



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN GESTACIONAL AL CANNABINOIDE SINTÉTICO WIN 55,212-2
SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA INTESTINAL DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR
Trichinella spiralis

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA
ROSALÍA HERNÁNDEZ CERVANTES

DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE MORALES MONTOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA
DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2020.



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.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN.....	2
ABREVIATURAS.....	3
I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Sistema endocannabinoide (SEC)	5
1.1.1 Cannabinoides.....	7
1.1.1.1 WIN 55,212-2.....	10
1.1.2 Receptores a cannabinoides.....	12
1.2 SEC y sistema inmunológico.....	16
1.3 Uso del cannabis a nivel mundial.....	18
1.3.1 Uso del cannabis por mujeres embarazadas.....	19
1.3.2 Efectos postnatales del uso del cannabis durante la gestación.....	22
1.3.3 ¿Por qué se piensa que la administración gestacional del cannabinoide WIN 55,212-2 puede afectar el funcionamiento del SI de la descendencia?	28
1.4. <i>Trichinella spiralis</i>	30
1.4.1 Triquinelosis.....	31
1.4.2 Ciclo de vida.....	33
1.4.3 Respuesta inmunológica intestinal.....	36
II. JUSTIFICACIÓN.....	38
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
3.1 Hipótesis.....	39
3.2 Objetivo general.....	39
3.3 Objetivos particulares.....	39
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
4.1 Material biológico.....	42
4.1.1 Grupos experimentales.....	43
4.2 Tratamiento gestacional.....	44

4.2.1 WIN 55,212-2.....	45
4.2.2 Datos de reproducción.....	45
4.2.3 Obtención de las crías.....	45
4.3 Parásitos e infección.....	45
4.3.1 Conservación de la cepa.....	45
4.3.2 Obtención y aislamiento de larvas musculares.....	46
4.3.3 Infección.....	47
4.4 Sacrificio y obtención de muestras biológicas.....	47
4.4.1 Carga parasitaria.....	48
4.4.2 Histología.....	48
4.4.2.1 Deshidratación, inclusión de tejidos y obtención de cortes...48	
4.4.2.2 Tinción de hematoxilina-eosina.....	49
4.4.2.3 Tinción de Azul Alcán	49
4.4.2.4 Cuantificación de eosinófilos y en cortes histológicos	50
4.4.3 Citometría de flujo.....	50
4.4.3.1 Disgregación de bazo y GLM.....	50
4.4.3.2 Disgregación de duodeno.....	51
4.4.3.3 Tinciones.....	51
4.4.3.3.1 Receptor CB1. Tinción intracelular.....	51
4.4.3.3.2 Receptor CB2. Tinción extracelular.....	52
4.4.4 RT-PCR.....	53
4.4.4.1 Obtención y cuantificación de RNA.....	53
4.4.4.2 Obtención de cDNA.....	54
4.4.4.3 Determinación de la expresión de citocinas por RT-PCR.....	54
4.4.5 Detección de anticuerpos totales.....	56
4.4.6 Análisis estadístico.....	56
V. RESULTADOS.....	57
5.1 Datos de reproducción.....	57
5.2 Carga parasitaria.....	58
5.3 Histología de duodeno	59
5.3.1 Conteo de eosinófilos a nivel de vellosidades y glándulas	65
5.4 Subpoblaciones celulares por citometría de flujo	67

5.4.1 Duodeno	68
5.4.2 Ganglios linfáticos mesentéricos	74
5.4.3 Bazo	81
5.5 Expresión de RNA mensajero en muestras de duodeno y bazo	88
5.6 Detección de anticuerpos totales por ELISA	90
VI. DISCUSIÓN.....	92
VII. RESUMEN DE RESULTADOS.....	99
VIII.CONCLUSIÓN.....	101
IX. PERSPECTIVAS	101
X. BIBLIOGRAFÍA.....	102
XI. ANEXOS.....	112
Anexo A. Preparación de soluciones.....	112
Anexo B. Lista de figuras y tablas.....	118

ABSTRACT

Marijuana is the illicit drug most consumed by pregnant women and it has already been determined that its consumption can affect products after birth, by affecting their memory and behavior, as well as endocrine parameters. In addition, it has been proven that they are more likely to use drugs in adulthood, however, the consequences on the functioning of the immune system are scarce. That is why in this project pregnant rats were administered with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2, analogous compound of the main psychoactive principle of marijuana, tetrahydrocannabinol (THC), at a dose of 5mg / kg weight, from DG5 to DG16, which induces the same biological effects, is more potent and has a greater affinity to cannabinoid receptors, CB1 and CB2. The immune system was challenged by infecting animals exposed or not prenatally to the cannabinoid, with the nematode parasite *Trichinella spiralis*. At 5 days of infection it was determined that animals treated with WIN 55,212-2 were less effective in eliminating intestinal parasites, which was associated with a mucus production deficiency, a lower recruitment of eosinophils in the duodenum and also the cells most sensitive to these stimuli, were the NK⁺, T γ δ ⁺, CD45⁺ cells, and in a lesser way, CD8⁺ cells. Total antibody titers were also decreased. In conclusion, the gestational administration of the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 induces lasting changes on the functioning of the immune system in male Wistar rats before an infection by the *Trichinella spiralis* parasite, making them more susceptible to infection.

RESUMEN

La marihuana es la droga ilícita más consumida por mujeres embarazadas y ya se ha determinado que el consumo de ésta puede afectar a los productos después de nacidos, al afectar su memoria, su comportamiento, así como parámetros endócrinos. Además, se ha comprobado que son más propensos a consumir drogas en su adultez, sin embargo, las consecuencias sobre el funcionamiento del sistema inmunológico son escasas. Es por lo que en este proyecto se administraron ratas gestantes con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2, compuesto análogo del principal principio psicoactivo de la marihuana, el tetrahidrocannabinol (THC), a una dosis de 5mg/Kg peso, del DG5 al DG16, el cual induce los mismos efectos biológicos, es más potente y tiene una mayor afinidad a los receptores a cannabinoides, el CB1 y el CB2. Se retó al sistema inmunológico al infectar a los animales expuestos o no prenatalmente al cannabinoide, con el parásito nemátodo *Trichinella spiralis*. A los 5 días de infección se determinó que los animales tratados con WIN 55,212-2 eran menos eficaces para eliminar a los parásitos intestinales, y que esto se asociaba con una deficiencia en la producción de moco, un menor reclutamiento de eosinófilos en el duodeno, además de que las células más sensibles ante estos estímulos, la administración gestacional del cannabinoide aunado a la infección, eran las células NK⁺, T γ δ ⁺, CD45⁺, y en menor grado las células CD8⁺. También se encontraron disminuidos los títulos de anticuerpos totales. En conclusión, la administración gestacional del cannabinoide sintético WIN 55,212-2 induce cambios perdurables sobre el funcionamiento del sistema inmunológico en ratas macho Wistar ante una infección por el parásito *Trichinella spiralis*, haciéndolos más susceptibles a la infección.

ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

°C	Grados centígrados
2-AG	2-Araquidonilglicerol
Δ^9 THC	Δ^9 Tetrahydrocannabinol
AEA	Anandamida (Araquidoniletanolamida)
AMPC	Adenil monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CB1	Receptor a cannabinoides tipo 1
CB2	Receptor a cannabinoides tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero (Ácido desoxirribonucleico complementario)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DG	Día gestacional
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
DPG	Día postgestacional
eCB	Endocannabinoide
FAAH	Amidohidrolasa de ácido grasos
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
LI	Larva infectante
LM	Larva muscular
LRN	Larvas recién nacidas
M	Molar
μ g	Microgramo

μm	Micrómetro
μl	Microlitro
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
p.i.	Post infección
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
SEC	Sistema endocannabinoide
SI	Sistema inmunológico
SNC	Sistema Nervioso Central
TBE	Amortiguador Tris-borato-EDTA
THC	Tetrahidrocannabinol

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide está conformado por cannabinoides endógenos, llamados endocannabinoides (eCBs), enzimas necesarias para la síntesis y degradación de estos, y los receptores a los cuales se unen, los receptores a cannabinoides (Svízenská, 2008).

Los eCBs son ésteres, amidas o éteres, que se sintetizan dentro de la célula a partir de fosfolípidos de membrana. Los principales eCBs son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), habiendo otros como la virodamina (VIR), noladin éter (NE) y N-araquidonildopamina (NADA). La síntesis de AEA ocurre a través de una reacción de dos pasos catalizada por la N-aciltransferasa (NAT) y N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD). La síntesis de la 2-AG involucra a las enzimas fosfolipasa C (PLC) y diacilglicerol lipasa (DAGL). La AEA y el 2-AG son liberados en el ambiente extracelular por simple difusión o a través del transportador membranal putativo de endocannabinoides (EMT, por sus siglas en inglés *endocannabinoid membrane transporter*). Los eCBs son capaces de activar a sus receptores acoplados a proteína G (CBR), uniéndose a sus dominios extracelulares. Después de ejercer sus efectos, los eCBs son internalizados y degradados en la terminal sináptica, principalmente por hidrólisis. La hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH) metaboliza a la AEA en ácido araquidónico (AA) y etanolamida (EA), mientras que la monoacilglicerol lipasa (MAGL) hidroliza al 2-AG hacia AA y glicerol. La AEA y el 2-AG pueden ser oxidados por la ciclooxigenasa-2 (COX-2), formando prostaglandina-etanolaminas (PG-EA) o ésteres de prostaglandina-glicerol (PG-GE), respectivamente. Además, estos eCBs son también agonistas del receptor huérfano GPR55 (el cual es un candidato potencial para ser el receptor a cannabinoides tipo 3), el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR- γ) y el receptor vanilloide potencial transitorio 1 (TRPV1) (Di Marzo, 2015; Onaivi, 2012). Los compuestos semejantes a los eCBs, como la oleiletanolamida y la palmitoiletanolamida, son moléculas

que tienen semejanza estructural con los eCBs, pero que son incapaces de activar a los receptores a cannabinoides. Sin embargo, comparten las rutas metabólicas con los eCBs y ejercen un "efecto de estímulo", al competir con los eCBs por las enzimas de degradación, lo cual obstaculiza con la inactivación de los eCBs y, consecuentemente, lleva al aumento en sus niveles. Adentro de la célula, los eCBs son llevados hacia el citoplasma por los transportadores celulares intracelulares de eCBs (EIT, por sus siglas en inglés *eCBs intracelular transporters*), que liberan estos compuestos lipídicos a sus diferentes células dianas o también pueden secuestrarlas dentro de la célula (Figura 1) (Costa, 2016).

La transmisión cannabinérgica es retrógrada, es decir, se produce de la neurona postsináptica a la presináptica. La estimulación repetida de la neurona postsináptica da como resultado una elevación en los niveles de Ca^{+2} intracelular, que es la señal para la síntesis de eCBs, los cuales difunden al espacio sináptico y actúan sobre los receptores a cannabinoides presentes en las neuronas presinápticas, con lo cual se disminuye su activación. Asimismo, los eCBs no se almacenan en vesículas, como suele ocurrir con otros neurotransmisores, sino que se sintetizan al momento, además de que existen transportadores específicos para su recaptura (Villagrana, *et al*, 2011).

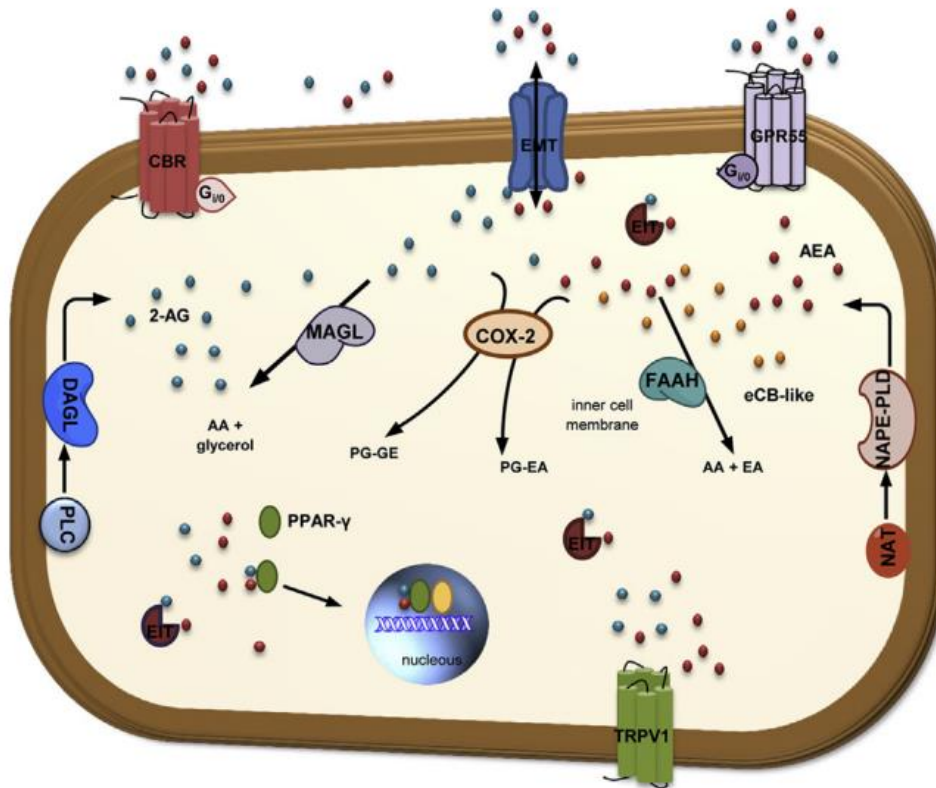


Figura 1. Sistema endocannabinoide. Está compuesto por receptores a cannabinoides, endocannabinoides y enzimas para la síntesis y degradación de estos. Sin embargo, otros receptores pueden ser activados por los compuestos cannabinoides, como los PPAR- γ y los TRPV1. 2-AG: 2-Araquidonil glicerol (bolitas azules); AA: Ácido araquidónico; AEA: araquidonoiletanolamida (bolitas rojas); COX-2: Ciclooxygenasa-2; CBR: Receptor a cannabinoides; EA: Etanolamida; EITs: Transportadores intracelulares de eCB; EMT: Transportadores de membrana de eCB; FAAH: hidrolasa amida de ácidos grasos; GAGL: diacilglicerol lipasa; MAGL: monoacilglicerol lipasa; NAT: N-acetiltransferasa; NAPE-PLD: N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D; PG-EA: prostaglandina-etanolamidas; PG-GE: ésteres de glicerol-prostaglandinas; PLC : Fosfolipasa C; PPARs: Receptores del proliferador activado de peroxisoma; TRPV1: Receptor de potencial transitorio V1. Tomada de (Costa, 2016).

1.1.1 Cannabinoides

Existen cuatro grupos de cannabinoides o fármacos cannabimiméticos que tienen actividad de unión a los receptores a cannabinoides (Figura 2). El primero contiene a los cannabinoides “clásicos”, los cuales poseen una estructura carboxílica con veintidós carbonos y están formados por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno, y se producen naturalmente en la planta *Cannabis sativa*, y como ejemplos están el Δ^9 -

Tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN). También están incluidos en este grupo los análogos sintéticos de los compuestos naturales, los cuales se unen relativamente de una manera no selectiva ya sea al receptor CB1 como al CB2, teniendo como ejemplo el HU-210, el cual tiene una afinidad mucho mayor que el THC (Ver tabla de afinidades, Tabla 1).

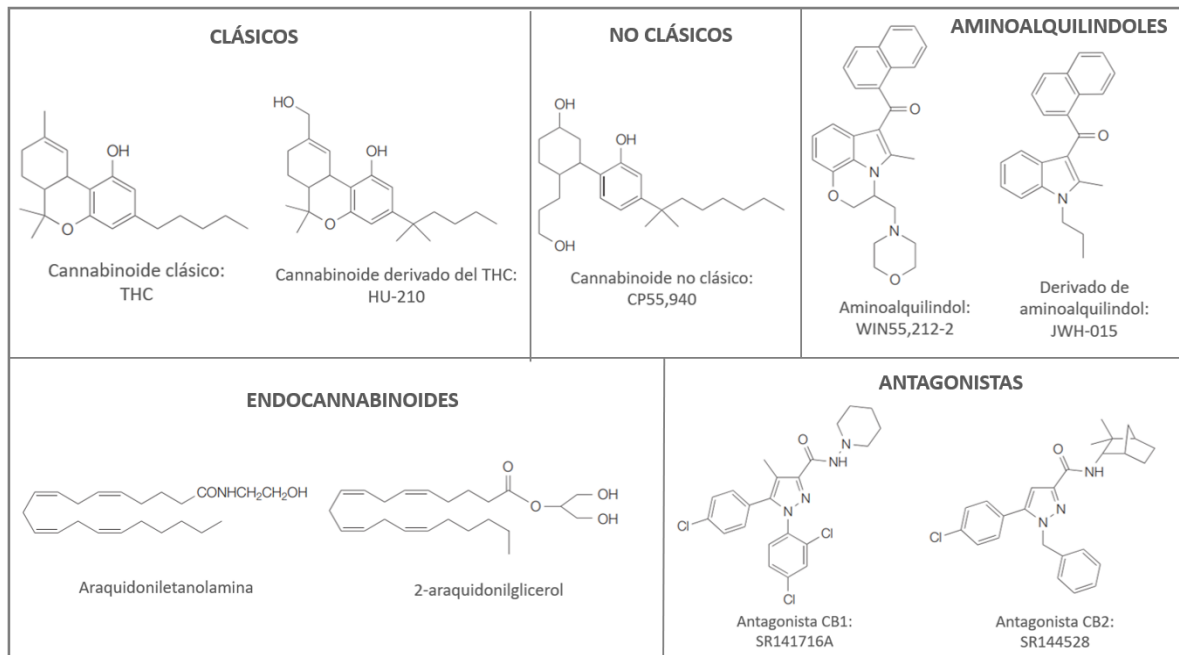


Figura 2. Grupos de cannabinoides. Existen cinco grupos de cannabinoides: clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles, endocannabinoides y antagonistas a los receptores a cannabinoides. Figura tomada y modificada de (Klein, 2005).

El tercer grupo está compuesto por los compuestos denominados aminoalquilindoles, siendo el WIN 55,212-2 el compuesto representativo de este grupo, mientras que el JWH-015 es un ejemplo de compuesto derivado de los aminoalquilindoles. Dentro del cuarto grupo se encuentran los endocannabinoides, que son compuestos eicosanoides que se sintetizan endógenamente, siendo los más estudiados la AEA y el 2-AG. Y por último, el quinto grupo incluye a los antagonistas de los receptores a cannabinoides, como lo son el SR141716A y el SR144528, que se unen a los receptores a cannabinoides CB1 y CB2, respectivamente (Klein, 2005).

