valores similares en cuanto a la expresión relativa de IL-10, eso nos sugiere que a nivel sistémico, el hecho de someter a los animales al estrés de la cirugía no hace diferencia en la expresión de IL-10, debido a que este grupo se comporta como el grupo infectado. Sin embargo, en los grupos en donde está comprometida toda o parte de la hipófisis los hámsters se comportan diferente, debido a que los grupos HPX y LP son los que más expresión de IL-10 presentan. En el caso del grupo HPX no se tiene ninguna hormona hipofisaria, mientras que en el grupo LP sólo carece de vasopresina y oxitocina, lo anterior puede sugerirnos que la ausencia de estas dos hormonas provoca que a nivel sistémico haya una mayor expresión de IL-10.

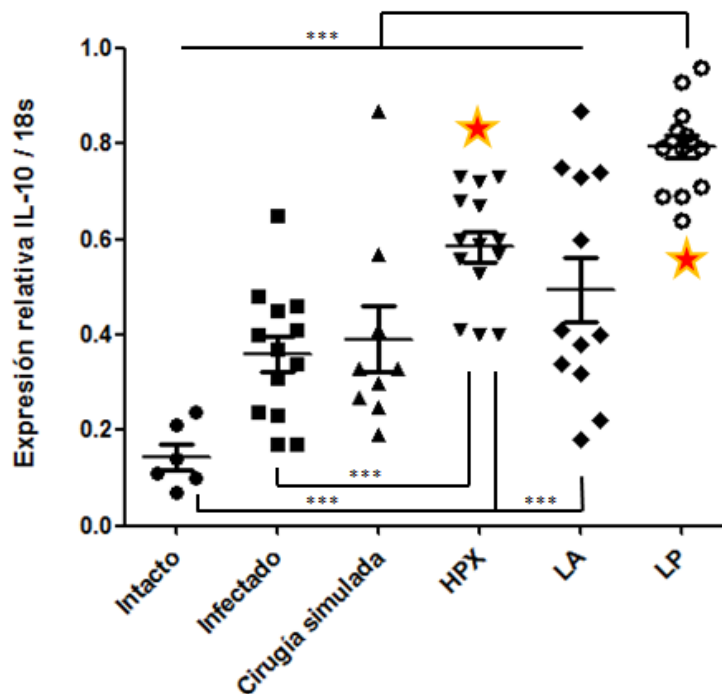


Figura 15. Expresión relativa de IL-10 / 18s

Se obtuvo el RNA de los bazos de los hámsters, mismo fue utilizado para hacer RT-PCR para IL-10. Se tomó el 18s como control de carga. $P \leq 0.05$

En la figura 16 aparece la expresión relativa para IL-6, una vez más el grupo intacto presenta una expresión mínima, y a pesar de que la expresión es baja para todos los grupos, el correspondiente a la lobectomía anterior es el que llega a tener un valor mayor como para presentar una diferencia significativa en comparación sólo con el grupo Intacto.

Si observamos los grupos intacto, infectado y de cirugía simulada, así como la ausencia de las hormonas ACTH, TSH, FSH, prolactina y LH (ausentes en los grupos HPX y LP) vemos que ni la infección ni la microcirugía tienen efecto diferencial en la expresión de IL-6.

Por otro lado, los hámster del grupo LA, que solo tenían presentes las hormonas vasopresina y oxitocina, son aquellos que presentan un valor más alto que los demás grupos, en caso contrario a la expresión de TNF- α a nivel sistémico, las hormonas presentes del grupo La sugieren que favorecen a una expresión mayor de IL-6.

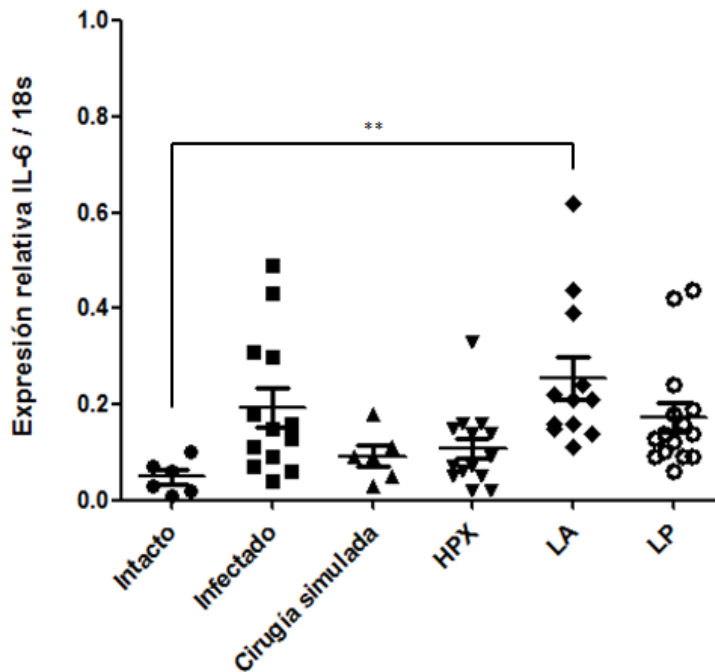
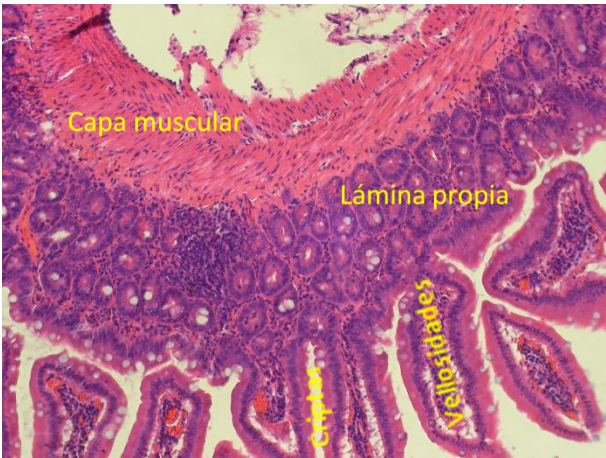


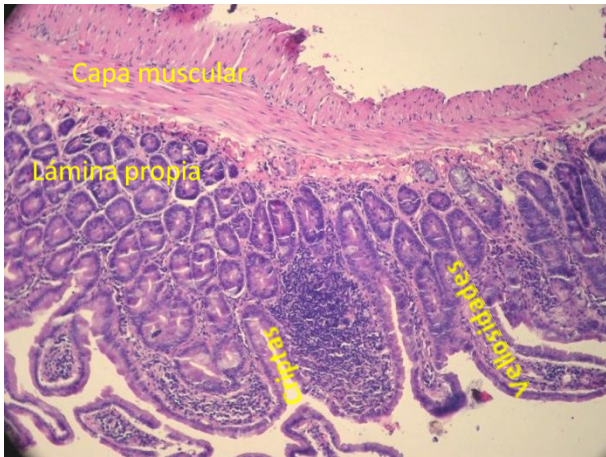
Figura 16. Expresión relativa de IL-6 / 18s

Se obtuvo el RNA de los bazos de los hámsters, mismo fue utilizado para hacer RT-PCR para IL-16. Se tomó el 18s como control de carga. $P \leq 0.05$

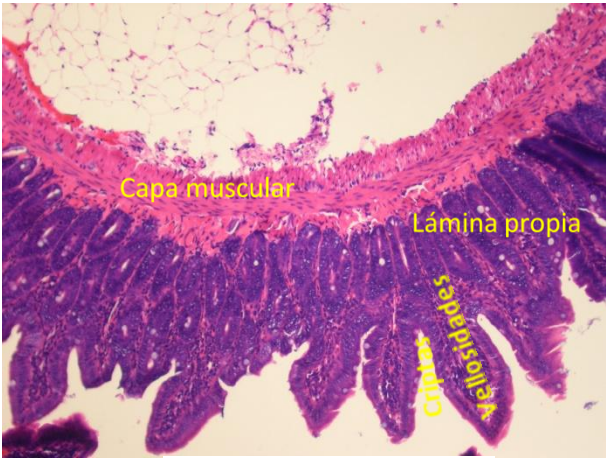
5.3 Morfología e integridad del intestino delgado