La activación de los receptores a cannabinoides, mediante ligandos endógenos o exógenos, puede inducir varias respuestas como modificaciones en el estado de ánimo, como euforia, creatividad, alucinaciones, un aumento en la percepción sensorial y una despersonalización; alteraciones de la percepción sensorial y de la memoria reciente; también pueden aparecer efectos analgésicos, inmunomoduladores (favorecer inmunoestimulación a dosis bajas, mientras que a altas dosis inducen inmunosupresión), antiinflamatorios y antiproliferativos; pueden aumentar el apetito (efecto orexígeno) y tener efectos como antiemético; disminuir la motilidad y secreción gastrointestinal, así como una reducción en el rendimiento psicomotor y de la coordinación motora; anticonvulsionante; así como favorecer una disminución en la presión intraocular y congestión conjuntival; hipotermia; broncodilatación; favorecer una reducción del nivel de la hormona foliculoestimulante, prolactina, hormona luteinizante, testosterona y hormona del crecimiento, así como hormonas relacionadas con la respuesta al estrés; también ejercen efectos cardiovasculares al inducir taquicardia con vasodilatación y un aumento del gasto cardiaco, también favorecen la antiagregación plaquetaria, entre otras (Pascual,2017).

Tabla 1. Características farmacológicas de los principales agonistas cannabinoides. ACEA: Araquidonil-2'-cloroetilamida; ACPA: Araquidonilciclopropilamida; 2-AG: 2-Araquidonilglicerol; THC: Tetrahidrocannabinol. Obtenido de (SEIC, 2002).

	Afinidad (K _i , nM) *		Eficacia relativa	
	CB ₁	CB ₂	CB ₁	CB ₂
<i>ACEA</i>	1,4	> 2000	+++++	—
<i>ACPA</i>	2,2	715	++++	—
<i>2-AG</i>	58,3	145	++++	++
<i>2-AG</i>	13,9***	58***	++++	++
<i>Anandamida</i>	89**	371**	++++	+
<i>CP55,940</i>	0,58	0,69	+++++	+++++
<i>HU-210</i>	0,06	0,52	+++++	+++++
<i>Metanandamida</i>	18	868	++++	—
<i>Δ⁹-THC</i>	40,7	36,4	+++	+
<i>WIN55,212-2</i>	1,89	0,28	+++++	+++++

*Valores bajos de K_i son indicativos de una elevada afinidad por el receptor. **En presencia de PMSF. *** En presencia de inhibidores de la hidrólisis enzimática de 2-AG.

1.1.1.1 WIN 55,212-2

La pravadolina o también conocida como WIN 48,098 es un compuesto aminoalquilindol que fue desarrollado como un inhibidor de la ciclooxigenasa con propiedades no ulcerogénicas y que posee una actividad antinociceptiva potente en relación con los AINES (antiinflamatorios no esteroideos) tradicionales, actividad que también poseen los compuestos cannabinoides, a pesar de ser estructuralmente diferentes (Compton,*et al*, 1992) (Figuras 2 y 3). La pravadolina no se ha usado como analgésico debido a sus efectos tóxicos (Everett, *et al.*, 1993), sin embargo, al activar receptores acoplados a proteína G, se desarrollaron varios compuestos químicos que poseen las mismas características, sin ser tóxicos, y que se han considerado como cannabinoides aminoalquilindoles ya que cumplen las características de la llamada “Tetrada de Actividad Cannabinoide”, las cuales son inducir 1) hipomotilidad, es decir, una reducción de la actividad espontánea; 2) hipotermia; 3) efectos antinociceptivos y, 4) efectos catalépticos. Es así como el compuesto representativo de los aminoalquilindoles sintéticos es el (+)-WIN 55,212-2, la cual es una molécula semirrígida que contiene un núcleo de tres anillos (Figura 3) y posee actividades biológicas semejantes a las producidas por el THC, pero con una estructura química totalmente diferente (Figura 2) y que se utiliza ampliamente en la investigación científica debido a sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Compton, *et al.*, 1992). Tiene mayor afinidad a los receptores a cannabinoides que el THC, es así que para el receptor CB1 posee una $K_i=1.89$ nM (Compton, *et al.*, 1992; SEIC, 2002), y para el receptor CB2 posee una $K_i=0.28$ nM ((SEIC, 2002), mientras que las afinidades del THC para los receptores CB1 y CB2 son 40.7 nM y 36.4 nM, respectivamente (SEIC, 2002), y por lo tanto, se necesitan menores cantidades de este compuesto para producir los mismos efectos que el THC, ya que para obtener una concentración moderada en ratas es necesario administrar 5 mg/kg peso de THC, mientras

que para obtener los mismos efectos utilizando el WIN 55,212-2 es necesario sólo una décima parte, es decir, 0.5 mg/kg de peso.

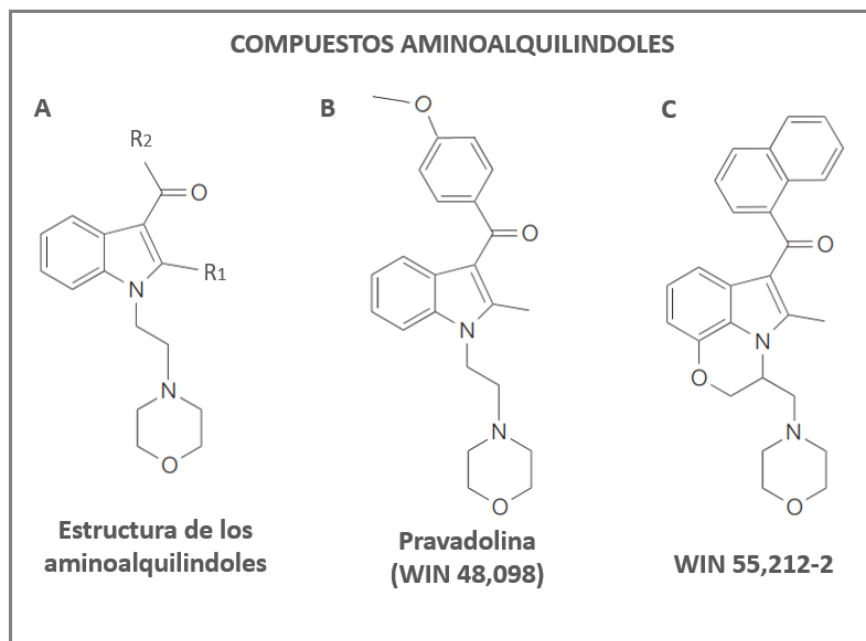


Figura 3. Compuestos aminoalquilindoles. Los compuestos aminoalquilindoles (A) poseen actividades cannabinoides, entre ellos destacan la pravadolina (B), que induce efectos antinociceptivos, sin embargo, también ha demostrado ser tóxico, es por ello por lo que se han sintetizado compuestos que conserven los efectos terapéuticos sin inducir toxicidad, siendo el WIN 55,212-2 (C) el compuesto representativo de este grupo.

La dosis de WIN 55,22-2 utilizada en este estudio (0.5 mg/Kg) corresponde a una dosis moderada equivalente a 5 mg/Kg de THC, la cual es una extrapolación de la estimación, corregida en función de la superficie corporal, peso y ruta de administración, de la dosis habitual en consumidores crónicos de preparados de cannabis (García, 1998), por lo tanto, la dosis utilizada corresponde a una exposición moderada, e incluso baja, de cannabis en humanos. El esquema de administración del WIN 55,212-2 se basó en estudios previos, uno de ellos es el trabajo de Harbison en 1972, en donde reporta que en ratas gestantes que se ponen en contacto con resina de cannabis entre los días 1 y 6 de gestación, se induce la completa reabsorción de los fetos, mientras que, si se ponen en

contacto con extracto de cannabis, se aumenta la frecuencia de malformaciones (Harbison, *et al.*, 1972).

1.1.2 Receptores a cannabinoides

Después de caracterizar la estructura del principal componente psicoactivo del cannabis, el THC (Mechoulam y Gaoni, 1965), el siguiente paso a descubrir era a qué molécula o receptor se debía pegar para ejercer los efectos del consumo de la marihuana, y es así como en 1988 se caracterizó en cerebro de ratas el primer receptor para cannabinoides (Devane, *et al.*, 1988), CB1, mientras que en el año 1993 se descubriría el segundo receptor cannabinoide a nivel periférico en ratas, el que posteriormente sería conocido como el receptor CB2 (Munro, *et al.*, 1993).

Estos dos descubrimientos de los receptores a cannabinoides no hicieron más que plantear una pregunta más importante, ¿por qué existen en el organismo receptores que responden a los compuestos cannabinoides presentes en la marihuana? La respuesta se conoció pocos años después del descubrimiento del receptor CB2, al descubrirse dos compuestos endógenos con actividad cannabinoide, los denominados endocannabinoides. El primero fue la etanolamida del ácido araquidónico, mejor conocida como anandamida (AEA), palabra que viene del sánscrito *ananda*, que significa “alegría”, “felicidad” o “felicidad suprema” (Devane, *et al.*, 1992), mientras que el segundo compuesto fue el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam, *et al.*, 1995). Se producen principalmente en el hipocampo, tálamo, cuerpo estriado, corteza cerebral, puente troncoencefálico, cerebelo y médula espinal (Rodríguez, *et al.*, 2005).

Los receptores a cannabinoides son dos, CB1 y CB2, y son miembros de la familia de los receptores acoplados a proteína G, se diferencian tanto en su secuencia de aminoácidos (Figura 4), así como en su distribución en el organismo (Rodríguez, *et al.*, 2005).

El primer receptor a cannabinoides, CB1, fue caracterizado en 1988 en cerebro de rata (Devane, *et al.*, 1988) y es considerado el receptor metabotrópico más abundante en

el sistema nervioso central (SNC), siendo en los núcleos de los ganglios basales, hipocampo, corteza cerebral, cerebelo e hipófisis donde más se expresa, lo que correlaciona con su rol en el control de un amplio rango de condiciones fisiológicas y patológicas como el desarrollo cerebral, la función motora, cognición, aprendizaje, memoria, percepción del dolor, analgesia, regulación del apetito y temperatura corporal, neuroinflamación (Busquets, *et al.*, 2016; Galiègue, *et al.*, 1995; Howlett y Abood, 2017), además de que se les ha visto envueltos en desórdenes psiquiátricos, neurológicos y del neurodesarrollo (Busquets, *et al.*, 2016). El CB1 también se expresa, en menor grado que en el SNC, en órganos periféricos como la glándula adrenal, corazón, pulmones, próstata, hígado, útero, ovarios, testículos, vasos deferentes, médula ósea (Galiègue, *et al.*, 1995), tejido graso, tracto gastrointestinal, cavidad bucal, sistema cardiovascular, páncreas, piel y músculo esquelético (Busquets, *et al.*, 2016), así como en órganos inmunológicos como en amígdalas y bazo, y dentro de las subpoblaciones celulares se expresa en células B, células NK, monocitos, células polimorfonucleares, células T CD8⁺ y células T CD4⁺, esto con base a la expresión de RNA mensajero en muestras de humanos (Galiègue, *et al.*, 1995).

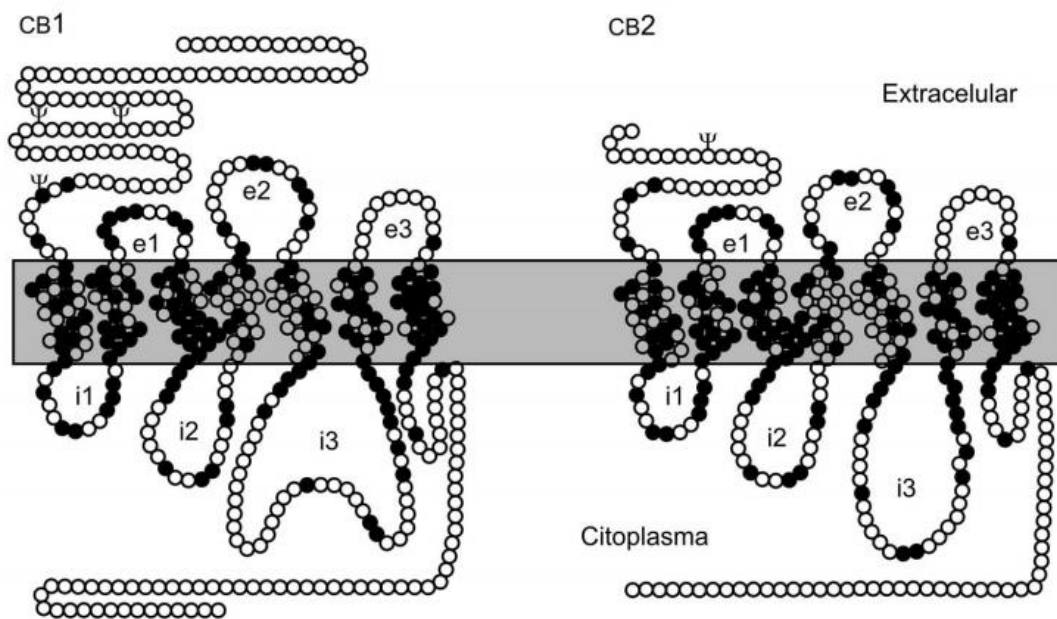


Figura 4. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2 en roedores. Los receptores tienen siete dominios transmembranales. ● Aminoácidos comunes a los dos receptores; ○

aminoácidos diferentes; Ψ sitios consenso de glicosilación. **e1, e2, e3** son asas extracelulares; **i1, i2, i3** son asas intracelulares. (Rodríguez, *et al.*, 2005)

En 1993 se hizo la caracterización molecular de un receptor a cannabinoides en la periferia, específicamente en el bazo de ratas, denominado el receptor CX5, que después sería conocido como el receptor CB2 (Munro, *et al.*, 1993). Así como el receptor CB1 se encuentra expresado ampliamente en el SNC, el receptor CB2 también puede expresarse en áreas del SNC como en células de la microglía, tallo cerebral, corteza cerebral y cerebelo (Jutras, *et al.*, 2009), aunque su expresión es mucho menor en comparación a la del receptor CB1. Asimismo, como ya se mencionó, se encuentra más expresado en la periferia, como en el intestino, glándulas suprarrenales, corazón, pulmón, próstata, hígado, útero, ovarios, testículos, conductos deferentes, médula ósea, timo, amígdalas, entre otros (Galiègue, *et al.*, 1995; Howlett y Abood, 2017), sin embargo, es particularmente abundante en tejidos del sistema inmunológico (de 10 a 100 veces mayor que el CB1) como los son amígdalas, bazo, células mononucleares de sangre periférica y timo, de mayor a menor expresión, según los niveles del RNA mensajero para el receptor CB2; asimismo, dentro de las subpoblaciones leucocitarias, se encuentra de mayor a menor expresión, en células B, células NK, monocitos, células polimorfonucleares, células T CD8⁺ y células T CD4⁺, (Galiègue, *et al.*, 1995).

La señalización principal de los compuestos cannabinoides, ya sean exógenos o endógenos se produce por la activación de los receptores clásicos CB1 y CB2. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a distintos subtipos de proteínas Gi/o. Sus mecanismos transduccionales mejor descritos comprenden la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, la modulación de algunos canales iónicos (aumentan la conductancia del potasio y disminuyen la entrada de calcio) y cambios en la síntesis de algunas proteínas (Villagrana, *et al.*, 2011).

La unión de los cannabinoides a sus receptores desencadena una cascada de segundos mensajeros. Inicialmente activan una proteína G que, a través de la subunidad α , modula la actividad de la enzima adenilato ciclasa, la cual, a su vez, regula los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que modula la actividad de la proteína cinasa A

(PKA). Finalmente, la activación de cinasas lleva a la fosforilación de diversas proteínas, incluyendo canales iónicos, proteínas de vesículas sinápticas, proteínas que regulan la transcripción genética y enzimas (Rodríguez, *et al.*, 2005).

También se ha demostrado que los compuestos cannabinoides inhiben canales de calcio dependientes de voltaje tipo N, P, Q y L, y que pueden activar o inhibir corrientes de potasio (Figura 5). El efecto combinado sobre estos dos tipos de canales parece la base de la inhibición que los cannabinoides ejercen en la liberación de otros neurotransmisores. (Rodríguez *et al.*, 2005).

Ambos receptores a cannabinoides regulan también la fosforilación y activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK1/2, JNK y p38 (Figura 5). Bajo ciertas circunstancias los receptores cannabinoides pueden señalizar a través de una proteína G estimulante Gs y Gq. Además, se ha reportado que los receptores CB forman dímeros con otros receptores como los dopaminérgicos D2 y los de orexina OX1, lo que otorga gran flexibilidad a la señalización producida por estos compuestos (Villagrana, *et al.*, 2011).

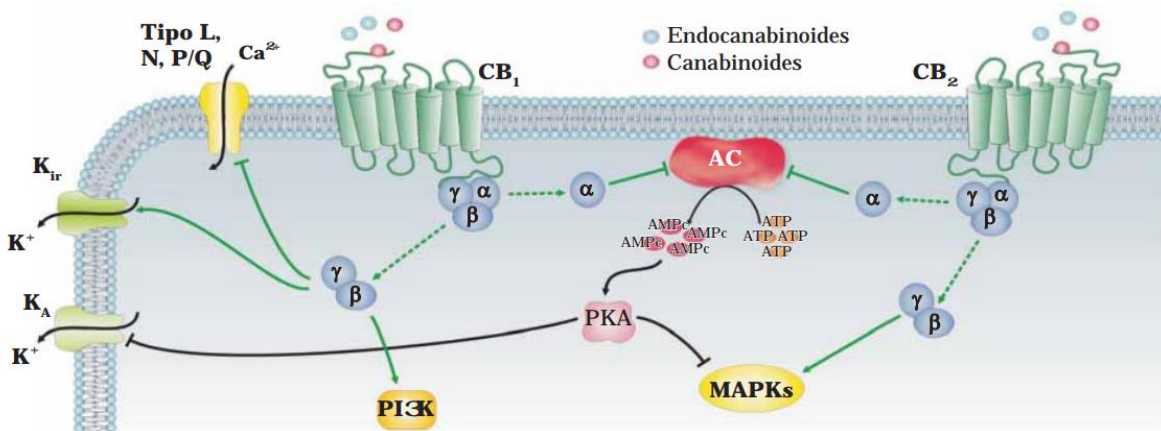


Figura 5. Señalización clásica de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2. La unión del ligando al receptor produce la activación de proteínas G inhibidoras que entonces se disocian en la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$. La subunidad α inhibe a la enzima adenilato ciclasa (AC). Esto se traduce en menor producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y, por lo tanto, en menor actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), lo cual produce, en última instancia, una disminución de la síntesis de algunas proteínas. Por su parte, el complejo formado por las subunidades $\beta\gamma$ activa la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y de la cinasa de fosfatidilinositol (PI3K). Otros efectos mediados por el receptor CB1 son una disminución de la

actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje y un aumento de la conductancia de los canales rectificadores de potasio, lo cual produce hiperpolarización de la célula. Obtenido de (Villagrana, *et al.*, 2011).

Además de los receptores CB1 y CB2, los cannabinoides pueden actuar sobre otros receptores, por ejemplo, la AEA inhibe canales de calcio tipo T, además tiene efecto sobre los receptores TRPV1 y los PPAR, los primeros son receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) que pertenece a la familia de receptores a vanilloides involucrados en procesos de dolor, sobre el que actúa la capsaicina, compuesto que le da el carácter picante a ciertos alimentos, y la AEA al actuar sobre TRPV1 produce un efecto analgésico; mientras que los receptores activados por proliferadores de peroxisomas, los PPAR por sus siglas en inglés, son receptores nucleares que controlan procesos como proliferación y diferenciación celular, así como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Villagrana, *et al.*, 2011).

1.2 SEC y sistema inmunológico

Como ya se mencionó anteriormente, al estar los receptores CB1 altamente expresados en el SNC, su activación explica los efectos biológicos que se presentan cuando una persona consume marihuana, como euforia, relajación, coordinación motora disminuida, percepción distorsionada del tiempo, ojos rojos, hambre, boca seca, dilatación de pupilas y conducta hedonista, ésta última debido a que se activan los receptores CB1 que se encuentran en el núcleo accumbens, responsable de las emociones gratificantes, lo que ocasiona que el consumidor desee probar una vez más la marihuana, con el fin de sentirse bien.

Las células del sistema inmunológico expresan los receptores CB1 y CB2, siendo este último el que posee mayor expresión, además de que también expresan toda la maquinaria responsable del metabolismo de los endocannabinoides y se sabe que están ahí para modular la respuesta inmunológica.

Los primeros estudios se enfocaron en los efectos del consumo de marihuana o el THC en el funcionamiento de las células inmunológicas. Por ejemplo, los macrófagos alveolares obtenidos de personas fumadoras de marihuana, son menos eficaces para matar bacterias o células provenientes de tumores, y al ser estimulados con LPS, se encontraron niveles bajos de TNF α , GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, por sus siglas en inglés) así como de IL-6, (Baldwin, *et al.*, 1997). En cultivos de células inmunes como los linfocitos T y macrófagos, el THC induce apoptosis en estas células a través de la regulación de la actividad de la proteína Bcl-2 y la caspasa-1, además el tratamiento de macrófagos y esplenocitos con el THC provoca fragmentación del ADN, así como la supresión del RNA mensajero y Bcl-2, además de que en los macrófagos se aumenta el procesamiento y la liberación de IL-1, proceso que se ha asociado con la apoptosis (Zhu, *et al.*, 1998). Además de los macrófagos y linfocitos T, también se ha determinado en base a estudios en roedores y en algunos casos en humanos, que el THC tiene un efecto supresor sobre las células B y células NK (Klein, *et al.*, 2003).

Se conoce que la AEA tiene un papel inmunosupresor cuando se agrega a linfocitos T activados, actuando principalmente a través del receptor CB2, ya que puede reducir la proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, además en estas mismas subpoblaciones suprime la producción de TNF α , IFN γ e IL-2 a partir de linfocitos T activados, mientras que la producción de IL-17 se suprime en los linfocitos T CD4⁺ (Cencioni, *et al.*, 2010). Desde otro punto de vista, el sistema endocannabinoide también se puede ver afectado por la producción de citocinas al regular las enzimas que participan en la degradación de los eCBs, por ejemplo, la IL-10 y la IL-4 pueden estimular la actividad de la FAAH para degradar a la AEA, mientras que el IFN γ y la IL-12 la disminuyen (Maccarrone, *et al.*, 2001), éstos hallazgos son importantes durante la gestación, ya que se ha dicho que cuando existen altos niveles de anandamida puede ocurrir un aborto espontáneo, además de que durante el embarazo el perfil predominante es de tipo Th2.

En un modelo de infección con *Legionella pneumophila* se observó que el THC, al ser administrado poco antes de la infección, suprimió la inmunidad mediada por células, favoreció una respuesta de tipo Th2 al encontrarse elevada la IL-4, y encontrándose

disminuida la producción de citocinas IFN γ e IL-12, y por lo tanto, se vio incrementada la mortalidad ante la infección con *Legionella pneumophila* en aquellos ratones que habían sido tratados con el THC (Klein, *et al.*, 2000). En el caso de una infección por *Legionella pneumophila* una respuesta de tipo Th1 es benéfica al hospedero para eliminar a las bacterias, y el tratamiento con cannabinoides, como lo es el THC, afectó la respuesta inmunológica, en contraste con la artritis reumatoide, en donde los procesos de tipo Th1 son perjudiciales al paciente, y es así que se ha reportado que el WIN 55,212-2 en un modelo de artritis reumatoide reduce la producción de IL-6, IL-8 y metaloproteasas de la matriz, inducida por TNF a concentraciones menores de 2 μ M, mientras que a concentraciones mayores inhibe por completo la producción de IL-6 e IL-8, además de que disminuye la adhesión y proliferación de los fibroblastos sinoviales, siendo benéfico ya que altas cantidades de IL-6, IL-8, metaloproteasas de la matriz y fibroblastos sinoviales que inducen una destrucción del cartílago (Lowin, *et al.*, 2016).

Los anteriores fueron algunos ejemplos que demuestran que el sistema endocannabinoide puede modular o ser modulado por el sistema inmunológico, y por lo tanto ambos sistemas no son excluyentes uno de otro.

1.3 Uso del cannabis a nivel mundial

El World Drug Report del año 2016 menciona que el cannabis sigue siendo la droga ilegal más cultivada, producida, traficada y consumida en todo el mundo, siendo consumida por aproximadamente 3.8% de toda la población mundial, lo que equivalió en el 2014 a un estimado de 183 millones de personas (UNODC, 2016), y para el año 2017, 188 millones de personas la consumieron (UNODC, 2019). En el reporte del año 2015 dice que el uso de la marihuana se sigue manteniendo estable conforme pasan los años, siendo la más consumida (UNODC, 2015), seguida por el consumo de cocaína, alucinógenos como el LSD y éxtasis, inhalantes, metanfetaminas y heroína (UNODC, 2016) (Figura 6).

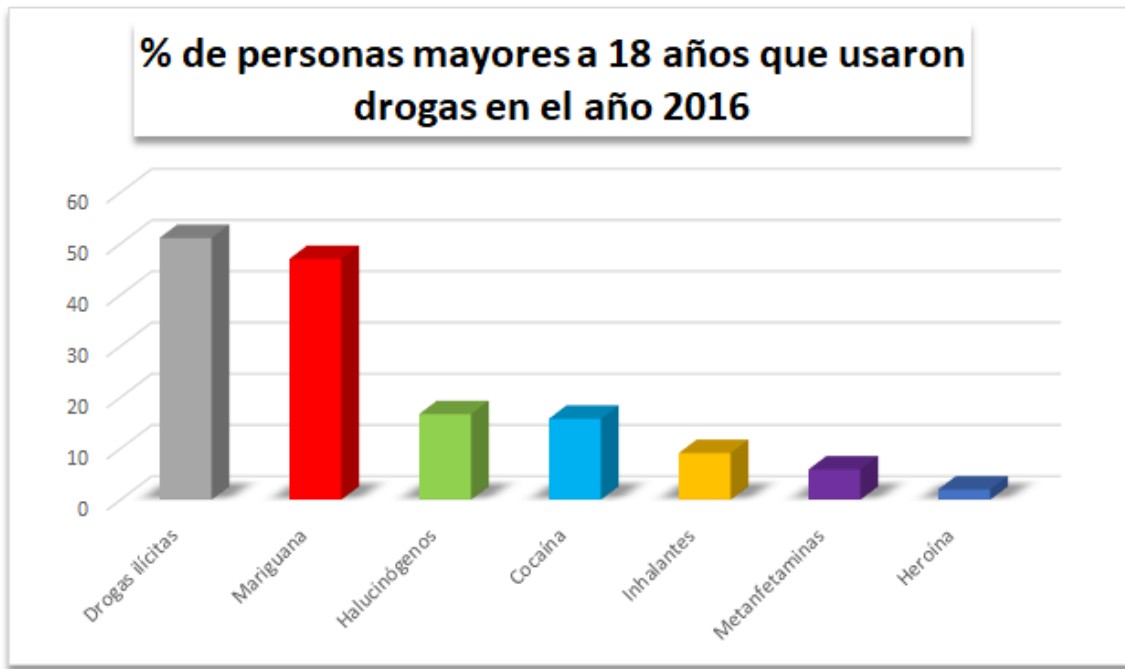


Figura 6. Porcentajes de personas mayores a 18 años que utilizaron drogas durante 2016. Datos obtenidos de Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2017.

1.3.1 Uso del cannabis por mujeres embarazadas

Se sabe que, por cada dos hombres, hay una mujer que consume marihuana (UNODC, 2015), además de que se sabe que es la droga más consumida en personas en edad reproductiva, de 18 años en adelante (UNODC, 2016). Las posibles causas del consumo de cannabis por parte de las mujeres, independientemente de factores socioeconómicos, pueden ser dos: la primera y la más común, es el consumo con fines recreacionales, y la segunda, es con fines medicinales, por ejemplo, en pacientes con algún cáncer y que están siendo sometidos a sesiones de quimioterapia, consumen marihuana para aliviar las náuseas, vómitos además de estimular el apetito, sin embargo, existe otro fin medicinal muy interesante, y es el consumo por parte de mujeres embarazadas para atenuar las náuseas y vómitos que se presentan durante las primeras etapas del embarazo, sobre todo durante el primer trimestre.

Con respecto al número de mujeres que consumen marihuana durante el embarazo, son pocas las mujeres embarazadas que admiten el uso consciente del

cannabis. No hay reportes en población mexicana, sin embargo, en los Estados Unidos, la National Survey on Drug Use and Health (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2017) en su reporte para el año 2016 menciona que la marihuana es la droga ilícita más consumida por mujeres en edad reproductiva, seguida por drogas psicoterapéuticas como la codeína, inhalantes, metanfetaminas, cocaína y heroína (Figura 7). La marihuana fue consumida por un 10.8% de la población estudiada, y de éstas aproximadamente 111000 mujeres consumieron marihuana durante el embarazo; además, reportó que durante el primer trimestre de embarazo es cuando se presenta un mayor consumo, en comparación al segundo y tercer trimestre del embarazo (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2017), pasando del 41% durante el primer trimestre al 18% en el tercer trimestre (Sonon, *et al.*, 2015), pudiendo ser perjudicial al producto, debido a que es una etapa crítica del desarrollo. Además, se espera que el consumo de marihuana por mujeres embarazadas se incremente debido a que en varios países o estados se está legalizando, ya sea con fines medicinales e inclusive, con fines recreacionales.

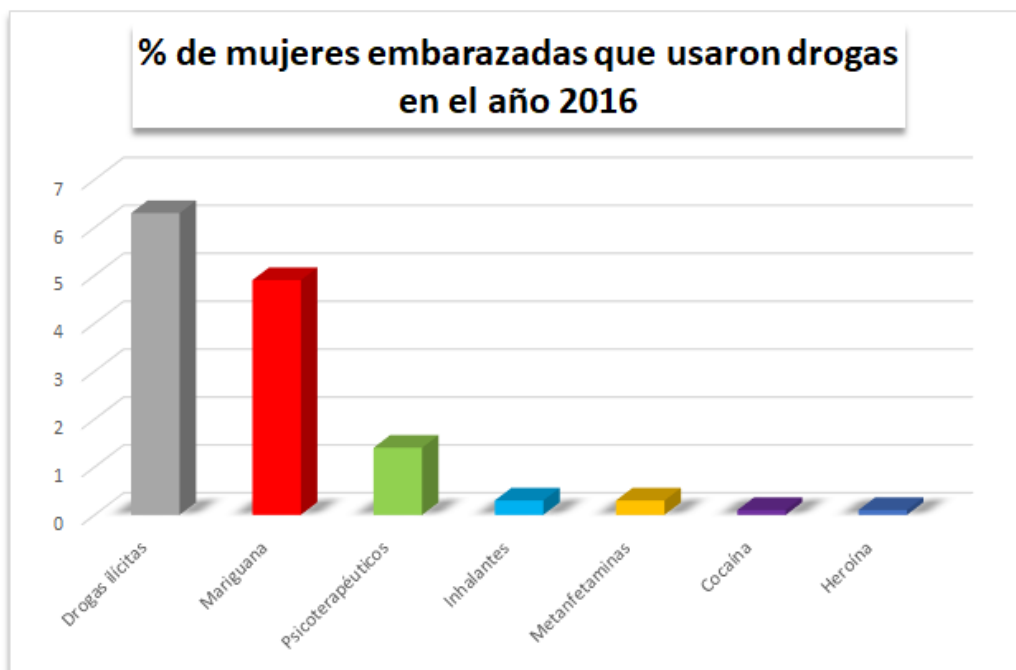


Figura 7. Porcentajes de mujeres embarazadas que utilizaron drogas durante 2016. Datos obtenidos de Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2017.

El embarazo es una etapa crítica del desarrollo y el producto puede verse comprometido por la exposición a agentes externos. Se ha visto que durante la gestación el sistema endocannabinoide juega un papel importante, por ejemplo, el 2-AG y la AEA favorecen el desarrollo fetoplacentario, y si llega a presentarse un defecto en la vía de señalización de estos endocannabinoides puede causar complicaciones en el embarazo (Bambang, 2010).

Se ha encontrado RNAm del receptor CB1 en diferentes tejidos y durante diferentes períodos de desarrollo. Por ejemplo, en humanos, se ha detectado en células progenitoras neocorticales y en la zona ventricular entre las semanas 9 a 17 de gestación (Zurolo, 2010). En estudios con ratones knockout para CB1 se han reportado nacimientos prematuros, crías con menor peso al nacer, además de que altera los niveles séricos de progesterona y estradiol, mientras que la primera se ve reducida a partir del día 19 de gestación, se incrementa entre los días 16 y 18 de gestación (Wang, *et al.*, 2008), e inclusive se ha documentado que hasta en un 40 % de ratonas gestantes deficientes en el receptor CB1 ocurre la pérdida del embarazo, al producir un retraso en el transporte de los embriones oviductales e impedir la implantación oportuna en el útero (Wang, *et al.*, 2004).

Por otra parte, hay genes que están involucrados en la síntesis de AEA, 2-AG y ácido araquidónico, como Plc, Mgll, Nat, Faah, Pld, Ptgs1 y Ptgs2, y que se han propuesto usarlos como biomarcadores clínicos para identificar y/o predecir un parto prematuro o espontáneo, como el gen inducible Ptgs2, quien tiene un papel importante en la ovulación, implantación y decidualización, además de que junto con las prostaglandinas originadas en la membrana fetal intervienen para que se lleve a cabo una labor de parto normal, al aumentar la sensibilidad miometrial a las prostaglandinas y producir contractibilidad, mientras que una expresión aberrante de Ptgs2 se ha asociado a abortos espontáneos; también la fosfolipasa Plcd4, la cual sirve para la síntesis del ácido araquidónico, se ha sugerido como un biomarcador ya que se ha visto reducida su expresión justo antes de la labor de parto (Vaswani, *et al.*, 2015). La información anteriormente mencionada nos indica que desde la gestación el sistema

endocannabinoide está presente y ya es funcional, sabiéndose que la señalización cannabinoide modula aspectos importantes de la reproducción, tales como la ovogénesis, foliculogénesis, espermatogénesis, fertilización, implantación, decidualización e incluso el trabajo de parto (Costa, 2016). A ser la gestación una etapa crítica del desarrollo, un estímulo externo, como es el caso del consumo de marihuana por parte de la madre podría estar ejerciendo efectos directos sobre el feto, llegando incluso a ser dañino, como lo es la administración exógena de AEA, al reducir los niveles de hormona luteinizante y prolactina en las ratas gestantes, además de inhibir la síntesis de prostaglandinas, y observarse un aumento en la frecuencia de mortinatos, es decir, la AEA administrada exógenamente induce efectos similares a los que se producen por la administración de THC (Wenger, *et al.*, 1997). Asimismo, la anandamida juega un papel importante durante toda la gestación, ya que se ha visto que para que existan una implantación y progresión exitosas deben de tenerse niveles plasmáticos bajos de AEA y, al término del embarazo deben de existir niveles altos durante el trabajo de parto, haciendo a la AEA un buen marcador para prevenir abortos durante el primer trimestre de gestación, ya que se ha hecho la asociación de que cuando existen niveles elevados de este endocannabinoide durante el primer trimestre se presentan abortos espontáneos, debido que a altas dosis de AEA se le han atribuido efectos antiproliferativos (Habayeb, *et al.*, 2004).

1.3.2 Efectos postnatales del uso del cannabis durante la gestación

Desde la década de los 70's se conoce que el THC puede almacenarse en varios tejidos, como el hígado y en tejido adiposo, se almacena rápidamente y se libera lentamente, además de puede atravesar la barrera placentaria, llegando a estar en contacto directo con el feto, ya que se han encontraron cantidades de THC en el líquido amniótico, placenta e inclusive en los productos (Harbison, *et al.*, 1972), así como también se ha encontrado THC presente en la leche materna, poniendo a las crías en contacto aún después del nacimiento (Jakubovic y McGeer, 1973). Recientemente se reportó que en

dos tercios de muestras de leche materna proveniente de mujeres consumidoras de marihuana, se encontraba presente THC hasta por seis días después de que habían consumido (Bertrand, *et al.*, 2018).

También hay que tener en cuenta que los receptores a cannabinoides ya se encuentran activos en estadios tempranos del desarrollo, por ejemplo, en ratas se han encontrado niveles medibles de mRNA para CB1 en fetos de 14 días de gestación, a pesar de que ha sido difícil establecer en qué regiones en específico debido a la inmadurez del cerebro a esta edad, sin embargo, ya a los 16 días es posible determinar que, en el hipocampo, cerebelo, núcleo caudado y putamen presentan una señal marcada para el mRNA para CB1, y se empieza a determinar en otras áreas como la corteza cerebral, áreas del mesencéfalo y troco encefálico (Berrendero, *et al.*, 1999). Con muestras de abortos voluntarios y muestras obtenidas en oficinas de médicos forenses, se ha determinado que en humanos se encuentran bajas densidades de unión específica a la región desplazable por el THC a las 14 semanas de gestación, llegándose a niveles similares a los de los adultos hasta el final del segundo trimestre, lo que corresponde la semana 24, aunque el patrón de distribución en la etapa prenatal y adulta son diferentes, y varían dependiendo del área del SNC que se estudie (Biegon y Kerman, 2001), además, en la etapa adulta, los sitios de unión a receptores cannabinoides en áreas del cerebro anterior donde controlan funciones cognitivas; el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo se asocian con el control del movimiento; y en áreas del cerebro posterior se asocian con el control de funciones motoras y sensoriales del sistema nervioso autónomo (Glass, *et al.*, 1997), interesantemente son zonas que cuyas funciones se ven alteradas o modificadas durante el consumo de marihuana.