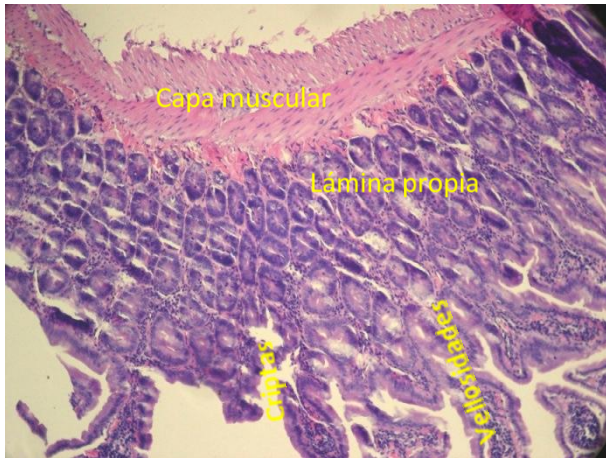
Intacto



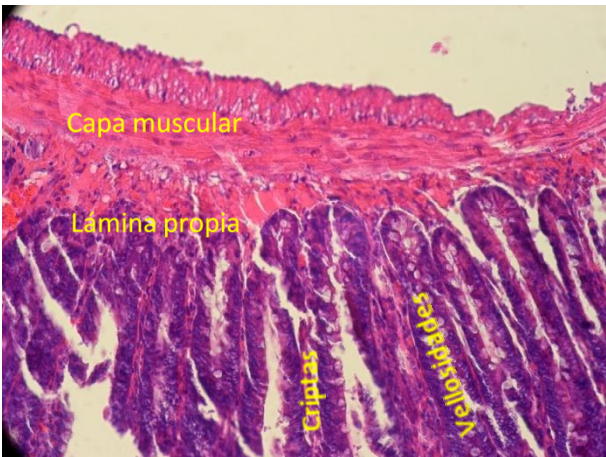
Infectado



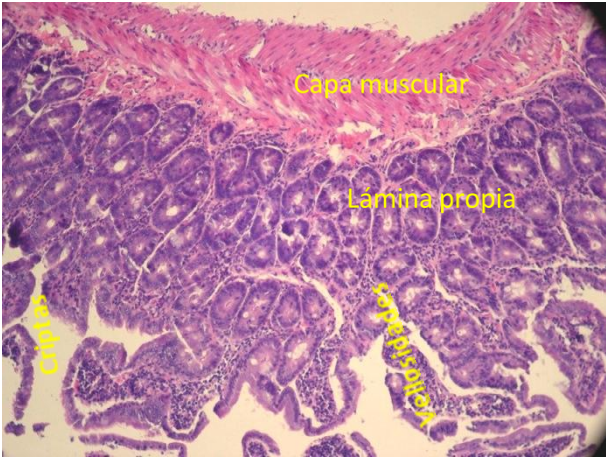
Cirugía simulada



HPX



LA



LP

100x

Se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para ver la morfología e integridad del intestino, que es el lugar en donde a los 5 días p.i. se encontraban los parásitos al momento de sacrificarlos, y por lo tanto es el lugar en donde se estaba llevando a cabo una respuesta local.

De las imágenes anteriores se tomó el grupo intacto como referencia en cuanto a la morfología e integridad para los demás grupos.

Podemos apreciar que los grupos infectado y el de Lobectomía Posterior conservan su integridad, sin embargo, se nota un mayor infiltrado celular, principalmente de eosinófilos, en el grupo infectado.

El grupo hipofisectomizado y el sometido a la Lobectomía Anterior presentan un gran daño en su morfología, siendo más evidente en el grupo LA, en el cual también es muy notorio que hubo una pérdida de la lámina propia.

En todos los grupos infectados hay una hiperplasia de las vellosidades del intestino, así como una reducción en la longitud de las mismas, siendo más evidente en el grupo de cirugía simulada.

5.4 Patrón de expresión de citocinas en intestino

A continuación se presentan los datos obtenidos de la intensidad de fluorescencia media de las citocinas correspondientes al tipo Th1: IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-12 y TNF- α , seguidas de las del tipo Th2; IL-5, IL-13, IL-6 e IL-4, y por último Treg, IL-10.

Las imágenes mostradas nos ilustran el tejido en relieve con una coloración gris, mientras que la marca anaranjada es la correspondiente a la señal que se presenta para las diferentes citocinas. Es importante mencionar que se tomaron más imágenes (al menos 6) de cada grupo y por cada citocina, sin embargo, aquí se presentan las más representativas

En la parte posterior de cada imagen se encuentra el valor que resultó de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media \pm la desviación estándar de la serie de imágenes para cada citocina, mientras que al lado derecho de cada imagen se indica el grupo experimental.

Después de las imágenes correspondientes a cada citocina se muestra la gráfica de la intensidad de la fluorescencia media, después de realizar un ANOVA seguido por una prueba de Tukey.

IL-1 β

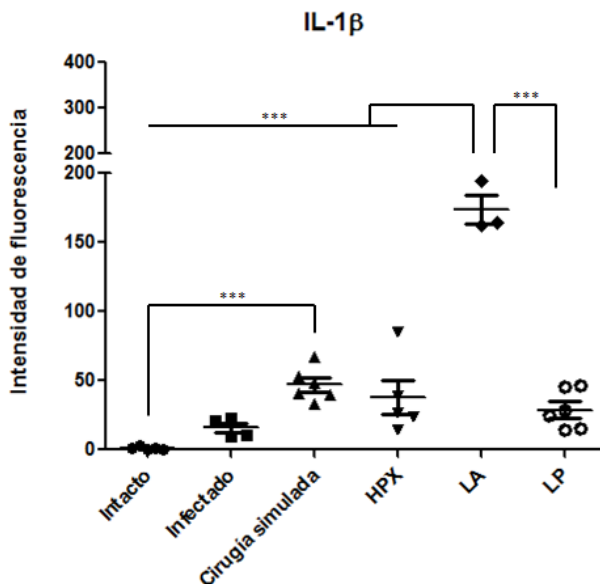
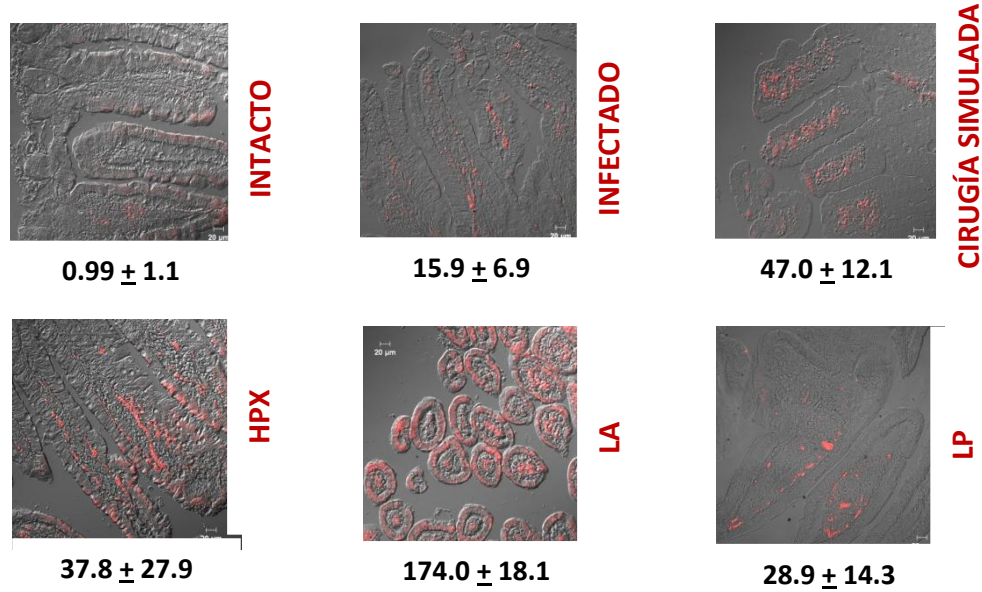


Figura 17. Intensidad de fluorescencia de IL-1 β en el intestino

Como se puede apreciar en las imágenes superiores, la marca que se presenta para IL- β es más notoria en el grupo sometido a Lobectomía Anterior que en el resto de los grupos, mientras que en el grupo intacto dicha intensidad es casi nula. Al observar la figura 17 vemos que, efectivamente al grupo LA es el que presenta una intensidad de fluorescencia muy grande si se compara

con los demás grupos, y al ser IL-1 β una citocina proinflamatoria podría explicarse el porqué del daño histológico que se presenta en este grupo. Aunque la intensidad del grupo cirugía simulada no está tan marcada como en el caso del grupo LA, si hace que presente diferencia con respecto al grupo Intacto.