Al estar el producto en un contacto directo con el THC, desde antes y después de nacer, se han hecho estudios para observar si esta exposición puede o no afectar al individuo después de nacido.

Existen tres estudios prospectivos longitudinales de cohorte humano, que han seguido y evaluado a la descendencia expuesta al cannabis desde el periodo fetal hasta la adultez joven: el Ottawa Prenatal Prospective Study (OPPS) (Fried, 1980); el Maternal Health Practices and Child Development Study (MHPCD) y el Generation R Study (Hofman,

et al., 2004), que conjuntamente han aportado información relevante en cuanto a las consecuencias de la exposición gestacional al cannabis.

En bebés nacidos de mujeres que fumaban marihuana antes y durante el embarazo se han asociado anormalidades en el sistema nervioso, como por ejemplo, presentan temblores y sobresaltos incrementados (Fried, 1980; Fried y Makin, 1987), así como una menor habituación a estímulos visuales (Fried y Makin, 1987), en comparación a aquellos bebés cuyas madres no consumieron la droga, interpretándose como una inmadurez de sistema nervioso (Figura 8). De manera interesante, drogas que se consideran legales también pueden afectar a bebés si el consumo fue durante la gestación, tal es el caso del tabaco que también provoca un aumento en los temblores además de una peor habituación auditiva y, por otro lado, el consumo de alcohol, aunque sea relativamente bajo se ha relacionado con un aumento en la irritabilidad neonatal (Fried y Makin, 1987).

También se ha reportado que la exposición gestacional a marihuana afecta la calidad del sueño en niños de tres años, ya que presentan un mayor número de despertares nocturnos, así como mayores tiempos de vigilia, haciendo menos eficaz su sueño (Day, 1995).

Se han hecho seguimientos a los hijos de madres consumidoras de marihuana, y así se ha determinado que estos hijos son más propensos a consumir drogas a edades adultas, siendo a los 14 años la edad estimada de inicio del consumo de marihuana (Day, *et al.*, 2006). Dependiendo de la cantidad de cigarrillos de marihuana que las madres hayan consumido durante el embarazo será el consumo de sus hijos en edades adultas, así, las madres que consumieron uno o menos cigarrillos al día se consideran que tuvieron un consumo leve o moderado, mientras que las que consumieron más de un cigarrillo al día se consideraron con un consumo alto de marihuana. Los resultados vistos en los hijos masculinos de 22 años de edad de madres con un consumo alto, fueron interesantes. En primer lugar, se encontró que un 90.9% de estos hijos se iniciaron en el consumo de la marihuana, en comparación al 79.2% de los individuos cuyas madres no consumieron marihuana. Asimismo, el consumo de la misma en el último año previo al estudio, fue de 62.3% en comparación con el 44.1% de individuos no expuestos; en segundo lugar, se reportó el promedio diario de cigarrillos de marihuana, obteniéndose 1.7 en comparación

con un 0.7 de los hijos provenientes de madres no consumidoras; entendiéndose que un promedio diario de cigarrillos de 0.4 equivale a consumir 3 cigarrillos por semana, mientras que un promedio de 0.89 equivale a un cigarrillo al día; y en tercer lugar, se determinó que además de consumir marihuana, también se incrementó en consumo de otras drogas, como la cocaína, anfetaminas y barbitúricos (Sonon, *et al.*, 2015). En la figura 8 se resumen los efectos posnatales de la exposición prenatal a cannabis sobre el desarrollo en humanos, a diferentes etapas del desarrollo, como al nacimiento, infancia temprana y tardía, adolescencia y edad adulta (Morris, *et al.*, 2012).

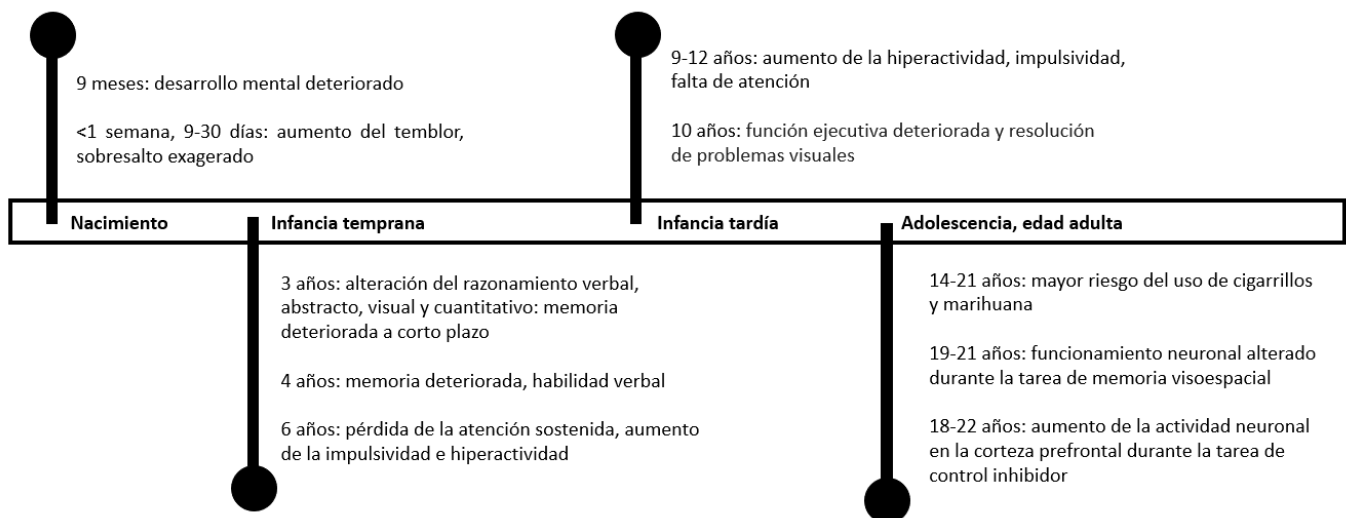


Figura 8. Efectos posnatales del desarrollo asociados con la exposición prenatal al cannabis en humanos a diferentes etapas. Modificado y obtenido de Morris, *et al.*, 2012.

Se ha reportado también que la administración de THC en ratonas gestantes ejerce efectos a nivel gonadal y en parámetros reproductivos. Por ejemplo, utilizando ratonas que recibieron oralmente 50 mg/Kg de peso de THC o CBN durante la gestación y

lactancia, se vio que las crías machos adultas presentaban testículos de menor tamaño, en comparación a los que no recibieron el tratamiento, así como niveles plasmáticos elevados de hormona luteinizante durante y después de su maduración sexual, mientras que aquellas crías que fueron tratadas gestacionalmente con el CBD presentaron niveles reducidos de testosterona y de hormona luteinizante sólo durante el periodo prepuberal, ya que cuando alcanzaban la madurez sexual los niveles de estas dos hormonas se reestablecían a niveles normales, pero los niveles de la hormona folículo estimulante se encontraban reducidos (Dalterio, 1980), estos cambios se deben a que el THC y el CBN interfieren con la esterasa de colesterol testicular, la que provee los precursores para la producción de testosterona. La administración de THC en la última semana de gestación bloquea la oleada de testosterona al DG18, reduce los niveles plasmáticos fetales de T, y en animales controles surge una oleada de testosterona al DG18 que actúa sobre el cerebro para organizar el desarrollo de estructuras neuronales sexualmente dimórficas que subyacen a las diferencias sexuales en el comportamiento y la secreción de gonadotropinas, en la edad adulta se inhibe el comportamiento copulatorio y disminuye la secreción de prolactina, los machos expuestos a THC no eyaculan, y se presenta un aumento en la latencia de monta. En las crías hembras y expuestas al THC durante los primeros cinco días postgestacionales, se muestran ciclos de estró irregulares, al disminuirse las concentraciones de hormona luteinizante, hay ciclos estrales irregulares y la mayoría muestra un comportamiento de lordosis disminuido. La última semana de gestación es un periodo crítico en donde ocurren la diferenciación del eje neuroendócrino y se presentan cambios en el desarrollo del SI (Dalterio, 1980; Murphy, *et al.*, 1995).

Otro cannabinoide con el que se han visto efectos sobre el sistema endócrino es el cannabinoide sintético HU-210, el cual es entre 200 y 400 veces más potente que el THC, y administrado en ratas gestantes del DG5 al DG24 a dosis bajas induce un aumento en los niveles de hormona luteinizante y prolactina, mientras que a dosis altas induce un aumento de los niveles de corticosterona, medidos en la edad adulta, y los niveles de hormona del crecimiento y la hormona folículo estimulante no se ven afectados. Los niveles reducidos de corticosterona se correlacionaron a una respuesta disminuida del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (del Arco, *et al.*, 2000).

En cuanto al cannabinoide sintético WIN 55,212-2 se ha reportado que la administración durante la gestación induce consecuencias en la descendencia, sobre todo, a nivel cognitivo. A dosis de 1 mg/kg de peso y administrado entre los días gestacionales 5 al 20, resulta en un número menor de crías, además de ser de un tamaño menor, asimismo, el porcentaje de mortalidad aumentó significativamente durante la primera semana de nacidas, en comparación a los grupos control, tratados con vehículo y las ratas tratadas con sólo la mitad de la dosis, es decir 0.5 mg/Kg de peso (Shabani, *et al.*, 2012), dosis con la cual, además, no se presentan malformaciones ni signos de toxicidad (Antonelli, *et al.*, 2005).

Administrando el WIN 55,212-2 a una dosis de 0.5 mg/Kg de peso, se ha observado que se inducen efectos a largo plazo sobre la memoria. En crías de 10 a 12 días de edad se presenta un peor rendimiento en el rastreo (Antonelli, *et al.*, 2005); a los 12 y 40 días presentan una conducta hiperactiva (Mereu, *et al.*, 2003) y a los 80 días se encontró mediante pruebas de evitación pasiva que eran menos eficaces para aprender a evitar estímulos aversivos (Antonelli, *et al.*, 2005). La alteración en la memoria de las crías de entre 40 y 80 días de edad se atribuyó a que estos animales presentaron alteraciones en la potenciación a largo plazo en el hipocampo y a la liberación de glutamato (Mereu, *et al.*, 2003); así como también se ha determinado que estas ratas presentan una reducción en el número de la población neuronal cortical, así como una disminución en la actividad del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Antonelli, *et al.*, 2005), así como en los niveles de glutamato extracelulares (Castaldo, *et al.*, 2007), con lo cual se puede decir que hay un déficit en la neurotransmisión cortical glutamatérgica, y por lo cual se están viendo afectados el aprendizaje y disminución de la reactividad emocional de las ratas expuestas a WIN 55,212-2 (Antonelli, *et al.*, 2005), demostrando que la exposición *in utero* al cannabinoide sintético WIN 55,212-2 tiene un fuerte impacto en la función del cerebro maduro (Castelli, *et al.*, 2007; Mereu, *et al.*, 2003). Además, induce alteraciones a largo plazo en el SEC en otras áreas del SNC como el cuerpo estriado y el sistema límbico, que regulan funciones como la actividad motora y el comportamiento emocional (Castelli, *et al.*, 2007).

También se ha demostrado mediante cortes histológicos, que presentan atrofia en la corteza del cerebelo, al encontrarse una menor densidad de neuronas de Purkinje, además de que se encontraron alteraciones en las funciones motoras y de aprendizaje y memoria, todo esto medido a diferentes tiempos, siendo el máximo, 7 semanas de edad (Shabani, *et al.*, 2012).

Los estudios mencionados sugieren que, si el WIN 55,212-2, administrado en ratas gestantes, afecta el funcionamiento del sistema nervioso de las crías, también podría inducir efectos sobre otros sistemas como, por ejemplo, el sistema inmunológico.

1.3.3 ¿Por qué se piensa que la administración gestacional del cannabinoide WIN 55,212-2 puede afectar el funcionamiento del SI de la descendencia?

Existe poca información acerca del impacto real del consumo de marihuana durante la gestación sobre el funcionamiento del sistema inmunológico, y se ha reportado que, dependiendo de las dosis utilizadas, es el efecto obtenido, pudiendo estimular o suprimir funciones celulares. Por ejemplo, en células B humanas coestimuladas con anticuerpos anti-Igs o anti-CD40 y en presencia de concentraciones en el rango nanomolar de THC, o con los cannabinoides sintéticos CP55,940 y WIN 55,212-2, se incrementa la proliferación de las células B de manera dependiente de la dosis, al ser capaces de aumentar la síntesis de DNA (Derocq, *et al.*, 1995).

La utilización de modelos experimentales en animales, así como el uso de cannabinoides sintéticos ha permitido tener un poco más de información al respecto, y es así que al administrar en ratas gestantes el cannabinoide sintético HU-210 se encontraron en la edad adulta cambios mínimos sobre componentes del sistema inmunológico. Por ejemplo, a dosis altas del cannabinoide se ven disminuidos los linfocitos CD4⁺ en bazo; los linfocitos B se encuentran disminuidos en sangre periférica, y en el timo no se encontró ninguna subpoblación alterada. En el mismo estudio, se midieron las concentraciones de algunas hormonas, encontrándose que a altas dosis de HU-210 hay una reducción en los niveles de corticosterona, mientras que, a dosis bajas, equipotentes a aquellas dosis

reportadas en el consumo humano, se encontraron elevados los niveles plasmáticos de prolactina (del Arco, *et al.*, 2000). Los efectos de los cannabinoides son dependientes de la dosis, es así como, bajas dosis de cannabinoides psicoactivos resulta en efectos inmunoestimuladores, mientras que a altas dosis se suprimen las funciones de las células (del Arco, *et al.*, 2000; Sánchez, *et al.*, 1997).

Lombard y colaboradores observaron que al administrar THC en ratonas gestantes, se podían encontrar en el timo de fetos al día gestacional 16, RNA mensajero para los receptores a cannabinoides, CB1 y CB2, y que éste último se expresaba en mayor cantidad que CB1, también encontraron una reducción en la celularidad tímica al DG17 que era dependiente de la dosis, observándose los niveles más bajos al administrar al DG16 una dosis de 50 mg/kg, lo cual era indicativo de una atrofia en el timo, además de que correspondía con un porcentaje bajo de células T CD8⁺ y un mayor porcentaje de apoptosis, efectos que eran parcialmente dependientes de la unión a los receptores a cannabinoides, lo anterior fue observado al utilizar antagonistas selectivos para los receptores CB1 y CB2, SR141716A y AM630, respectivamente. Mediante este mismo esquema, en donde las ratonas gestantes eran administradas con 50 mg/kg al DG16, y a las cinco semanas de nacidas las crías, se inocularon con 5 µg de las proteínas p17/p24/gp120 del HIV-1, y una semana después se midieron las IgG específicas contra estas proteínas del virus, encontrándose que los animales que recibieron el THC en el DG16, tenían anticuerpos contra los antígenos del VIH-1, así como una disminución en la proliferación de los linfocitos T, indicándonos que se pueden observar efectos perdurables a largo plazo ante una exposición gestacional a un cannabinoide, así como inducir a una mayor susceptibilidad a ciertas infecciones y cánceres en la descendencia (Lombard, *et al.*, 2011).

Es de suma importancia estudiar los efectos a largo plazo del consumo gestacional de marihuana, ya que a pesar de que ha habido reportes de efectos postnatales en los sistemas nervioso y endócrino, acerca del funcionamiento del sistema inmunológico hay pocos. Un aspecto importante a tomar en cuenta, es la potencia y el consumo de la marihuana a través del tiempo, ya que, en un intervalo de 40 años, la potencia de la misma ha ido incrementándose considerablemente, se dice que de los años 70's al año

2000, se ha incrementado de 6-7 veces en los Estado Unidos, lo anterior en base al porcentaje de THC (Sevigny, 2013); y otro reporte menciona que entre 1995 y 2014 se ha incrementado el porcentaje de THC presente en la planta, yendo desde un 4% hasta un 12% (ElSohly, *et al.*, 2016). Otro motivo por el cual es de suma importancia estudiar estos efectos, es que con la legalización de la mariguana se está incrementando su consumo.

Como ya se mencionó con anterioridad, el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 representa una buena estrategia experimental, ya que al ser un compuesto análogo al THC, permite estudiar los efectos prenatales a largo plazo. Además, ya se conoce que la exposición prenatal con WIN 55,212-2 induce una alteración a largo plazo del SEC en las áreas del cerebro implicadas en el aprendizaje-memoria, la actividad motora y el comportamiento emocional (Antonelli, *et al.*, 2005; Castaldo, *et al.*, 2007; Mereu, *et al.*, 2003), aunque no hay estudios de posibles efectos a largo plazo sobre el funcionamiento del sistema inmunológico.

1.4 *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis es un nemátodo que puede estar en diferentes estadios, dependientes de la morfología, lugar en donde se encuentre y tiempo de infección. El estadio adulto se caracteriza por localizarse en el intestino del hospedero durante las primeras semanas de infección; mientras que las hembras miden 2.2 a 3.5 mm, los machos miden de 1.2 a 1.6 mm. El estadio de larva recién nacida (LRN) mide de 80 a 120 μm de largo y de 5 a 6 μm de diámetro y se pueden encontrar en el intestino, ya que es ahí donde se liberan, al diseminarse se encuentran en sangre y de ahí se puede encontrar en todo el organismo, principalmente en los músculos, y una vez que invaden un miocito, al formarse la célula nodriza, puede llegar a medir 1 mm (Figura 9).



Figura 9. Larvas de *Triquinella spiralis*. Izquierda: Larva muscular recién obtenida por digestión artificial de músculo. Derecha: Larva muscular dentro de la estructura de protección llamada célula nodriza (teñida con azul de metileno). Imagen obtenida de (Hernández-Cervantes, 2017).

1.4.1 Triquinelosis

La triquinelosis o también llamada triquinososis es la enfermedad causada por el consumo de carne cruda o mal cocida en donde están presentes larvas viables de parásitos del género *Triquinella*. Es una enfermedad cosmopolita de la cual se le atribuye que un 64 % de los brotes reportados se han asociado al consumo de carne como de jabalíes, osos, caballos y perros. Brotes de triquinelosis ocasionados por el consumo de carne de jabalí se han presentado en países como China, Tailandia (*T. papuae*), Irán (*T. britovi*), España, India, Lituania, Polonia, Corea, Estados Unidos (*T. spiralis*), Vietman, Italia y Alemania (*T. spiralis*); los ocasionados por el consumo de carne de oso ha habido brotes en Canadá (*T. nativa*), Estados Unidos (*T. murrelli*), Rusia y Groenlandia; mientras que por el consumo de carne de caballo son principalmente en Francia (*T. murrelli* y *T. spiralis*) e Italia (*T. britovi* y *T. spiralis*); y por la ingesta de carne de perro están en Corea, China, Tailandia, Suiza, Rusia y Eslovaquia (especies no determinadas). Otros tipos de carne no tan comunes, pero de lo que ha habido reportes son de tejón (*T. spiralis*), morsa (*T.*

nativa), chacal (*T. britovi*), puma (*T. nativa*) y tortuga de caparazón blando (no determinado) (Rostami, *et al.*, 2017). En México, los casos aislados y brotes que se han reportado han sido debido al consumo de carne de cerdo y la especie es *spiralis*, y en gran medida relacionado con la crianza de cerdos de traspatio, en donde hospederos alternativos o canibalismo favorecen a la diseminación del parásito a animales destinados al consumo humano.

No hay reportes sólidos en cuanto a la prevalencia de la triquinelosis, sólo se reportan brotes pero no cada caso individual, lo anterior no refleja el número real de pacientes infectados y podría deberse a varias causas, como por ejemplo: 1) la fase aguda de la enfermedad puede ser asintomática; 2) no es común que se diagnostique en etapas tempranas, cuando la infección es intestinal, ya que podría confundirse con cualquier malestar estomacal y el paciente no acude al médico; 3) desconocimiento de la enfermedad por parte del médico, pudiéndose confundir con una infección viral o bacteriana; 4) en el caso de que haya un diagnóstico acertado y a tiempo, no se reportan los casos. El problema principal de la enfermedad, que en algunos casos llega a ser mortal, radica en que afecta la calidad de vida del paciente, ya que es una enfermedad que sólo puede ser tratada durante la etapa intestinal, pero una vez que llega a la etapa muscular, no hay tratamiento que sea eficaz para matar a los parásitos, es por ellos que el mayor problema relacionado a la triquinelosis es que afecta la calidad de vida de quien la padece. En la figura 10 se muestra la prevalencia de la triquinelosis en México, siendo los estados de Durango, Zacatecas, Puebla, Estado de México y la Ciudad de México los reportados con mayor endemividad, y por lo tanto, con mayor número de casos reportados; con una prevalencia media se encuentran los estados de Michoacán, Jalisco y Chihuahua, mientras que los estados de Guerrero, Querétaro, Guanajuato, Colima, San Luid Potosí, Nuevo León, Aguascalientes, Oaxaca, Veracruz y Sonora presentan una prevalencia baja (Ortega, *et al.*, 2000). Sin embargo, los datos anteriores están en base a reportes de brotes ocurridos entre los años 1952 y 1997 y, por lo tanto, se desconocen los datos reales y, sobre todo, actuales, de los pacientes con triquinelosis, minimizando el problema que representa a nivel de salud y de calidad de vida de los pacientes.

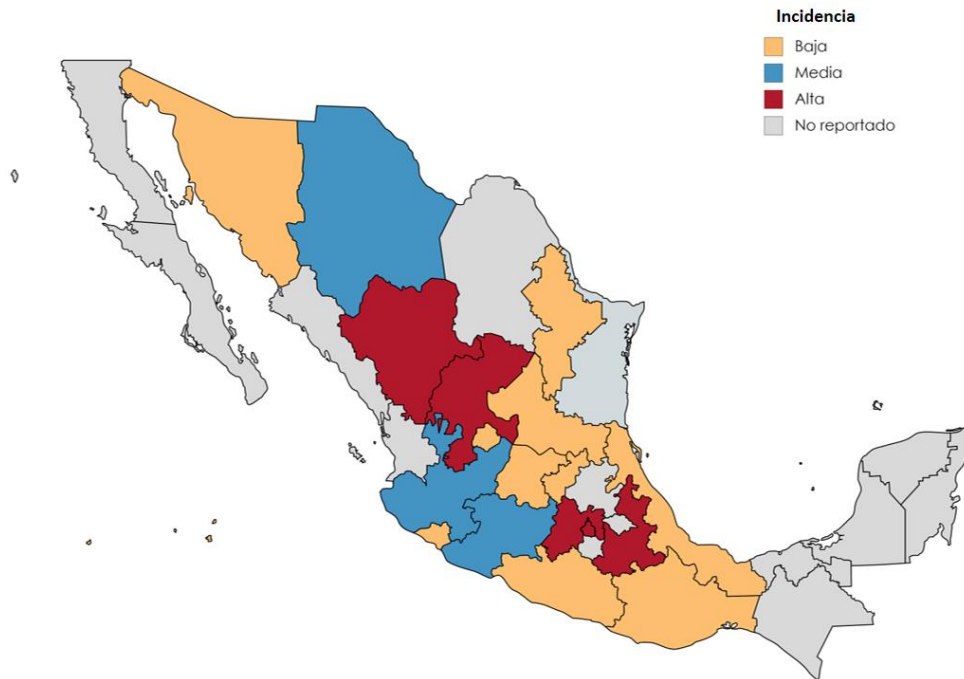


Figura 10. Incidencia de la triquinelosis humana en México. Datos obtenidos de reportes hechos de 1952 a 1997. Los estados con mayor incidencia (rojo) son Durango, Zacatecas, Estado de México y la Ciudad de México. Entre los estados de incidencia media (azul) se encuentran Chihuahua, Jalisco y Michoacán. Los estados con baja incidencia (amarillo) son Aguascalientes, Sonora, Hidalgo, Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Veracruz y Nuevo León. Obtenida y modificada de (Ortega, *et al.*, 2000). Imagen creada en <https://mapchart.net/mexico.html>.

1.4.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de todas las especies del género *Trichinella* comprometen generalmente dos generaciones en el mismo hospedero (Figura 11) e incluye una gran variedad de especies de hospederos (mamíferos, aves y reptiles), aunque solo los humanos se ven afectados clínicamente (Gottstein, *et al.*, 2009). La triquinelosis se adquiere al consumir carne cruda o mal cocida en donde están presentes larvas viables, con respecto a *Trichinella spiralis*, las principales fuentes de infección para humanos incluyen la carne de cerdo, caballo, jabalí, perro, morsa, zorro y oso (Figura 11A). Una vez que llega al estómago, por acción del pH (de 2 a 3) y los ácidos gástricos presentes se libera de su estructura de protección llamada célula nodriza (Figura 11-B1). Una vez libres migran hacia la primera porción del intestino delgado, se ubican entre las vellosidades (Figura 11-B2) y sufren cuatro mudas de cutícula, con lo cual alcanzan la madurez y se

diferencian en machos y hembras y se aparean, aproximadamente a los dos días postinfección. Alrededor del día 5-7 post-infección, ocurre el proceso de larviposición, que es la liberación de las larvas recién nacidas (LRN) (Figura 11-B3) entre las vellosidades, atraviesan las microvellosidades y alcanzan el torrente sanguíneo que le sirve para diseminarse a través del organismo (Figura 11-B4), pueden llegar al corazón y cerebro, provocando miotriquinelosis y neurotriquinelosis (Figura 11-B5), respectivamente, sin embargo, tienen tropismo por los tejidos altamente oxigenados, como el diafragma y el músculo esquelético. Cuando ingresan en un miocito empiezan a formar su célula nodriza (Figura 11-B7), una estructura de colágena que le brinda protección contra el sistema inmunológico, además de que se forman nuevos vasos sanguíneos para nutrir a la larva de nutrientes y oxígeno, la maduración de esta termina en aproximadamente 15 días, y pueden permanecer viables por años, estudios mencionan cerca de 40 años en el caso de humanos y cerca de 20 años en osos polares. Mientras que algunas pueden llegar a calcificarse (Figura 11-B8) (Gottstein, *et al.*, 2009).

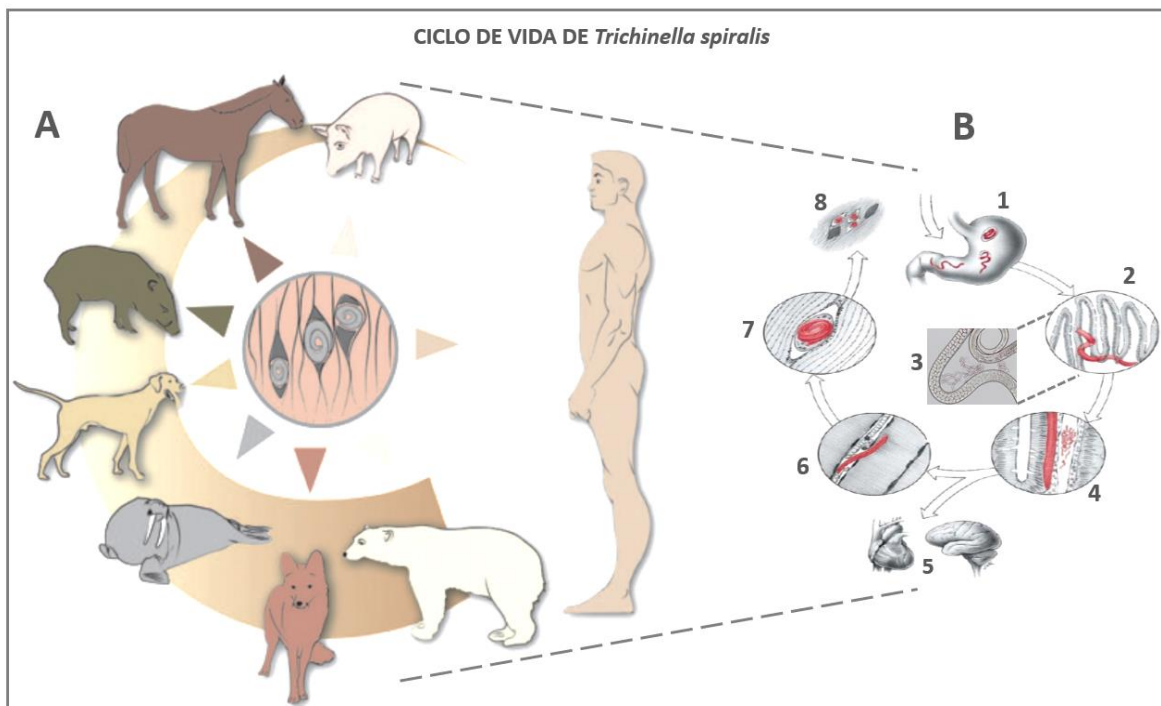


Figura 11. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. (A) Las principales fuentes de *T. spiralis* para humanos incluyen cerdos, caballos, jabalíes, perros, morsas, zorros y osos. (B) Cuando se ingiere carne cruda o mal cocida, las LM presentes se liberan de su célula nodriza en el estómago (1), migran al intestino (2) en donde maduran y se diferencian en machos y hembras y se aparean, alrededor de los 7 dpi

ocurre la larviposición (3), y las LRN se diseminan a través de la sangre (4) a todo el organismo, pueden llegar al corazón y cerebro (5), sin embargo, tienen tropismo por el músculo esquelético (6) en donde se alojan y forman su célula nodriza (7). Las LM pueden permanecer viables por varios años, y algunas pueden llegar a calcificarse (8). Obtenido y modificado de (Gottstein, *et al.*, 2009 y <http://www.trichinella.org/>)

El ciclo de vida ayuda a explicar los síntomas y el tratamiento durante la triquinelosis. Una vez que las larvas han sido ingeridas y llegan al estómago e intestino, se presentan fiebre, náuseas, dolor abdominal, vómitos, síntomas que pueden ser confundidos con alguna otra enfermedad de origen viral o bacteriano, tras la cual se deja de acudir al médico o se recibe un tratamiento erróneo y los parásitos pueden continuar con su ciclo. Mientras existe una infección a nivel intestinal el tratamiento es en base a compuestos benzimidazoles, como el albendazol y mebendazol, cuyo mecanismo de acción consiste en unirse a sitios de unión específica de la tubulina, lo cual inhibe su polimerización, el ensamblaje de los microtúbulos y la captación de glucosa dependiente de estos microtúbulos. Sin embargo, el tratamiento solo es efectivo hasta el día 16-17 post-infección, que es el tiempo en el cual se empieza a formar la célula nodriza, ya que una vez que se ha formado la célula nodriza la larva es resistente al tratamiento a pesar de que se encuentra en la misma fase que cuando es ingerida y es susceptible el tratamiento en el intestino (Pozio, *et al.*, 2001), y es por ello que el tratamiento se enfoca a ser paliativo, se mandan al paciente principalmente corticoesteroides, como prednisona y metilprednisolona para disminuir los síntomas, los cuales incluyen mialgias, edema facial, fiebre, desórdenes gastrointestinales, hemorragias en la conjuntiva, prurito y desórdenes neurológicos, entre otros. El edema tisular, principalmente alrededor de los ojos se debe a la liberación de histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas de acción lenta (PGE2, PGD2 y PGJ2), la cual da como resultado una permeabilidad aumentada de los capilares y una fuga de fluidos, electrolitos, albúminas y elementos celulares en el tejido circundante (Gottstein, *et al.*, 2009).

La invasión muscular puede causar mialgias, hinchazón y debilidad, la presencia y la severidad de estos síntomas están relacionados 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.

1.4.3 Respuesta inmunológica intestinal

Se ha considerado que hasta los 17-21 dpi constituye la fase intestinal de la infección, tiempo crítico en el que se determina el curso de la infección. La respuesta inmunológica está caracterizada por una infiltración de células inflamatorias, por ejemplo, células cebadas, células dendríticas, monocitos, eosinófilos y linfocitos y un perfil de citocinas de tipo Th2 (Gottstein, *et al.*, 2009). Es probable que las células dendríticas jueguen un papel clave en la respuesta inmune de la mucosa como una de las células presentadoras de antígeno más importantes en el intestino, ya que son cruciales para la polarización de las células T CD4⁺, y por otro lado se sabe que los antígenos de excreción/secreción de *Trichinella spiralis* o la misma infección inducen una respuesta tipo Th2 (Ding, *et al.*, 2017), siendo importantes la producción de IL-5, IL-9 e IL-13 para la eliminación de los parásitos. Dentro de las infecciones por nemátodos, la eosinofilia es una característica común en la mayoría de los casos de triquinelosis, tanto en sangre como en los tejidos. Los eosinófilos pueden contribuir a la inmunopatología en la triquinelosis debido a la liberación de enzimas tales como la histaminasa y la arilsulfatasa, sin embargo, los eosinófilos también inducen daño a las larvas de *Trichinella* con la actividad de la proteína básica principal, la proteína catiónica de eosinófilos y la peroxidasa de eosinófilos (Gottstein, *et al.*, 2009). Es bien sabido que la IL-5 estimula la liberación de estas células desde la médula ósea y favorece el reclutamiento de eosinófilos en los sitios en donde hay inflamación (Dixon, *et al.*, 2006), y en el caso de una infección aguda con *T. spiralis* contribuyen a la expulsión del parásito, aunque se le han atribuido una mayor protección en una exposición secundaria a *T. spiralis* (Vallance, *et al.*, 2000). Por su parte, IL-9 estimula la contracción muscular intestinal, y esta acción se asocia con una aceleración en la eliminación de los parásitos (Khan, *et al.*, 2003).

También es sabido que durante la fase intestinal de la triquinelosis se lleva a cabo una hiperplasia de las células caliciformes, y que probablemente está regulada por el perfil

Th2, dado principalmente por citocinas como IL-4 e IL-9. Las células caliciformes sintetizan mucinas, que después de su secreción, se hidratan y forman un gel de moco que protege la superficie de las células epiteliales, sin embargo, en la infección intestinal con *T. spiralis* se conoce que se produce una hiperplasia de las células caliciformes y de las criptas, además de una atrofia de las vellosidades (Ishikawa, *et al.*, 1997). El moco producido por las células caliciformes favorece al desalojo del parásito, al atraparlo en el moco, inhibir su motilidad y alimentación, de tal modo que lo excluye de su nicho y se favorece su expulsión (Khan, 2008). La respuesta de tipo Th2 también ejerce efectos sobre otros componentes de la motilidad, como las células enterocromafines, que secretan serotonina, las células intersticiales de Cajal y las neuronas motoras, que favorecen a la expulsión de los parásitos (Figura 12).

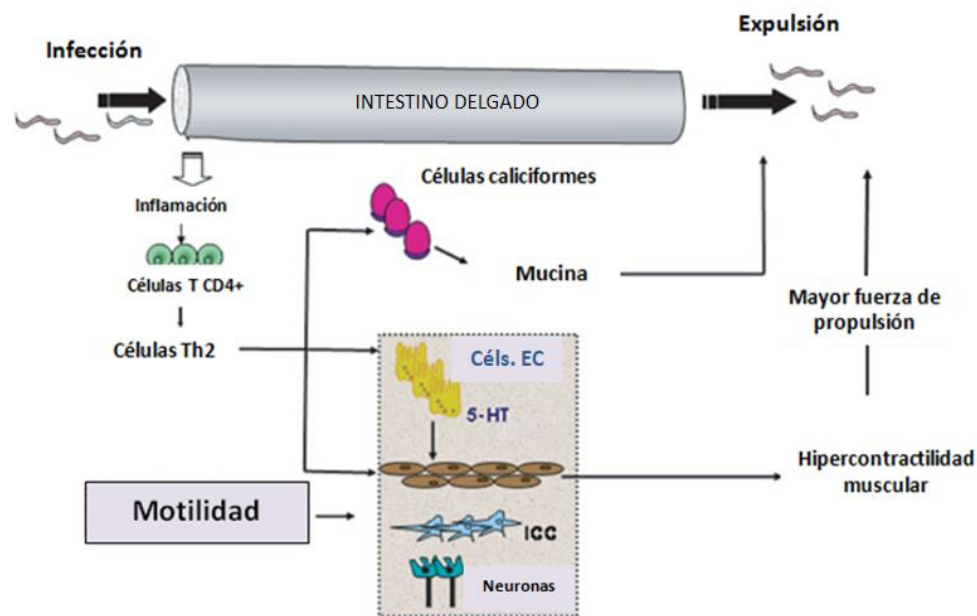


Figura 12. Respuesta inmunológica intestinal ante *Trichinella spiralis*. La infección con *Trichinella spiralis* produce inflamación de la mucosa, activándose una respuesta inmune tipo Th2, la cual induce una mayor producción de mucina, asimismo aumenta la contractilidad del músculo intestinal, creando 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 (Khan, 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

La marihuana es la droga ilícita, y en algunos países, lícita, más consumida a nivel mundial y por las mujeres embarazadas, quienes la utilizan para aminorar los síntomas de los primeros meses del embarazo, como náuseas y vómitos, o simplemente puede ser consumida con fines recreacionales.

El SEC está compuesto por endocannabinoides, receptores a cannabinoides, así como por las enzimas necesarias para la síntesis y degradación de los mismos. Este sistema se encuentra presente desde la etapa prenatal y ya es funcional. Existen dos receptores a cannabinoides, CB1 y CB2, los cuales se encuentran expresados en todo el organismo, sin embargo, CB1 está altamente expresado en el SNC, mientras que el receptor CB2 lo está en órganos y células inmunológicas, ejerciendo efectos inmunomoduladores.