IL-2

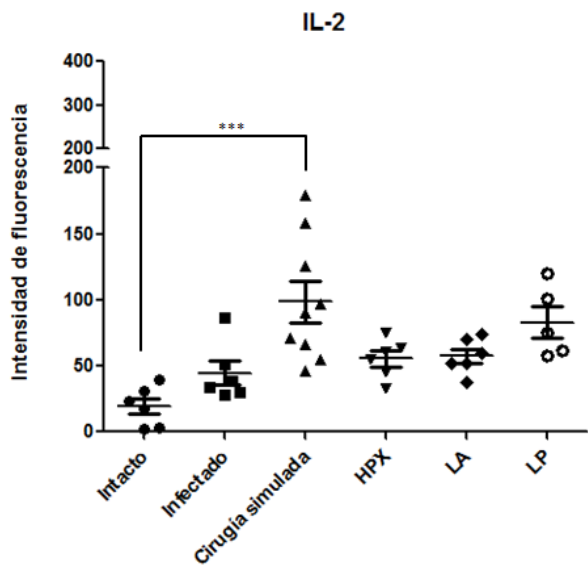
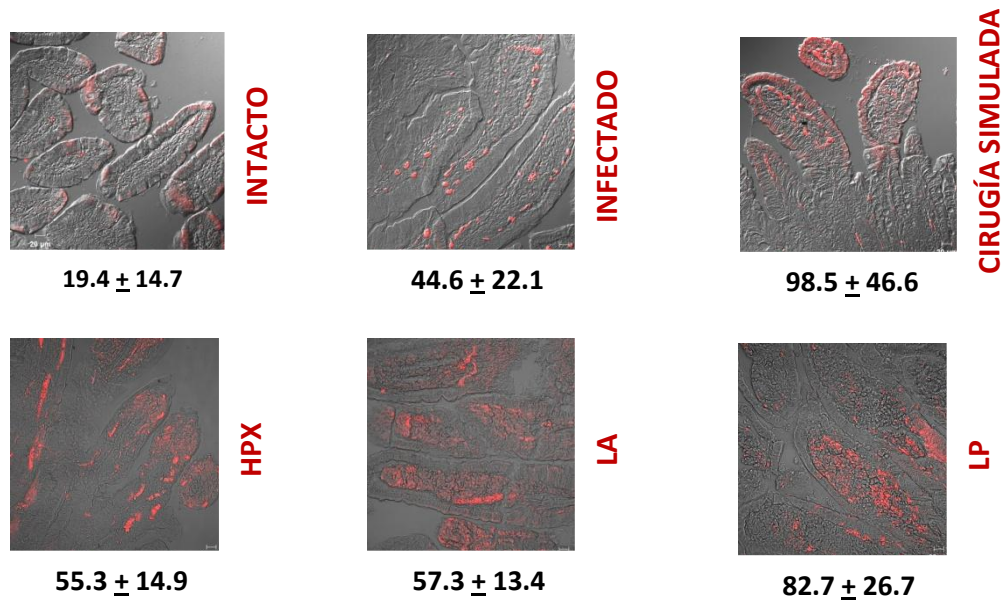


Figura 18. Intensidad de fluorescencia de IL-2 en el intestino

En las imágenes para IL-2 puede ser confuso a simple vista el diferenciar el grado de intensidad, es por ello que se cuantificó la intensidad de fluorescencia media para todos los casos, y la figura 18 nos indica que el grupo de cirugía simulada fue el que presentó una mayor expresión de IL-2 que hace que haya una diferencia estadística con el grupo intacto. La expresión de esta citocina antiinflamatoria en los grupos infectado, HPX, LA y LP no tiene efecto diferente en la expresión de IL-2.

INF- γ

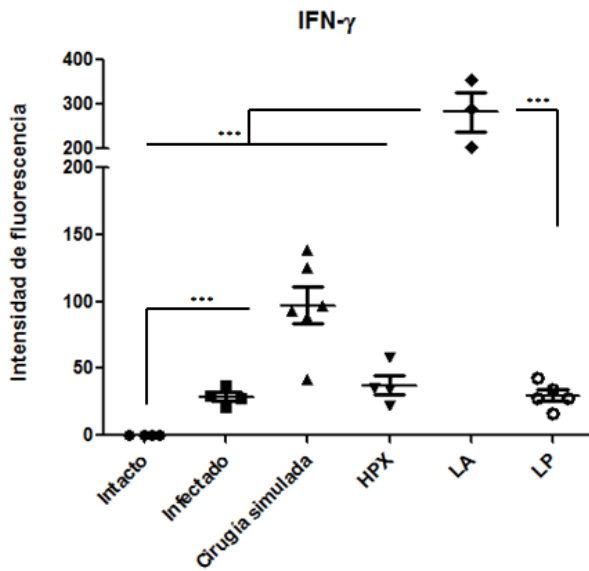
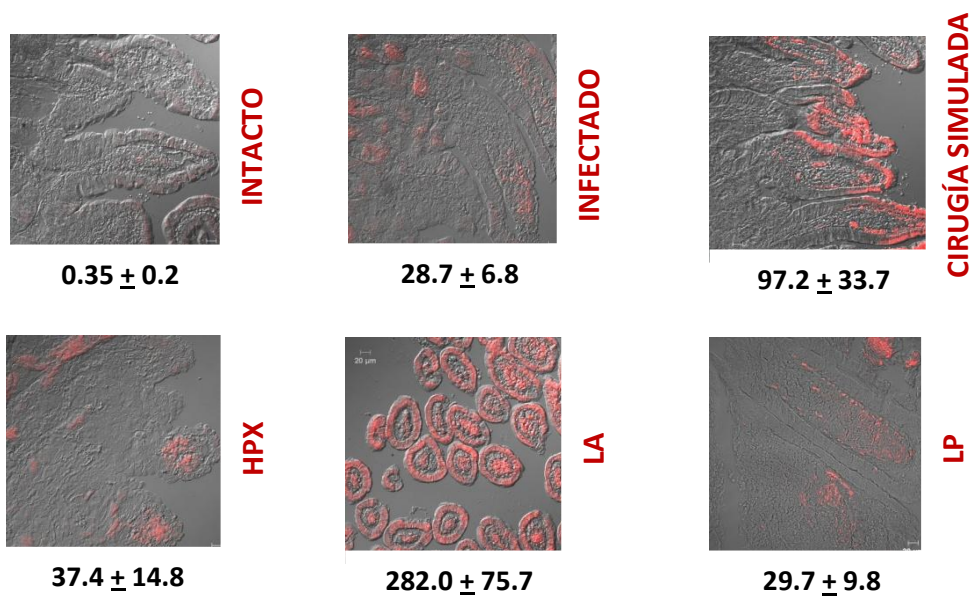


Figura 19. Intensidad de fluorescencia de INF- γ en el intestino

Las imágenes correspondientes a la intensidad de fluorescencia para INF- γ nos muestran que el grupo LA y cirugía simulada son los que presentan una mayor señal, y lo podemos comprobar en la figura 19, el grupo cirugía simulada tiene una expresión importante en comparación con el grupo intacto; pero lo que más llama la atención es que la intensidad de fluorescencia media de INF- γ es en el grupo LA el que presenta los valores más altos, de forma similar a lo que se obtuvo en el caso de IL-1 β , e igual que ésta, INF- γ es una citocina proinflamatoria, que también podría explicar el daño morfológico de este grupo.