El WIN 55,212-2 es un cannabinoide sintético análogo del THC que posee algunas ventajas para trabajar con él, como lo es mayor afinidad hacia los receptores a cannabinoides, por lo que se requieren dosis menores para obtener los mismos efectos que el THC; no requiere de permisos especiales para su adquisición, además de que tiene un precio más económico, en comparación con el THC.

Trichinella spiralis es un parásito nemátodo cosmopolita y zoonótico que presenta dos fases clínicas, la intestinal y la tisular. Durante la fase intestinal es donde se puede dar tratamiento farmacológico para eliminar al parásito, ya que cuando se encuentra en la fase tisular no hay tratamiento alguno que pueda hacerlo.

La exposición gestacional a la marihuana induce efectos postgestacionales perdurables en las crías, ya sea en sus funciones cognitivas y conductuales, así como en parámetros endócrinos, sin embargo, sobre el funcionamiento del sistema inmunológico hay poca información. Es por ello, que en este trabajo se propuso tratar a ratas gestantes con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 y evaluar los efectos postgestacionales en las crías adultas, utilizando la infección intestinal con el parásito *Trichinella spiralis* como reto inmunológico.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La administración del cannabinoide WIN 55,212-2 durante la gestación inhibe la respuesta inmunológica intestinal de las crías en su etapa adulta contra la infección aguda causada por *Trichinella spiralis*.

3.2 Objetivo general

Determinar el efecto de la exposición gestacional con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 sobre la respuesta inmunológica intestinal en ratas Wistar macho adultas, utilizando como modelo experimental la infección aguda por *Trichinella spiralis*.

3.3 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la exposición gestacional con WIN 55,212-2 sobre las cargas parasitarias intestinales de *Trichinella spiralis* en ratas macho adultas tratadas y no tratadas gestacionalmente.

En las ratas macho expuestas o no gestacionalmente a WIN 55,212-2, infectadas o no infectadas con *Trichinella spiralis* durante su etapa adulta:

2. Observar la morfología e integridad del duodeno, así como células caliciformes y eosinófilos por tinciones histológicas.

3. Analizar por citometría de flujo los porcentajes de las subpoblaciones celulares de linfocitos T totales, cooperadores, citotóxicos, linfocitos B, células NK y T gamma-delta en el duodeno, ganglios mesentéricos y bazo.

4. Estudiar por citometría de flujo en las subpoblaciones celulares la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en el duodeno, ganglios mesentéricos y bazo.

5. Determinar la expresión de las citocinas IL-4, IL-13 e IL-1 β , en duodeno y bazo por RT-PCR.

6. Cuantificar los títulos de anticuerpos totales por medio de ELISA.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general se puede apreciar en el siguiente esquema:

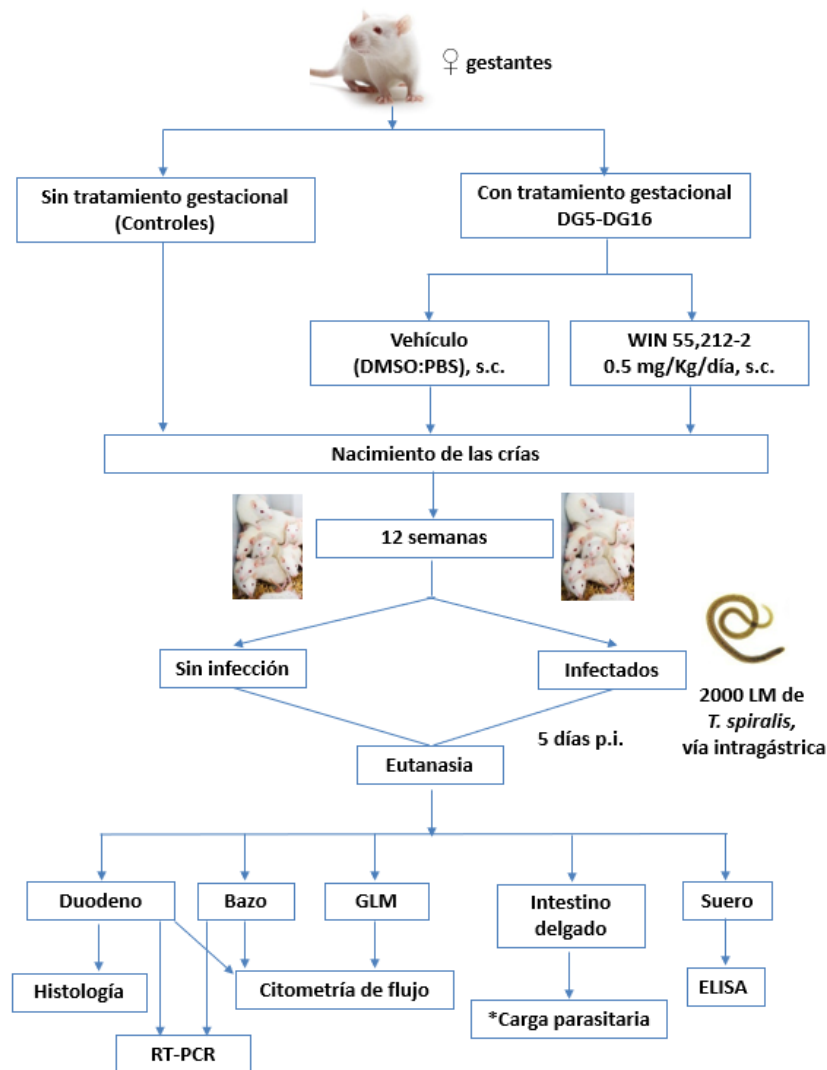


Figura 13. Esquema general de la metodología. Ratas gestantes se dividieron en tres grupos experimentales: 1) Control, en donde a las ratas gestantes no se les administró ningún tratamiento y la gestación se desarrolló normalmente; y los otros dos grupos experimentales recibieron tratamiento desde el día gestacional 5 (DG5) al día gestacional 16 (DG16), ya sea, 2) Vehículo, el cual consistió de una solución 1:2 de DMSO:PBS pH 7.2 o, 3) WIN 55,212-2, en una dosis de 0.5mg/Kg/día, vía subcutánea. Al nacer las crías se trabajó únicamente con los machos, se dejaron transcurrir 12 semanas, en donde nuevamente, los tres grupos experimentales fueron divididos en dos, uno se destinó a ser infectado con 2000 LM de *Trichinella spiralis* (*), y al otro no se le hizo nada. Cinco días después se sacrificaron y se obtuvieron los órganos para realizar las diferentes técnicas.

4.1 Material biológico

Se utilizaron 10 ratas Wistar hembras nulíparas y 3 ratas macho (*Rattus norvegicus*), de 12 semanas de edad, y de aproximadamente 250 gr de peso. Se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, el cuidado y las prácticas experimentales se llevaron a cabo bajo Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El cuarto de los animales estuvo bajo control de temperatura (22-24°C) y condiciones de luz-oscuridad (luz entre 0600-1800 hrs). La dieta consistió en Purina Diet 5015 y agua *ad libitum*.

Se siguió el ciclo estral de las ratas por dos ciclos para ver si eran regulares. Cuando una rata se encontraba en proestro se puso en una caja aparte con un macho para que se aparearan. A las nueve de la mañana del día siguiente se realizó un frotis vaginal y si había presencia de espermatozoides (Figura 14) se aceptaron como ratas probablemente gestantes y se designó como el día gestacional cero (DG0). Se retiró el macho, y se colocó con otra rata que estuviera en proestro, hasta que una vez más, se observaran células espermáticas en el frotis vaginal. Por cada caja se encontraban tres ratas gestantes, y al DG15 se separaron en cajas individuales, hasta el momento de destetar a las crías.

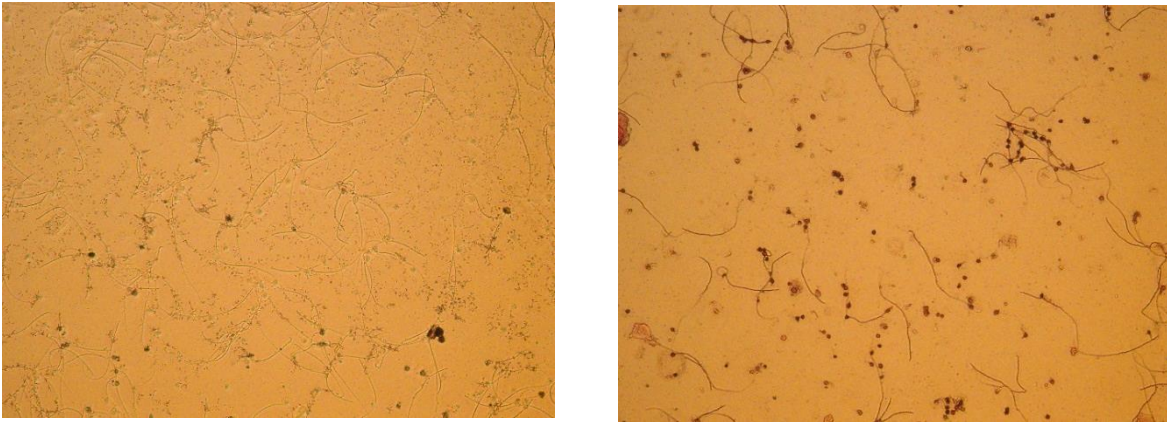


Figura 14. Frotis vaginales con presencia de espermatozoides. Izquierda. Frotis en fresco, objetivo 10X. Derecha. Frotis teñido con H&E, objetivo 40X.

Las ratas gestantes recibieron o no tratamiento gestacional (véase apartado *Grupos experimentales*), y una vez nacidas las crías, se trabajó con los machos, obteniéndose un total de 36 machos.

4.1.1 Grupos experimentales

Las ratas gestantes fueron divididas en tres grupos principales:

- 1) Control, no recibieron ningún tratamiento durante el periodo gestacional
- 2) Vehículo, fueron administradas con una solución de Dimetil sulfóxido (DMSO) diluido en Buffer fosfato salino pH 7.2 (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate buffered saline*), en una proporción 1:2, vía subcutánea, y el volumen dependió del peso de cada rata, para que fuera el mismo que el que recibirían si fueran administradas con WIN 55,212-2.
- 3) WIN 55,212-2 (diluido en una solución de DMSO/PBS), fueron administradas con 0.5 mg/Kg/día, vía subcutánea.

A las doce semanas de nacidas las crías, se volvieron a dividir los grupos, quedando un total de 6 grupos experimentales (Figura 15), con seis animales cada uno, a fin de tener grupos sin y con infección aguda del parásito *Trichinella spiralis*.

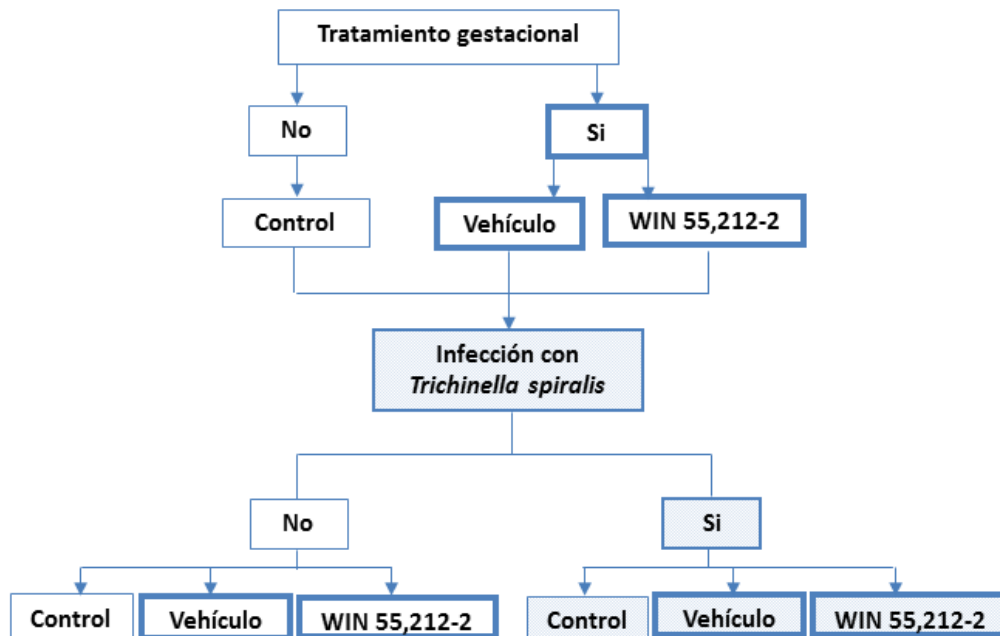


Figura 15. Esquema de los grupos experimentales, en función de si recibieron (recuadros con bordes gruesos) o no (recuadros con bordes delgados) tratamiento durante la gestación, y si fueron infectados (recuadros azules en su interior) o no (recuadros sin color en su interior).

4.2 Tratamiento gestacional

Las ratas gestantes fueron tratadas desde el día gestacional 5 (DG5) al día gestacional 16 (DG16), con WIN 55,212-2 a una dosis de 0.5 mg/kg/día o el volumen correspondiente de vehículo (DMSO:PBS pH 7.2, en una relación 1:2), vía subcutánea (s.c.), lo que corresponde a una exposición moderada, e inclusive baja, de cannabis en humanos. El esquema de administración está en base a estudios previos, en donde se ha reportado que a dosis mayores (1.0 mg/kg) se presentan parámetros de reproducción alterados, como menor peso de las crías al nacer, así como un menor número de crías por camada (Mereu, *et al.*, 2003). El grupo control no recibió tratamiento alguno.

4.2.1 WIN 55,212-2

El cannabinoide sintético WIN 55,212-2 (mesylate) se obtuvo de Cayman Chemical, y se disolvió en una solución de DMSO (SIGMA) y PBS pH 7.2, en una relación 1:2, según las especificaciones de la hoja técnica.

4.2.2 Datos de reproducción

El peso de las madres se registró durante todos los días de la gestación, desde el momento de encontrarse en el frotis vaginal la presencia de espermatozoides, día que se consideró como día gestacional cero (DG0), hasta el día en que nacieron las crías.

4.2.3 Obtención de las crías

Las ratas se revisaban diariamente para determinar el día del nacimiento de las crías, y una vez que se encontraban éstas, se contaron y se pesaron. Se pesaron a diferentes tiempos (0, 7, 14, 30 y 60 días); se registró la mortalidad postgestacional y se sexaron. A las cuatro semanas se destetaron y se separaron en machos y hembras, siendo los machos con los que se realizó este proyecto.

4.3 Parásitos e infección

4.3.1 Conservación de cepa

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 mantiene en el laboratorio mediante varios pases en ratas Wistar, con el fin de mantener la viabilidad y patogenicidad de la cepa.

4.3.2 Obtención y aislamiento de larvas musculares

Las LM viables se obtuvieron de músculo de una rata Wistar infectada con anterioridad con larvas de *Trichinella spiralis*. Dicha rata se sacrificó, se le quitó la piel y vísceras, quedando músculo únicamente. 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 X, preparación de soluciones), 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, preparación de soluciones) 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.

Se contaron las LM que se obtuvieron con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Bausch & Lomb), y se ajustó el volumen, de tal modo que al tomar un mismo volumen se tomaran las 2000 LM que se necesitaban para poder infectar a cada una de las ratas.

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 esta, 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 trituró 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.

4.3.3 Infección

Con las LM recién obtenidas, se tomó el volumen necesario para tener 2000 LM con una jeringa de tuberculina, se adaptó la cánula intragástrica y se dejó un momento en posición vertical. Por otro lado, se sujetó a la rata, fue necesario utilizar Sevoflurano (Sevoflurano), el cual es un anestésico volátil, con el fin de que la rata se relajara un poco sin necesidad de llevarla hasta la sedación y así poder introducir la cánula intragástrica para depositar las LM, y que la rata se recuperara rápidamente. El tiempo de este procedimiento no excede de un minuto por rata.

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 muestras biológicas

A las doce semanas de edad las crías se sacrificaron, utilizando una cámara de CO₂, se recolectó sangre en un tubo Vacutainer amarillo (con gel separador), mismo que se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga Hermle Z400K (Labortechnik GmbH) para obtener el suero. Se almacenó a -20°C hasta el momento de utilizarlos.

Se obtuvo una parte del duodeno y del bazo y se guardaron en Trizol (Invitrogen) a -70°C hasta el momento de extraer el RNA y su posterior procesamiento para PCR.

Otra parte del bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos se obtuvieron para hacer tinciones de subpoblaciones celulares y expresión de receptores a cannabinoides por citometría de flujo.

Una porción de duodeno se fijó en paraformaldehído por 24 horas, para su posterior deshidratación y realización de tinciones histológicas.

En los animales de los grupos que fueron infectados se obtuvo adicionalmente la porción restante de intestino delgado, para recuperar las larvas que no fueron expulsadas.

4.4.1 Carga parasitaria

De los grupos que fueron infectados se obtuvo el intestino delgado para determinar cuántas larvas quedaron, de las 2000 LM con las que fueron infectados. 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).

4.4.2. Histología

4.4.2.1 Deshidratación, inclusión de tejidos y obtención de cortes.

Una porción de duodeno por cada animal, de aproximadamente 1 cm, se colocó en un cassette para inclusión y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Después se colocaron en un procesador de tejidos, en donde se programó una hora en cada una de las siguientes soluciones: 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 más y finalmente dos series de parafina a 60°C una hora cada una, y se procedió a incluir los tejidos. Se obtuvieron cortes seriados en un microtomo (Retracting Microtome Rotary-One) a 4 µm para realizar las tinciones.

4.4.2.2 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 hasta llegar a agua destilada. Se tiñeron las muestras con hematoxilina de Harris recién filtrada durante 25-30 minutos. Se lavaron las laminillas con agua corriente por 2-5 minutos. Se diferenciaron con alcohol ácido al 1% con 1 o dos baños (1 baño: se sumerge la laminilla en el líquido y se saca rápidamente). Se lavó con agua corriente y se colocaron las muestras en una solución débil de agua amoniacal hasta que las muestras se vean de un color azul. Se lavaron con agua corriente por 10 minutos y se procedió a colocar las muestras en etanol al 80% por 1-2 minutos. Se contrarrestó la tinción en una solución de eosina-floxina durante un minuto. Se deshidrataron y aclararon los tejidos con dos cambios de etanol al 95% cada uno, etanol absoluto y xilol, dos minutos para cada paso. Se montaron las laminillas con resina (Entellan, Merck) y se dejaron secar las muestras.

4.4.2.3 Tinción Azul Alcían

Una vez desparafinados los portaobjetos, se hidrataron hasta llegar a agua destilada, se fijaron con alcohol al 96°C, se hizo un lavado con agua corriente y colocaron las laminillas 30 minutos en la solución de Azul Alcían pH 2.5, previamente filtrado (Anexo A), posteriormente se hizo un lavado con agua corriente y se tiñó con hematoxilina 1 minuto, se hizo un lavado con agua corriente durante 1 minuto y se deshidrataron los tejidos hasta llegar a xilol. Las laminillas se montaron con resina (Entellan, Merck) y se dejaron secar las muestras.