IL-12

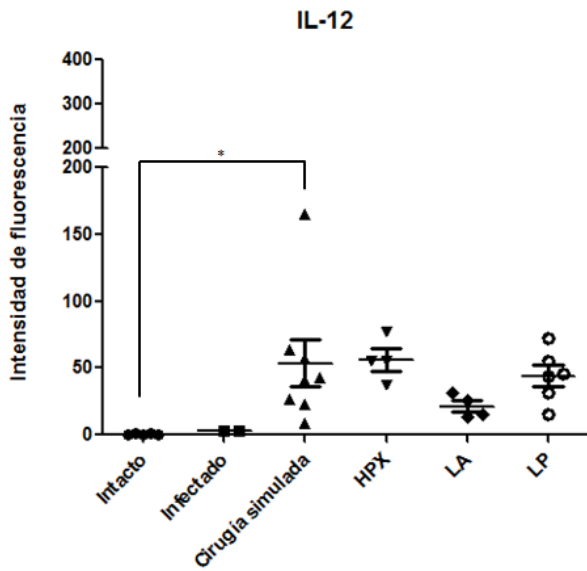
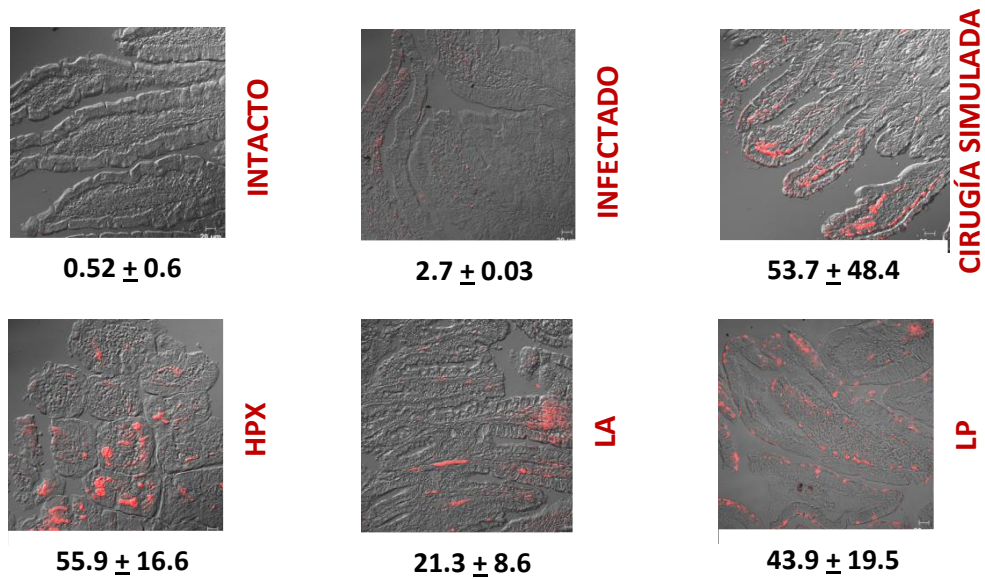


Figura 20. Intensidad de fluorescencia de IL-12 en el intestino

En la parte superior podemos ver que la señal que se obtuvo para IL-12 en el intestino no es tan grande como en casos anteriores, y al ver la figura 20 se observa que el grupo cirugía simulada es quien presenta diferencia significativa en comparación con el grupo intacto; además el grupo intacto e infectado se comportan de una forma similar, pero el hecho de someterlos a una microcirugía hace que haya una expresión de IL-12.

TNF- α

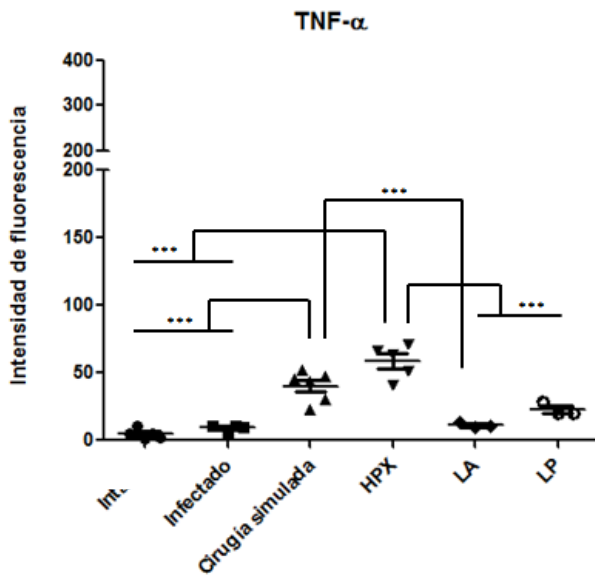
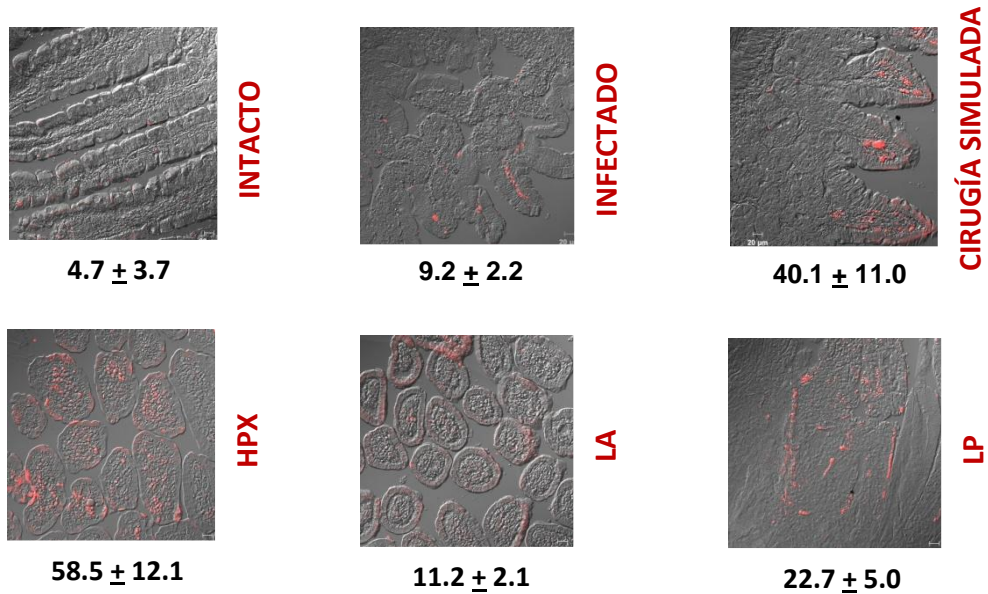


Figura 21. Intensidad de fluorescencia de TNF- α en el intestino

De manera visual podemos decir que los grupos cirugía simulada e HPX son los que presentan una mayor señal para TNF- α , y se corrobora observando la figura 21, en donde el grupo HPX es quien presenta diferencias con los grupos intacto, infectado, LA y LP. El grupo cirugía simulada sólo muestra diferencias con los grupos intacto e infectado. Lo anterior nos indica que el hecho de no haber ninguna hormona hipofisaria hace que haya un incremento de la señal de TNF- α en el intestino delgado.

IL-5

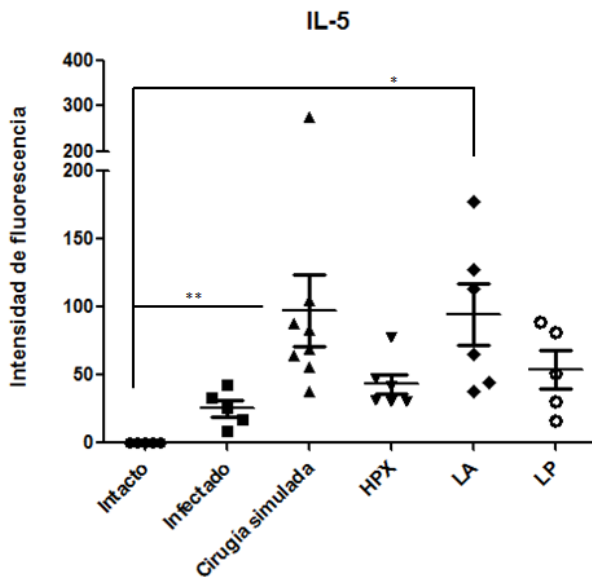
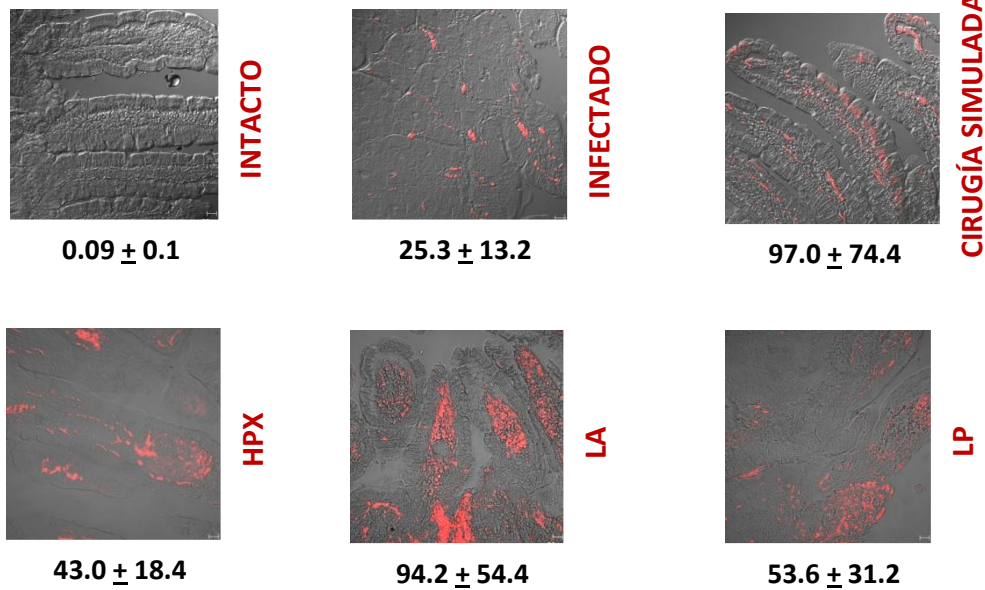


Figura 22. Intensidad de fluorescencia de IL-5 en el intestino

infectado y LA llegan a presentar diferencia significativa con el grupo intacto.

Está reportado que IL-5 es una citocina importante en la protección ante infecciones por nematodos intestinales, incluyendo a *Trichinella spiralis*, y como podemos observar en las imágenes superiores en todos los grupos que fueron infectados hay una señal importante en comparación con el grupo intacto. En la figura 22 vemos que, efectivamente, en todos los grupos infectados hay una expresión importante de IL-5, sin embargo sólo los grupos

IL-13

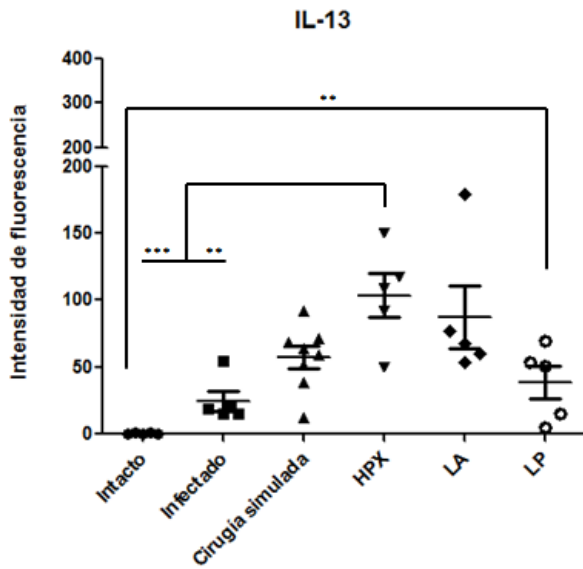
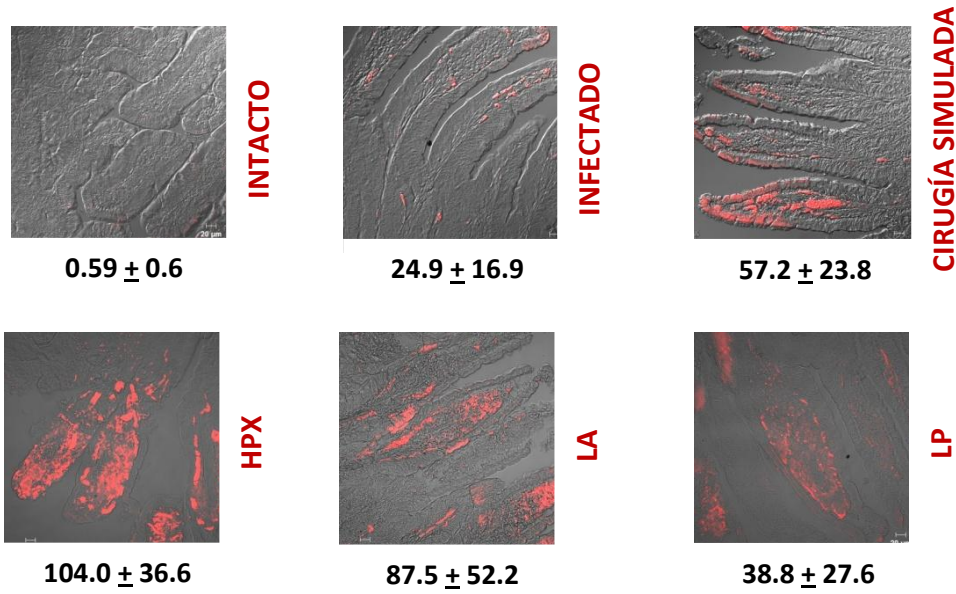


Figura 23. Intensidad de fluorescencia de IL-13 en el intestino

Otra citocina importante en la protección ante *Trichinella spiralis* es IL-13, y como se puede observar en las imágenes superiores y en la figura 23, el grupo intacto posee valores mínimos, mientras que en todos los grupos que fueron infectados la intensidad de fluorescencia media se incrementa, siendo mayor en el grupo HPX, el cual carece de todas las hormonas hipofisarias, de tal manera que podemos decir que los hámster al estar infectados y

que además carecen de todas las hormonas hipofisarias, la expresión de IL-13 se incrementa a que si sólo estuvieran infectados y presentes todas o parte de sus hormonas hipofisarias.

IL-6

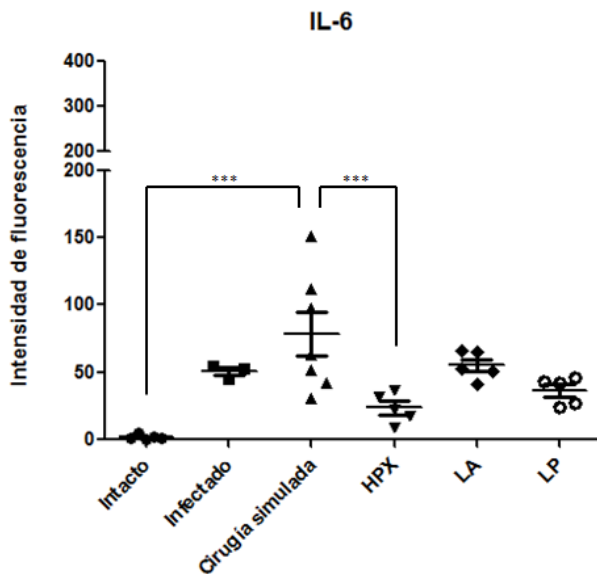
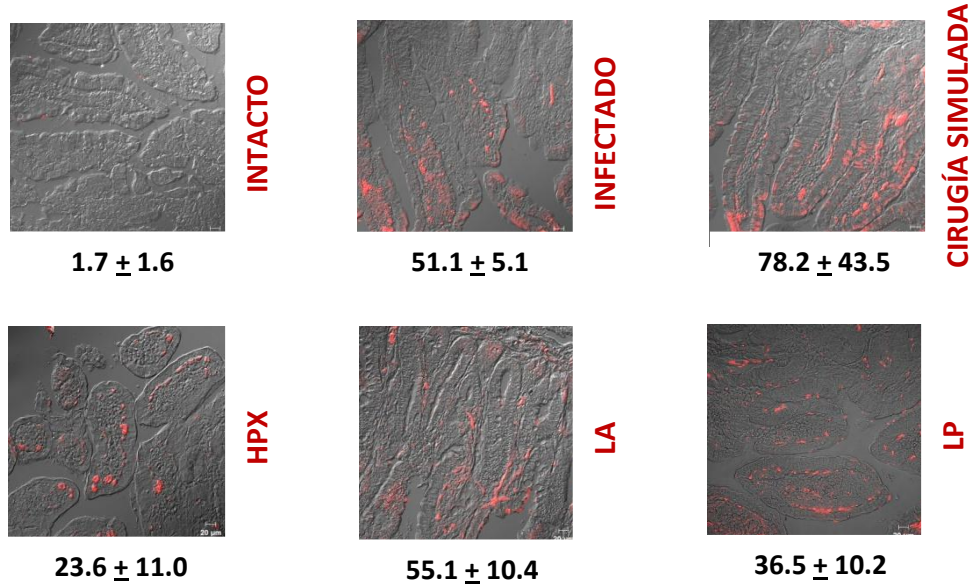


Figura 24. Intensidad de fluorescencia de IL-6 en el intestino

Podemos observar en las imágenes correspondientes a la intensidad de fluorescencia media para IL-6 en el intestino que el grupo cirugía simulada es quien presenta una mayor señal, y al observar la figura 24 vemos que presenta diferencias significativas con los grupos intacto e HPX. De todos los grupos que fueron infectados, el grupo carente de todas sus hormonas hipofisarias es quien presenta una menor señal para IL-6.