4.4.2.4 Cuantificación de eosinófilos en cortes histológicos

La cuantificación de eosinófilos se hizo por triplicado para cada individuo, se obtuvo un promedio de los tres valores, y se reportó el número de eosinófilos por cada milímetro cuadrado, tanto en vellosidades como a nivel de glándulas. Los eosinófilos fueron cuantificados en los cortes histológicos teñidos con H&E, y se identificaron por los gránulos eosinofílicos que se encuentran empaquetados en el citoplasma, y en algunos casos se logró observar su núcleo bilobulado, como se observan en los frotis sanguíneos.

4.4.3 Citometría de flujo

Se determinaron las subpoblaciones celulares de Linfocitos T totales (CD3⁺), linfocitos T cooperadores (CD4⁺), linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), linfocitos B (CD45⁺), células NK (NKR-P1A⁺) y células T $\gamma\delta$ (TCR γ/δ ⁺) en muestras de duodeno, ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y bazo.

4.4.3.1 Disgregación de bazo y GLM

Se obtuvo un trozo de bazo y se obtuvieron los GLM de cada animal, por separado se disgregaron en una caja Petri chica los tejidos entre dos pedazos de malla, ejerciendo presión con la ayuda de un émbolo y 500 μ l de Buffer de FACS (Ver anexo A, Preparación de soluciones). La suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf, y se lavó la malla y restos de tejido con otros 500 μ l de Buffer de FACS, los cuales se recuperaron y depositaron en el tubo Eppendorf. Se centrifugó el tubo a 2000 rpm durante 3 minutos a 4°C. Las muestras de GLM se decantaron, y el pellet se resuspendió en 500 μ l de buffer de FACS y se dejaron a 4°C hasta el momento de hacer las tinciones. A las muestras de bazo, se le decantó el sobrenadante y se le agregó 500 μ l de buffer de lisis de eritrocitos (Anexo A), se agitó ligeramente y se incubaron 10 minutos a TA, pasado este tiempo se agregaron 500 μ l de buffer de FACS, se agitó ligeramente y se centrifugó, se decantó el sobrenadante

y el pellet se resuspendió en 500 µl de buffer de FACS. Se dividió la suspensión celular en dos tubos Eppendorf, uno para la tinción intracelular y otro para la tinción extracelular, y se dejaron a 4°C hasta el momento de hacer las tinciones.

4.4.3.2 Disgregación de duodeno

Un pedazo de duodeno se colocó en un tubo Eppendorf y se agregaron 500 µl de RPMI (SIGMA) sin suero, 1 mg/ml de colagenasa (SIGMA) y 50 u/ml DNA'sa (SIGMA). Se incubó a 37°C durante 15 minutos, se mezcló por inversión y se agitó suavemente, se dejó otros 15 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo se utilizó un pistilo para disgregar más fácilmente el tejido. Se agregaron 500 µl de medio RPMI con suero fetal bovino para inactivar a la colagenasa, se dejó decantar y se obtuvo el sobrenadante, mismo que se centrifugó, se decantó el pellet y se resuspendió en 300 µl de buffer de FACS. Se dividió la suspensión celular en dos tubos Eppendorf, uno para la tinción intracelular y otro para la tinción extracelular, y las muestras se dejaron a 4°C hasta el momento de hacer las tinciones.

4.4.3.3 Tinciones

4.4.3.3.1 Receptor CB1. Tinción intracelular

A cada tubo se agregó 300 µl de P4F (paraformaldehído al 4%, buffer de fijación) y se incubó 10 minutos a 37°C, después se colocaron 500 µl de metanol frío y se incubó 30 minutos a 4°C, se centrifugaron y se decantó el sobrenadante. Se añadieron 200 µl de buffer de FACS y se colocaron 25 µl en cada pozo, se centrifugó la placa y se decantaron los sobrenadantes. Se agregaron 25 µl del mix de anticuerpos primarios, dependiendo de la tinción -T1, T2, T3- (Ver tabla 2) y se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Se agregó 150 µl de buffer de FACS, se centrifugó la placa y se decantaron los sobrenadantes. Se añadieron 25 µl del anticuerpo secundario correspondiente (α -rabbit Daylight 649 para T1 y T2, o Daylight 488 para la T3) y se

hizo una incubación de 15 minutos a 4°C, posteriormente se agregaron 150 µl de buffer de FACS, se centrifugó, se decantó la placa y los pellets se resuspendieron en 200 µl de buffer de FACS. Las muestras se taparon de la luz y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de leerse en el citómetro de flujo (FACSCalibur). Por cada muestra se tuvo un pozo sin tinción y para cada tinción se contó con una muestra denominada secundario, el cual no contenía los anticuerpos para el receptor CB1.

4.4.3.3.2 Receptor CB2. Tinción extracelular

De la suspensión celular obtenida de la disgregación, se colocó 25 µl en cada pozo y se añadieron 200 µl de buffer de FACS, se centrifugó la placa y los sobrenadantes se decantaron. Se agregaron 25 µl del mix de anticuerpos primarios, dependiendo de la tinción -T1, T2, T3- (Ver tabla 2) y se incubó la placa a 4°C durante 20 minutos. Se agregaron 150 µl de buffer de FACS a cada pozo, se centrifugó y decantó los sobrenadantes. Se añadió el anticuerpo secundario correspondiente a cada tinción (α -rabbit Daylight 649 para T1 y T2, o Daylight 488 para la T3), se incubó 15 minutos a 4°C. Se agregaron 150 µl de FACS a cada pozo, se centrifugó y decantó. Los pellets se resuspendieron en 100 µl de buffer de FACS y se adicionaron 100 µl de buffer de fijación. Las muestras se taparon de la luz y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de leerse en el citómetro de flujo (FACSCalibur). Por cada muestra se tuvo un pozo sin tinción y para cada tinción se contó con una muestra denominada secundario, el cual no contenía los anticuerpos para el receptor CB2.

Tabla 2. Tinciones y condiciones utilizadas para citometría de flujo.

Tinción (T)	Población	Anticuerpo	Dilución
T1	Linfocitos T totales	CD3	1:200
	Linfocitos T cooperadores	CD4	1:300
	Linfocitos T citotóxicos	CD8	1:200
T2	Linfocitos T totales	CD3	1:200
	Células B	CD45	1:200
T3	Células NK	NKR-P1A	1:300
	Células γ/Δ	TCR γ/Δ	1:200
Todas las tinciones	Receptores CB1 (tinción intracelular) Receptores CB2 (tinción extracelular)	Receptor CB1 Receptor CB2	1:300 1:300

4.4.4 RT-PCR

4.4.4.1 Obtención y cuantificación de RNA

La expresión del RNA mensajero para las citocinas IL-4, IL-13 e IL-1 β fueron determinadas por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) en muestras de intestino y bazo. El RNA fue obtenido de los tejidos mediante la técnica de fenol-cloroformo: en tubos Eppendorf estériles se colocó aproximadamente 100 mg de tejido y se agregó 1 ml de Trizol (Invitrogen), se homogenizó el tejido y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, agregándose 200 μ l de cloroformo (SIGMA) por cada mililitro de homogeneizado, se agitó y se centrifugó a 1500 g a una temperatura de 4°C, durante 15 minutos. Se recuperó la fase orgánica y se le agregó 200 μ l de una solución compuesta por fenol/cloroformo, centrifugándose y recuperándose nuevamente la fase acuosa y se le

agregó una cantidad equivalente de isopropanol frío (SIGMA), se mantuvo la 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 sobrenadante y se dejó secar la pastilla de RNA, misma que se resuspendió en 30 µl de agua MilliQ DEPC.

Se cuantificó por duplicado la cantidad de RNA obtenida en cada muestra en un espectrofotómetro (GeneQuant), leyendo a una longitud de onda de 260 nm (Fórmula general: $RNA = ABS_{260} \times 1 \text{ D. O.} \times \text{dilución} = \text{ng}/\mu\text{l}$) y se verificó la integridad corriendo 3 µg de RNA en un gel de agarosa al 1%.

4.4.4.2 Obtención de cDNA

Con el RNA obtenido se procedió a hacer la reacción de retrotranscripción para obtener el cDNA de todas las muestras, tanto de intestino como de bazo. Para cada muestra se agregó: 0.5 µl de Oligo dT (Invitrogen), 2 µl de dNTPs (Promega), el volumen necesario para tener 5 µg, y H₂O DEPC suficiente para tener un volumen de 17 µl, se colocaron las muestras en un termociclador (GenAmp PCR System 2700) y se calentó a 65°C por 3 minutos, se pusieron en hielo por 3 minutos y se le agregó 5 µl de Buffer 5XFS (Promega) y 2 µl de DTT (Invitrogen), se calentó a 37°C por 2 minutos y se le agregó 1 µl de enzima RT-MMLV (Promega), teniendo un volumen final de 25 µl, se calentó a 37°C por 50 minutos, después a 75°C por 15 minutos y se dejó a 4°C por infinito. Una vez que hubo terminado de correr el programa se guardaron las muestras a -20°C.

4.4.4.3 Determinación de la expresión de citocinas por RT-PCR

Una vez que se obtuvo el cDNA, se amplificaron las citocinas IL-4, IL-13 e IL-1β además del gen constitutivo 18s. Los oligos utilizados se diseñaron, buscando en el GenBank la secuencia genómica de la rata (*Rattus norvegicus*), se definió la región del gen que se deseaba amplificar (18s, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), y se mandaron a sintetizar (SIGMA e

Invitrogen). Se estandarizaron las condiciones para amplificar las citocinas y las condiciones se muestran en la tabla 3.

Los productos de cada reacción se verificaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y el peso esperado para cada citocina se comparó con un marcador de peso molecular (Axygen). Las bandas que correspondían al peso molecular se tomaron como los productos de amplificación esperados. Para obtener la expresión relativa de cada citocina, se utilizó el software de Image J, en donde se obtuvo la intensidad de densidad correspondiente de cada banda, con respecto a su valor correspondiente del gen constitutivo 18s.

Tabla 3. Estandarización de la temperatura y ciclos de los cebadores utilizados para RT-PCR.

Abreviatura	Nombre	Oligonucleótidos	pb	TM (°C)	# de ciclos
IL-4	Interleucina 4	SENSE 5' TCCACGGATGTAACGACAGC 3' ANTISENSE 5' TCATTACGGTGCCAGCTTCT 3' Invitrogen	289	66	40
IL-13	Interleucina 13	SENSE 5' TATCGAGGAGCTGAGCAACATCA 3' ANTISENSE 5' ATAAACTGGGCTACTTCGAT 3' SIGMA	240	56	40
IL-1β	Interleucina 1 beta	SENSE 5' TGCCCGTGGAGCTTCCAGGAT 3' ANTISENSE 5' CCAGCTGCAGGGTGGGTGTG 3' Invitrogen	358	64	40
18s	Gen constitutivo 18s	SENSE 5' CGCGGTTCTATTTGTTGGT 3' ANTISENSE 5' AGTCGGCATCGTTTATGGTC 3' Invitrogen	219	64	40

pb: pares de bases, tamaño del producto; TM: Temperatura de alineamiento, por sus siglas en inglés *Melting temperature*

4.4.5 Detección de anticuerpos totales

Para obtener la dilución del anticuerpo α -IgG de rata-HRP idónea se utilizaron microplacas de poliestireno (Corning), mismas que se sensibilizaron con 100 μ l de suero de una rata control (sin infección), diluido en una solución de carbonatos pH 9.6 (para todas las soluciones utilizadas para ELISA, ver anexo A, Preparación de soluciones), en diluciones de 1:2000, 1:1000 y 1:500, y se mantuvo la microplaca a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día se hicieron tres lavados con la solución de lavado, se agregó la solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C, pasado este tiempo se decantó la solución y se realizaron tres lavados. Se añadieron 50 μ l a cada pozo de diferentes soluciones del anticuerpo α -IgG de rata-HRP (Jackson ImmunoResearch) a diferentes diluciones (1:20000, 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1:1000) y se incubaron durante una hora a 37°C. Pasada la hora, se lavó tres veces la placa y se agregaron 50 μ l de la solución de cromógeno durante 15 minutos a TA. La reacción se paró con 50 μ l de una solución de ácido sulfúrico 2N, se agitó suavemente, y se leyó la placa en un espectrofotómetro (Awareness Technologies Stat Fax 4200 Microplate Reader) a 492 nm. Se realizó la curva de titulación y así se obtuvo que la dilución adecuada de suero para sensibilizar la placa era de 1:1000, y la del anticuerpo α -IgG de rata-HRP era la de 1:1000. Se realizaron tres ensayos por triplicado.

4.4.6 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

5.1 Parámetros reproductivos

Durante la gestación se registró el peso de las madres, y cuando las crías nacieron, se obtuvo la duración de la gestación, el número de crías por camada y el peso al día del nacimiento. Posteriormente se reportó la mortalidad postnatal y la ganancia de peso a diferentes días (0, 7, 14, 30 y 60 días). Lo anterior se hizo con la finalidad de saber si el tratamiento gestacional, ya sea con el vehículo en sí, o con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 podrían estar afectando estos parámetros reproductivos.

En la tabla 4 se observa que ninguno de los parámetros arriba mencionados se observó alterado, con respecto al grupo control, con lo que se puede decir que los resultados obtenidos en este trabajo se deben al tratamiento en sí, y no debido a limitaciones como, por ejemplo, una baja de peso o porque las crías fueron prematuras.

Tabla 4. Parámetros reproductivos. Se registró la ganancia de peso en las madres (n=3 por grupo), el número de días de gestación, el número de crías por camada y el porcentaje de mortalidad postgestacional. En las crías (F1) de los 3 grupos experimentales (Control, Vehículo o WIN 55,212-2, n=7 por grupo) se registró el peso en el día en que nacieron (día 0), así como a los 7, 14, 30 y 60 días de nacida la F1.

GRUPO	MADRES				CRÍAS (F1)				
	% GANANCIA DE PESO (MADRES)	PERIODO GESTACION AL (DÍAS)	NÚMERO DE CRÍAS	% MOSTALIDAD POSTNATAL	GANANCIA DE PESO (GRAMOS) DE LAS CRÍAS				
					0	7	14	30	60
Control	34.1 ± 2.4	21.5 ± 0.7	10.67 ± 1.52	3.03 ± 5.24	5.8 ± 0	13.9 ± 0.2	25.9 ± 0.7	96 ± 0.1	216.3 ± 15.4
Vehículo	24.7 ± 15	21 ± 0	10.25 ± 2.98	2.77 ± 5.55	6.2 ± 0.5	14.4 ± 2	28.3 ± 3.7	95.8 ± 6.1	207.9 ± 18.2
WIN 55,212-2	30.2 ± 1.6	21 ± 0	7.8 ± 2.94	1.66 ± 3.72	6.4 ± 0.9	14.5 ± 2	26.2 ± 3.7	92.3 ± 6.6	202.6 ± 13.9

Los resultados están expresados como la media ± DS.

5.2 Carga parasitaria

A las 12 semanas de edad, los grupos experimentales se dividieron en dos, para así tener grupos intactos (sin infección parasitaria) y los infectados con el parásito *Trichinella spiralis*. Los grupos intactos se sacrificaron a las 12 semanas, mientras que los grupos experimentales infectados, se sacrificaron a los 5 dpi.

El primer dato que se obtuvo fue la carga parasitaria en aquellos animales que fueron infectados con *Trichinella spiralis*. En la figura 16 se observa que el grupo tratado gestacionalmente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 presenta un mayor número de larvas recuperadas, un promedio de 1443 larvas, mientras que en los grupos vehículo y control se recuperaron en promedio 927 y 1038 larvas, respectivamente. La diferencia de larvas recuperadas entre los grupos tratados con WIN 55,212-2 y el vehículo fue de 515 larvas, y entre los grupos WIN 55,212-2 y control fue de 405 larvas, aproximadamente.

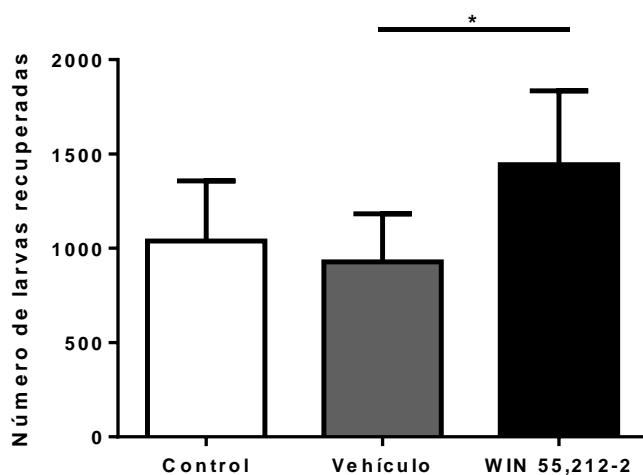


Figura 16. Carga parasitaria. Los animales fueron infectados, vía intragástrica, con 2000 LM de *Trichinella spiralis*. Después de 5 días postinfección, fueron sacrificados y se obtuvo el intestino delgado para recuperar las larvas presentes en el intestino delgado (n=7, dos experimentos independientes).

Los animales fueron infectados con 2000 LM, y en el caso del grupo WIN 55,212-2, al recuperarse un mayor número de larvas nos indica que fue menos eficaz al momento de eliminar a los parásitos, en comparación con los otros dos grupos.

Efectos de la administración gestacional con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis histológico, la inmunofenotipificación por citometría de flujo, la expresión de los receptores a cannabinoides en diferentes subpoblaciones celulares, así como la expresión del RNA mensajero para algunas citocinas y los anticuerpos totales de las crías expuestas gestacionalmente al análogo de THC, el WIN 55,212-2.

5.3 Histología de duodeno

Se obtuvieron muestras de duodeno para realizar cortes histológicos y poder observar la morfología de este, así como analizar algunas células, como los eosinófilos y células caliciformes mediante diferentes tinciones histológicas.

Primero se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para observar la morfología general del duodeno. En la figura 17 se muestran imágenes representativas de los tres grupos experimentales sin infección. En el grupo control se muestra la morfología normal de intestino delgado, el grupo vehículo se observa similar al grupo control, mientras que en el grupo tratado gestacionalmente con WIN 55,212-2 se observan con el aumento de 4X zonas más claras, y cuando se observan ya a un aumento de 40X, se puede ver que son las células caliciformes, que en su mayoría se encuentran vacías, tanto a nivel de glándulas como de las vellosidades.