IL-4

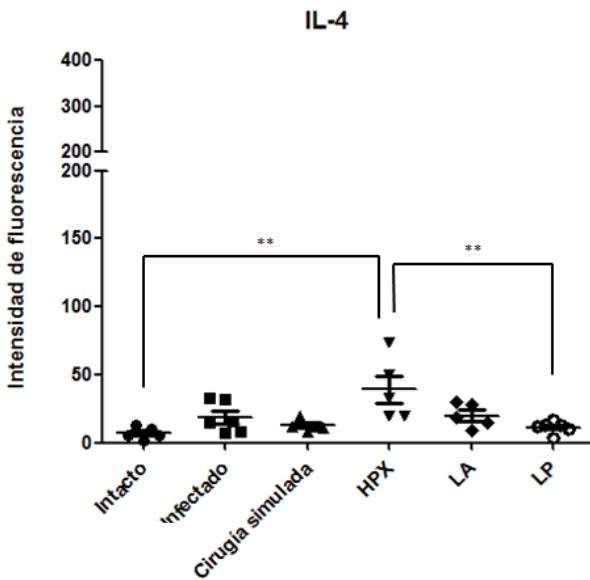
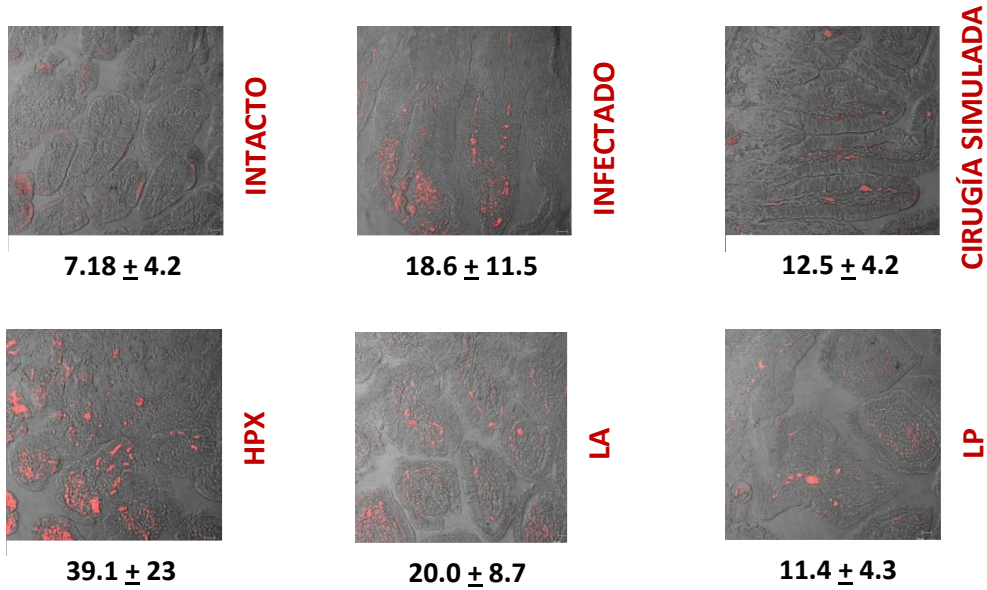
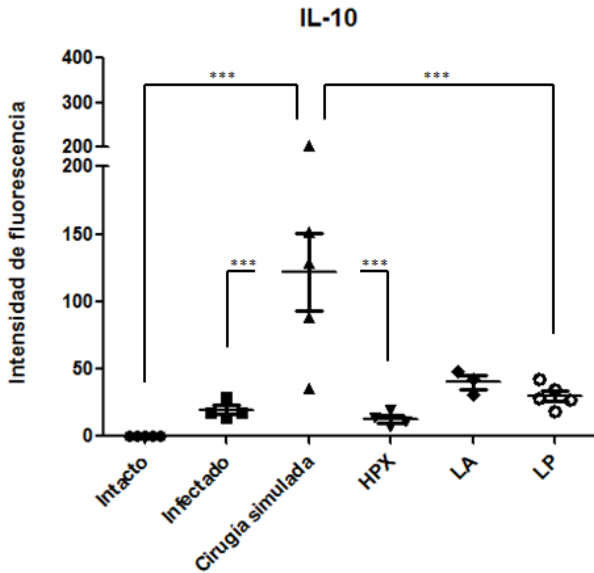
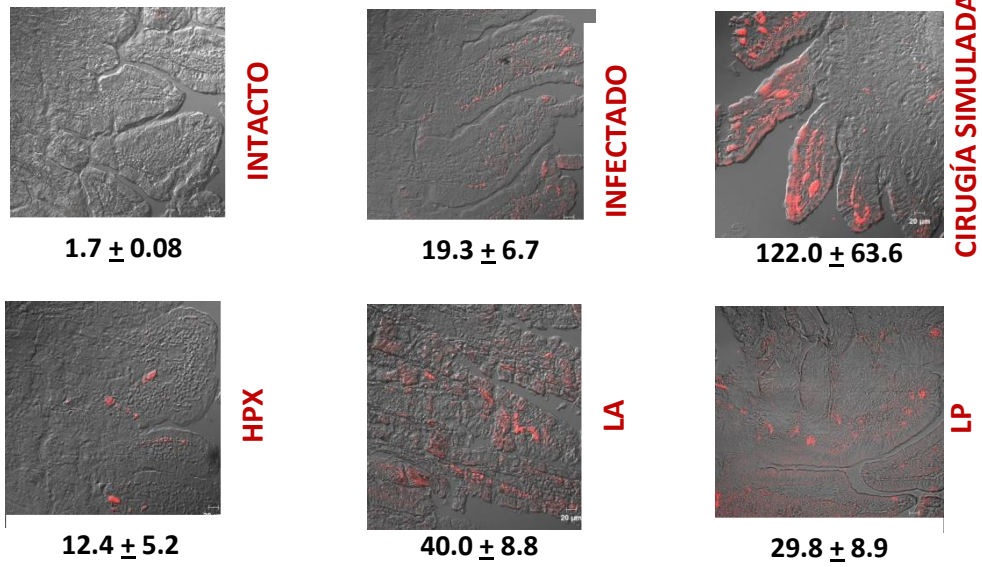


Figura 25. Intensidad de fluorescencia de IL-4 en el intestino

Junto con IL-5 e IL-13, IL-4 también está reportada como una citocina importante en la protección contra el nematodo *Trichinella spiralis*. Interesantemente, sólo el grupo HPX es quien presentó una expresión que fue de importancia en comparación con el grupo intacto y LP. Con respecto al grupo HPX podemos observar que de manera semejante a la expresión de IL-13, la intensidad de fluorescencia para estas dos citocinas fue mayor en el grupo HPX,

sugiriéndonos que a pesar de carecer de todas las hormonas hipofisarias, el grupo HPX es capaz de seguir manteniendo una respuesta de tipo Th2 ante una infección ante *Trichinella spiralis*.

IL-10



El grupo cirugía simulada es el que presenta una mayor señal en cuanto a la intensidad de la fluorescencia para IL-10. En la figura 26 lo podemos confirmar, y vemos que es este grupo el que presenta diferencias significativas con todos los demás grupos.

Figura 26. Intensidad de fluorescencia de IL-10 en el intestino

En la Tabla 3 se muestran los valores de la intensidad de la fluorescencia con su respectiva desviación estándar, los números que se encuentran subrayados representan a los valores mayores para cada citocina.

Cuadro 3. Intensidad de la fluorescencia de diversas citocinas en el intestino delgado de hámsters con diferentes tratamientos

Citocinas	GRUPOS EXPERIMENTALES					
	Intacto	Infectado	Cirugía simulada	HPX	LA	LP
Th1						
IL-1 β	0.99 \pm 1.1	15.9 \pm 6.9	47.0 \pm 12.1	37.8 \pm 27.9	<u>174.0 + 18.1</u>	28.9 \pm 14.3
IL-2	19.4 \pm 14.7	44.6 \pm 22.1	<u>98.5 + 46.6</u>	55.3 \pm 14.9	57.3 \pm 13.4	82.7 \pm 26.7
INF- γ	0.35 \pm 0.2	28.7 \pm 6.8	97.2 \pm 33.7	37.4 \pm 14.8	<u>282.0 + 75.7</u>	29.7 \pm 9.8
IL-12	0.52 \pm 0.6	2.7 \pm 0.03	53.7 \pm 48.4	<u>55.9 + 16.6</u>	21.3 \pm 8.6	43.9 \pm 19.5
TNF- α	4.7 \pm 3.7	9.2 \pm 2.2	40.1 \pm 11.0	<u>58.5 + 12.1</u>	11.2 \pm 2.1	22.7 \pm 5.0
Th2						
IL-5	0.09 \pm 0.1	25.3 \pm 13.2	<u>97.0 + 74.4</u>	43.0 \pm 18.4	94.2 \pm 54.4	53.6 \pm 31.2
IL-13	0.59 \pm 0.6	24.9 \pm 16.9	57.2 \pm 23.8	<u>104.0 + 36.6</u>	87.5 \pm 52.2	38.8 \pm 27.6
IL-6	1.7 \pm 1.6	51.1 \pm 5.1	<u>78.2 + 43.5</u>	23.6 \pm 11.0	55.1 \pm 10.4	36.5 \pm 10.2
IL-4	7.18 \pm 4.2	18.6 \pm 11.5	12.5 \pm 4.2	<u>39.1 + 23</u>	20.0 \pm 8.7	11.4 \pm 4.3
Treg						
IL-10	1.7 \pm 0.08	19.3 \pm 6.7	<u>122.0 + 63.6</u>	12.4 \pm 5.2	40.0 \pm 8.8	29.8 \pm 8.9

Los datos de la intensidad de fluorescencia se presentan como la media \pm la desviación estándar.

En 1997 se reportó que en ratas macho con 8 semanas de hipofisectomía, se reduce el peso corporal, el tamaño del intestino y la mucosa de todo el tracto gastrointestinal (Portela *et al.*, 1997). En otro estudio más detallado, se determinó que la hipofisectomía en la ratas macho provoca atrofia de la mucosa intestinal, la reducción de la secreción gástrica y la absorción intestinal, así como una mayor susceptibilidad a las infecciones (Campos *et al.*, 2006). En este caso, cuando existe una infección por el nematodo *Trichinella spiralis* en hámsters, se observó que al tener en un inicio 1500 LM, en un grupo Infectado, al cual no se le realizó ninguna microcirugía y por lo tanto su sistema Neuroinmunoendócrino se espera que está en las condiciones normales, a los 5 días p.i. este grupo posee más cantidad de LM que aquellos grupos que de alguna u otra manera se alteró la hipófisis, ya sea quitándola toda, o sólo una parte, y por lo tanto, la función de las hormonas hipofisarias fue alterada total o parcialmente y aún así éstos grupos presentaron una menor carga parasitaria que el grupo Infectado. Los parásitos de *Trichinella spiralis* fueron eliminados de la luz intestinal a la misma velocidad en los hámsters que fueron sometidos a una operación de cirugía simulada y a una Lobectomía Posterior.

La expresión relativa de TNF- α , IL-10 e IL-6 en el bazo de todos los grupos experimentales nos mostró que es notorio que en el grupo Intacto la expresión de estas citocinas es mínima, mientras que cuando los animales están infectados con *Trichinella spiralis*, los valores de los demás grupos aumentan, en el caso de TNF- α se aumenta más esta expresión en los grupos HPX y LP; para IL-10 lo es para LP, mientras que para IL-6, a pesar de que los valores son mucho menores que para las otras dos citocinas, el grupo LA es el que tiene una mayor expresión.

Con respecto a la cantidad de parásitos que se obtuvieron en el grupo de cirugía simulada, al ver la morfología del intestino podemos decir que la disminución en el tamaño de las vellosidades hizo que se redujera la capacidad de los parásitos de penetrar las vellosidades y por lo tanto se expulsaron en mayor cantidad que el grupo Infectado.

El grupo hipofisectomizado, recordemos que carece de todas las hormonas hipofisarias, y aún así fue capaz de presentar una respuesta inmunitaria que permitió tener menos cantidad de parásitos que el mismo grupo infectado. La expresión de IL-13 e IL-4, siendo ambas citocinas participantes en la respuesta contra *Trichinella spiralis*, es la que más se expresa en este grupo, por lo tanto, podemos decir que la respuesta inmunológica está presente, puede que no esté controlada, pero no se necesita que todas las hormonas hipofisarias estén presentes para que se pueda presentar una respuesta inmunológica.

El grupo LA presenta un gran daño morfológico, asimismo tuvo los valores más grandes de dos citocinas proinflamatorias presentes en el intestino delgado, IL-1 β e INF- γ , y dicha expresión de esas citocinas pudo haber ocasionado el daño morfológico.

La respuesta que se obtuvo a nivel intestinal estuvo presente y fue mayor en los grupos sometidos a algún tipo de microcirugía, ya que en la mayoría de los casos, los valores del grupo infectado son menores que los grupos de cirugía simulada, hipofisectomía, así como los sometidos a una lobectomía anterior o posterior, a pesar de que todos estos grupos fueron infectados con *Trichinella spiralis*.

Podemos decir que la infección por *Trichinella spiralis* en los hámsters a los cuales se les extirpó total o parcialmente la hipófisis, y con ellos sus hormonas, manifiestan una respuesta inmunológica sistémica y gastrointestinal mediante diferentes mecanismos. Asimismo, en todos los casos en donde estuvo presente la infección hubo una resistencia a la misma, al encontrarse cantidades de parásitos menores que en el propio grupo infectado.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Los grupos Cirugía simulada y Lobectomía Posterior expulsaron un mayor número de parásitos de *Trichinella spiralis*.
- ✓ A nivel sistémico, en el bazo, se observó que el grupo LA expresa una menor cantidad de TNF- α y una mayor expresión para IL-6 en comparación al grupo Infectado, mientras que para la IL-10 se incrementó la expresión en los HPX y LP de manera significativa.
- ✓ En todos los grupos infectados hubo una hipertrofia de las vellosidades del intestino y en algunos casos, como en el grupo LA, una pérdida de la lámina propia.
- ✓ Hubo una mayor expresión de IL-2, IL-5, IL-6 e IL-10 en el grupo de Cirugía simulada; asimismo el grupo HPX mostró expresiones mayores de TNF- α , IL-13, IL-4 e IL-12; mientras que en el grupo LA se incrementó la expresión de IL-1 β e INF- γ .
- ✓ Hubo una regulación diferencial en la expresión de citocinas en el intestino delgado.
- ✓ La hipofisectomía total o parcial afectó de manera diferente la respuesta inmunológica en la infección por *Trichinella spiralis* en el hámster dorado.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez, B.R., Quintanar, S.A., Quintanar, S.J.L., De Alvarez, B.E. 1991. Technical note: removal of the unfragmented pituitary gland (hypophysectomy) in the rat. *Bol Estud Med Biol.* **39(1-4)**:33-38.

Ben, J.N., Peters, L.L. 1982. Posterior pituitary lobectomy: differential elevation of plasma prolactin and luteinizing hormone in estrous and lactating rats. *Endocrinology.* **110(6)**:1861-1865.

Besedovsky, H.O., del Rey A. 2011. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res.* **36(1)**:1-6.

Campos, R.R., Quintanar, S.A., Jarillo, L.R.A., Oliver, A.G., Ventura, J.J., Rivera, A.V., Berczi, I., Kovacs, K. 2006. Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in rats. *Infect Immun.* **74(3)**:1883-1889.

Capo, V., Despommier, D.D. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella spp.* *Clin Microbiol Rev* **9**:47-54.

Chirinos, M.J. 1996. Neuroendocrinoinmunología de la Respuesta de Fase Aguda, *La Revista Médica del C.I.E.M.* Vol. 1. Obtenido en <http://www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/larev/neuro.htm>

Cohen, B.J.; 2009. Memmler. El cuerpo humano. Salud y enfermedad. 11ª. Ed. España. Wolters Kluwer. Lippincott Williams & Wilkins. 607 págs.

Hernández, C.R., Sánchez A.A.G., Ramírez N.R. y Morales M.J. 2010. Regulación neuroendocrinológica de la función inmunitaria: El papel de la hipófisis y los esteroides sexuales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **13(2)**:101-110.

Khan, W. I. 2008. Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-*Trichinella spiralis* model. *Parasitol.* **135 (6)**, 671–682.

Kociecka, W. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* **93**:365–383

Mena, F., Aguayo, D., Viguera, M., Quintanar S.A, Perera, G., Morales, T. 1996. Effect of posterior pituitary lobectomy on *in vivo* and *in vitro* secretion of prolactin in lactating rats. *Endocrine*.**5(3)**:285-290.

Moreno MA., Vacío, MR., Reveles, G., Román, R., Berumen, V., Saldívar, S., Muñoz. J. 2004. Epidemiología, diagnóstico y tratamiento de triquinosis en el estado de Zacatecas, México, *Revista Virtual Visión Veterinaria.* 3:10. Obtenido en <http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/vijornadasdeinvestigacion/mesa5/Articulo%20epidemiologia.pdf>

Murrell, K.D., Pozio, E. 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology*, **30**; 1339-1349.

Owen, R. 1835. Description of a microscopic entozoon infesting the muscles of the human body. *Trans Zool Soc Lond*, **1**;315-324.

Petersenn, S., Quabbe, H.J., Schöfl, C., Stalla, G.K., von Werder, K., Buchfelder, M. 2010. The Rational Use of Pituitary Stimulation Tests. *Dtsch. Arztebl. Int.* **107(25)**, 437-443.

Portela, G.G.M, Albuquerque, J.P., Ferra, M.A., Grimelius L. 1997. Effect of hypophysectomy on endocrine cell types in rat gastrointestinal mucosa. *J Anat. Nov*; **191** (Pt 4):529-535.

Pozio, E., Gomez M.M.A, Dupouy C.J. 2003. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **1(3)**:471-482.

Pozio E., La Rosa, K. D. Murrell and Lichtenfels. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.* **78(4)**: 654 – 659.

Raillet, A. 1895. *Traité de Zoologie medicale et agricole*, 2nd. ed., Asselin et Houzeu, Paris.

Sandoval, C., Fonseca, M.E. & Ochoa, R. 1997. The transcendence of prolactin and its relation to the immune response. *Ginecol.Obstet. Mex.* **65**, 148-151.

Schneider, H.J., Aimaretti, G., Kreitschmann-Andermahr, I., Stalla, G.K. & Ghigo, E. 2007. Hypopituitarism. *Lancet.* **369**,1461-1470.

Suzuki, T., Sasaki, T., Takagi, H., Sato, K., Ueda, K. 2008. The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, *Trichinella spiralis*, expulsion in rats. *Parasitol Res.* **103(6)**:1289-1295.

Páginas electrónicas:

Triquinosis, *Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA)*, obtenido en <http://158.109.105.11/granja/triquinosis.pdf>

<http://www.trichinella.org>

<http://www.salud.gob.mx>

<http://intcomtrichinellosis.monsite-orange.fr/>

VIII. ANEXOS

Anexo A. Preparación de soluciones

*** Solución de digestión:**

Para 1 litro:

Pepsina..... 10g

HCl..... 10 ml

En un matraz Erlenmeyer se coloca 1 litro de agua destilada con una barra magnética, el matraz se pone sobre un agitador magnético. Dentro de una campana de extracción se agregan los 10 ml de HCl poco a poco, debido a que es una reacción exotérmica. Se adicionan los 10 gr de Pepsina y se mantiene en agitación hasta que esta última se disuelva por completo.

Por cada 10 gr de carne molida se utilizan 100 ml de la solución de digestión

*** PBS (phosphate buffered saline)**

Para un litro de PBS se pesan las cantidades de los reactivos, según la siguiente relación:

NaCl..... 8g

KCl..... 0.2g

Na₂HPO₄..... 1.44g

KH₂PO₄..... 0.27g

En un matraz aforado de un 1 litro se adicionan 800 ml de H₂O destilada, se agregan los reactivos poco a poco, se agita el matraz para que todo quede completamente disuelto. Con la ayuda de un pH-metro (JENWAY, Modelo 3520) se ajusta el pH a 7.4, con HCl o NaCl, según sea el caso, y se afora con H₂O destilada.

*** H₂O Milli Q DEPC**

Para 400 ml

DEPC 0.1%..... 500 µl

H₂O Milli Q..... 400 ml

Se deja una noche en agitación, y al siguiente día se esteriliza por autoclave (15 min, 15 libras, 121 °C). Se debe de tener cuidado al manipular el DEPC debido a que tiene propiedades cancerígenas, así como todo el material que haya servido para preparar la solución se mete a la autoclave para inactivar el DEPC.

El dietilpirocarbonato, DEPC, inactiva las ribonucleasas por modificación covalente. El uso del dietilpirocarbonato, un compuesto que selectivamente reacciona con el residuo histidina en las proteínas, inhibe completamente a estas fosfatasas.

*** Alcohol ácido**

Para 100 ml, se prepara primero EtOH 70% con EtOH absoluto

99 ml EtOH 70%..... 99 ml

Ácido clorhídrico..... 1 ml

*** Tritón al 1% en PBS**

Para 50 ml:

Tritón..... 0.5 ml

PBS..... 50 ml

Debido a que el Tritón (SIGMA) es un líquido muy viscoso, es necesario cortar con unas tijeras la punta de la punta de la micropipeta con la cual se va a tomar el Tritón, se deposita en el matraz Erlenmeyer que contenga 50 ml de PBS, y se pone en agitación con una barra magnética. Se debe preparar la solución mínimo 1 hora antes de utilizarlo. Mantener la solución a 4°C.

*** Albúmina al 1% en PBS**

Para 50 ml:

Albúmina..... 0.5 g

PBS..... 50 ml

La albúmina (SIGMA) es almacenada a 4°C, es por ello que se debe de mantener un momento a TA antes de pesarla. Una vez pesada, se transfiere a un matraz Erlenmeyer que contenga el PBS, y se agita suavemente hasta que se disuelva por completo. La solución se mantiene a 4°C.

Anexo B. Lista de anticuerpos utilizados para Inmunohistoquímica

	Ac primario	Ac secundario
IL-1 β	Rabbit polyclonal	anti-Rabbit IgG
IL-2	Rabbit polyclonal	anti-Rabbit IgG
IFN γ	Goat polyclonal	anti-Goat IgG
TNF α	Goat polyclonal	anti-Goat IgG
IL-5	Rabbit polyclonal	anti-Rabbit IgG
IL-13	Goat polyclonal	anti-Goat IgG
IL-6	Goat polyclonal	anti-Goat IgG
IL-4	Rat monoclonal	Anti-Rat IgG
IL-10	Goat polyclonal	anti-Goat IgG
IL-12	Goat polyclonal	anti-Goat IgG

Todos los Ac primarios son de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-rabbit IgG, anti-rat IgG y anti-goat IgG y están conjugados con tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), ZIMED Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA.

Anexo C. Lista de figuras y cuadros

Figuras	Página
1. Localización de la hipófisis en el humano y en el hámster	2
Figuras aportadas por el Dr. Andrés Quintanar Stephano	
2. Anatomía de la hipófisis en el humano y en el hámster	3
La figura correspondiente a la anatomía en el hámster fue aportada por el Dr. Andrés Quintanar Stephano.	
3. La hipófisis y su funcionamiento	4
Obtenida y modificada de http://to2qui.blogspot.com/2010/06/endocrinologia.html	
4. Hembra adulta de <i>Trichinella spiralis</i>	10
5. Macho adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	11
6. Larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	12
7. Célula nodriza de <i>Trichinella spiralis</i>	13
Las figuras 4 a la 7 fueron obtenidas en http://www.trichinella.org . Modificado de Villella, J.B., 1970, Life cycle and morphology, in: <i>Trichinosis in Man and Animals</i> (S.E. Gould, ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 19-60.	
8. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	15
Obtenido y modificado de http://www.trichinella.org/	
9. Respuesta inmunológica ante la triquinelosis a nivel intestinal	16
Obtenida y modificada de W. I. KHAN. Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse- <i>Trichinella spiralis</i> model. <i>Parasitology</i> (2008), 135, 671–682.	
10. Anatomía de la hipófisis del hámster y como luce después de la microcirugía	27
Figuras aportadas por el Dr. Andrés Quintanar Stephano	
11. Conteo de adultos, vistos con microscopio estereoscópico	31

	Página
Imagen obtenida al momento de hacer el conteo de parásitos	
12. Software Zeiss LSM Image Browser	39
13. Número de parásitos adultos en el intestino delgado	42
14. Expresión relativa de TNF-α / 18s	43
15. Expresión relativa de IL-10 / 18s	44
16. Expresión relativa de IL-6 / 18s	45
17. Intensidad de fluorescencia media de IL-1β en el intestino delgado	49
18. Intensidad de fluorescencia media de IL-2 en el intestino delgado	50
19. Intensidad de fluorescencia media de IFN-γ en el intestino delgado	51
20. Intensidad de fluorescencia media de IL-12 en el intestino delgado	52
21. Intensidad de fluorescencia media de TNF-α en el intestino delgado	53
22. Intensidad de fluorescencia media de IL-5 en el intestino delgado	54
23. Intensidad de fluorescencia media de IL-13 en el intestino delgado	55
24. Intensidad de fluorescencia media de IL-6 en el intestino delgado	56
25. Intensidad de fluorescencia media de IL-4 en el intestino delgado	57
26. Intensidad de fluorescencia media de IL-10 en el intestino delgado	58
Cuadros	
1. Hormonas hipofisarias	5
2. Estandarización de la temperatura y ciclos de los cebadores utilizados para RT-PCR	34
3. Intensidad de la fluorescencia de diversas citocinas en el intestino delgado de hámsters con diferentes tratamientos	59