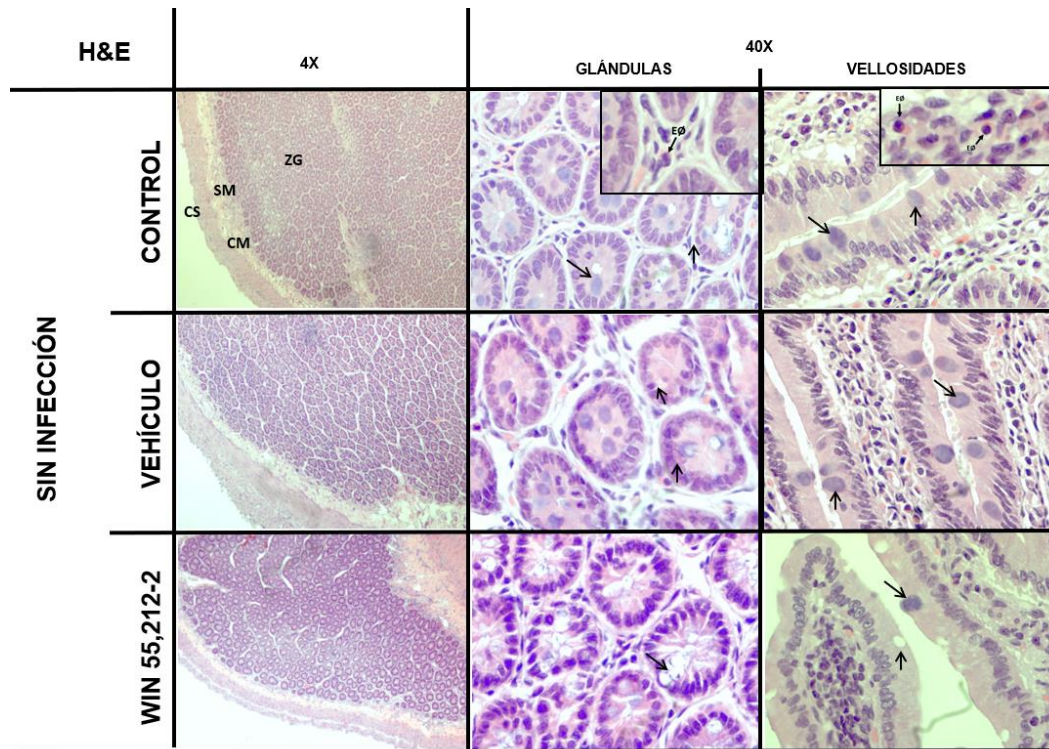


Figura 17. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en muestras de duodeno de animales sin infección. Cortes longitudinales. S: Capa serosa; M: Capa muscular; SM: Submucosa, CM: Capa mucosa; CC: Células caliciformes (señaladas con flechas negras). En los recuadros superiores se observa una muestra de eosinófilos. Objetivos de 4X y 40X.

En la figura 18 se muestran las imágenes representativas de las tinciones con H&E para los animales infectados, y se puede apreciar que en los tres grupos experimentales se observan tanto a nivel de glándulas como de vellosidades que las células caliciformes se encuentran vacías, ya han liberado mucina, y se encuentran liberando o llenándose de nuevo de esta sustancia. Este efecto se ve similar al que se observó en los animales tratados únicamente con WIN 55,212-2 y que no fueron infectados.

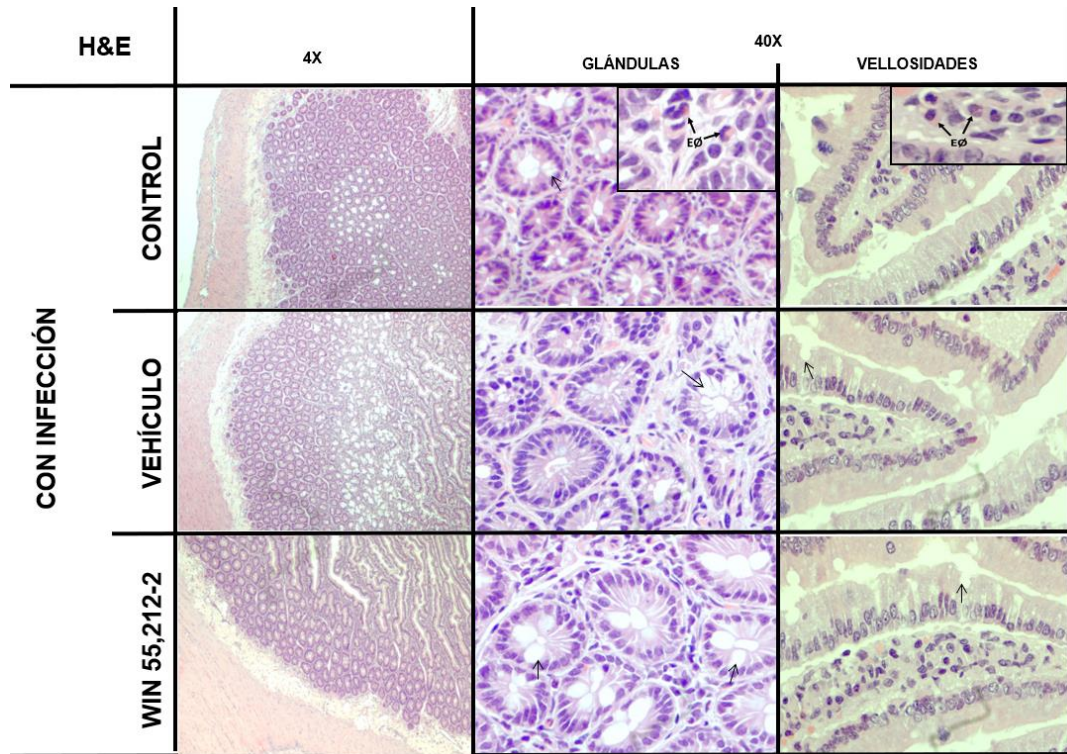


Figura 18. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en muestras de duodeno de animales infectados con *Trichinella spiralis*. Cortes longitudinales. Las células caliciformes se encuentran señaladas con flechas negras. En los recuadros superiores se observa una muestra de eosinófilos. Objetivos de 4X y 40X.

Utilizando una tinción más específica para observar a las células caliciformes, se decidió hacer una tinción con Azul Alcian, la cual es específica para observar mucopolisacáridos, tiñéndolas de color azul. Semejante a lo obtenido con la tinción de H&E, se observó que en el grupo tratado prenatalmente con WIN 55,212-2, sin infección, hay un cambio notorio en las células caliciformes, al no encontrarse llenas de mucina, ya que se ven semivacías o vacías (Figura 19).

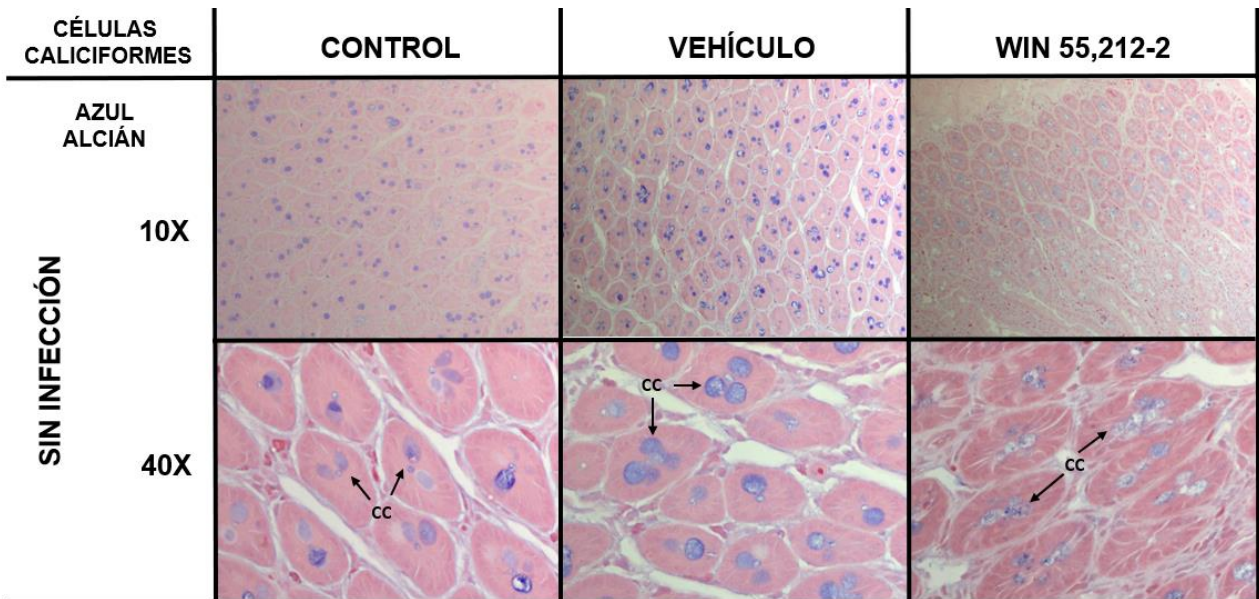


Figura 19. Tinción con Azul Alcían en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2, cortes longitudinales a nivel de glándulas. Las células caliciformes (CC) se encuentran teñidas de azul y algunas se encuentran señaladas con flechas negras. Objetivos de 10X y 40X.

Al observar las células caliciformes en la zona glandular teñidas con Azul Alcían en los grupos que fueron infectados con *T. spiralis* en la figura 20, notamos que los grupos control y los tratados con el vehículo presentan células caliciformes que han hecho exocitosis y las que se encuentran llenas aparecen de una coloración más fuerte que las que se aprecian en el grupo tratado con WIN 55,212-2.

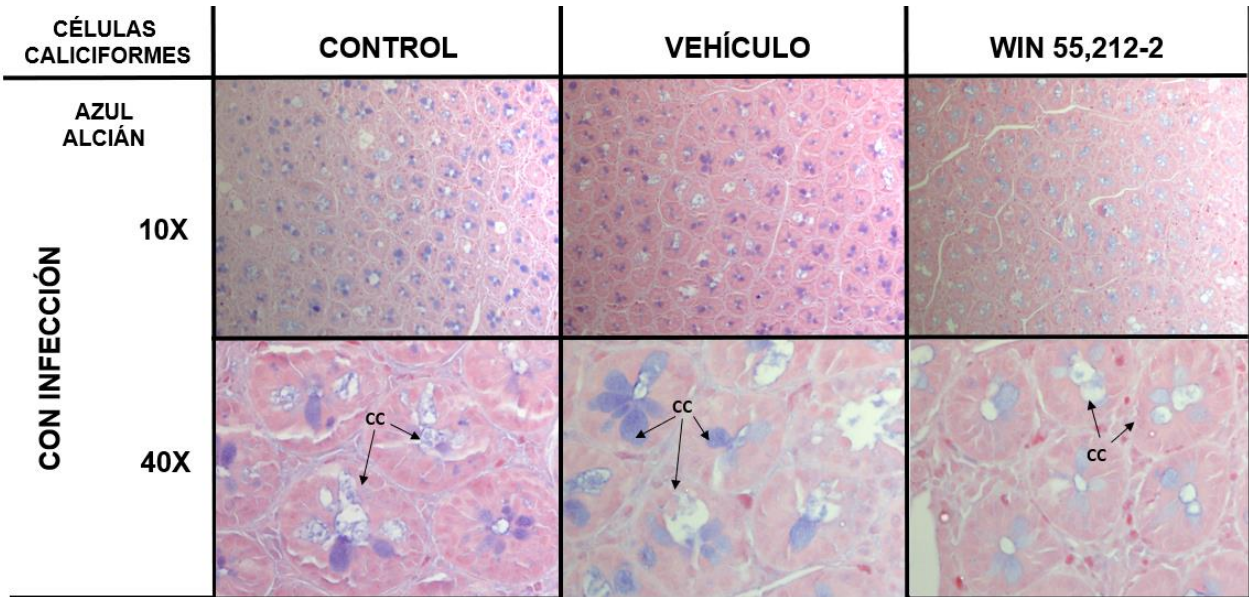


Figura 20. Tinción con Azul Alcian en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2 infectados con *T. spiralis*, cortes longitudinales a nivel de glándulas. Las células caliciformes (CC) se encuentran teñidas de azul y algunas se encuentran señaladas con flechas negras. Objetivos de 10X y 40X.

Quando se hizo el análisis de las células caliciformes a nivel de vellosidades se encontró una situación similar a la encontrada a nivel de glándulas, así como en las muestras teñidas con H&E. En la figura 21 podemos ver que el grupo tratado con el cannabinoide sintético presenta unas células caliciformes con una coloración menos intensa que en comparación a los otros dos grupos.

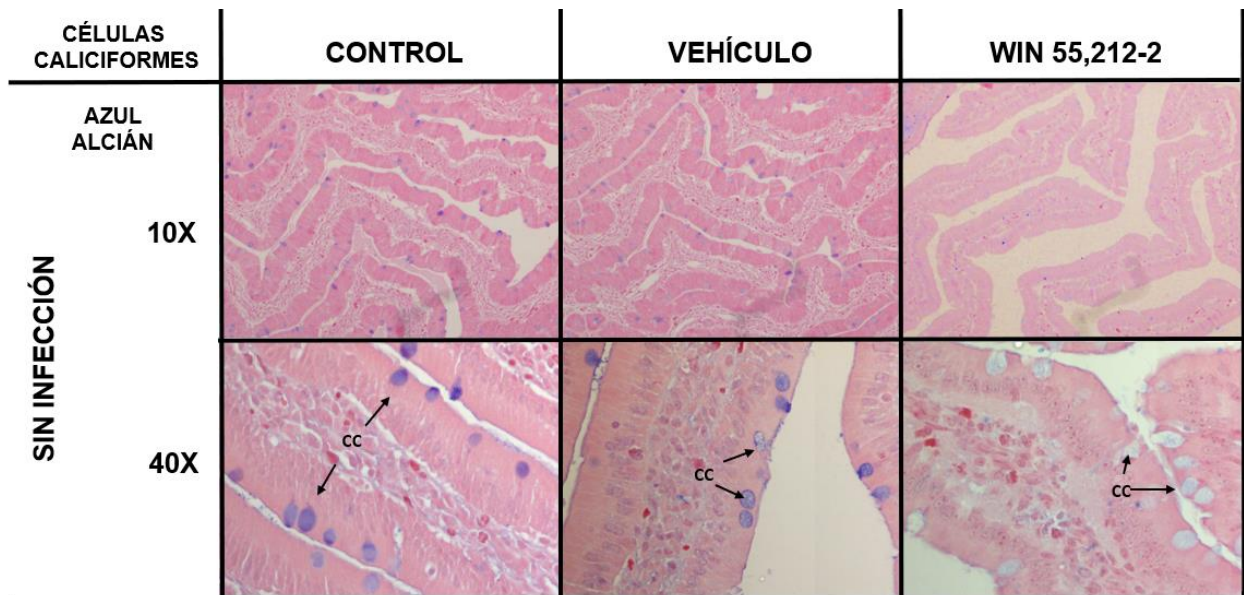


Figura 21. Tinción con Azul Alcian en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2, cortes longitudinales a nivel de vellosidades. Las células caliciformes (CC) se encuentran teñidas de azul y algunas se encuentran señaladas con flechas negras. Objetivos de 10X y 40X.

A nivel de vellosidades, todos los grupos infectados con *T. spiralis* presentan un vaciamiento de las células caliciformes (Figura 22), sin embargo, una vez más, en grupo tratado gestacionalmente con el cannabinoide WIN 55,212-2 presentan una coloración más débil, esto es indicativo de una menor presencia de mucina en las células, efecto que se presentaba en los animales de este mismo grupo, pero sin la infección, por lo tanto, podemos decir que el llenado o el contenido de las células caliciformes en estos animales tratados con WIN 55,212-2 gestacionalmente, es deficiente y ante la infección con *T. spiralis* este efecto se mantiene.

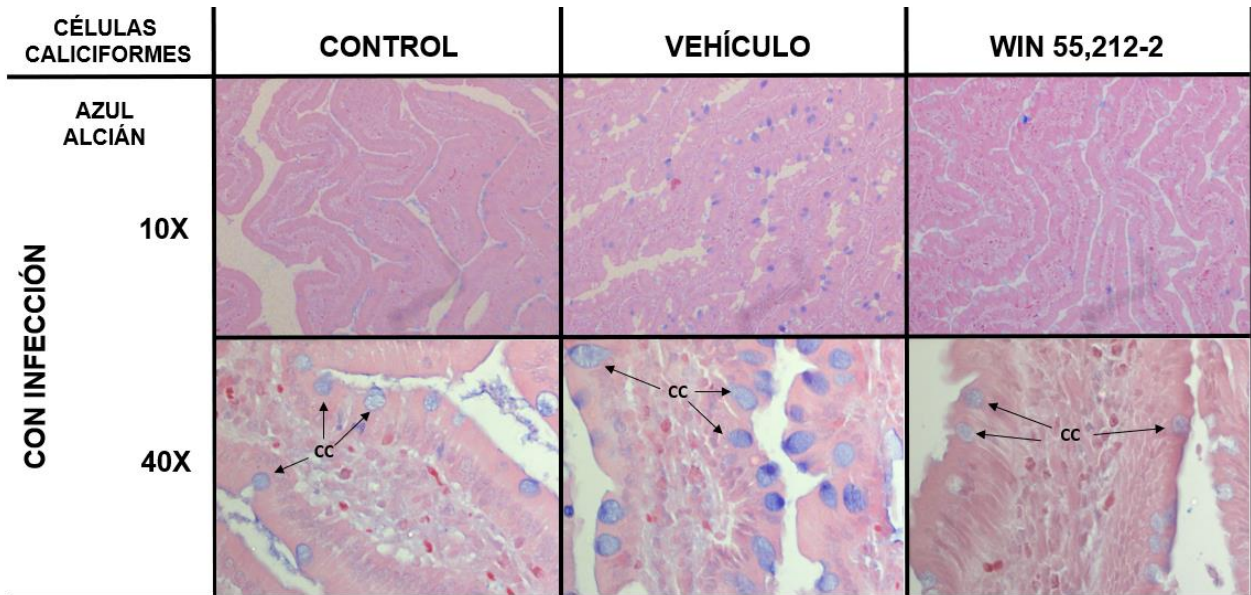


Figura 22. Tinción con Azul Alcían en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2 infectados con *T. spiralis*, cortes longitudinales a nivel de vellosidades. Las células caliciformes (CC) se encuentran teñidas de azul y algunas se encuentran señaladas con flechas negras. Objetivos de 10X y 40X.

5.3.1 Conteo de eosinófilos a nivel de vellosidades y glándulas

Con los cortes histológicos teñidos con H&E se procedió a realizar la cuenta de eosinófilos, en las figuras 17 y 18 se muestra en los recuadros superiores una imagen meramente ilustrativa de los eosinófilos, y el recuento de estos se presenta en las siguientes figuras (23 y 24).

En la figura 23 se muestra el conteo de los eosinófilos por milímetro cuadrado a nivel de las vellosidades, y la única diferencia que se presentó fue asociada a la infección, ya que como se esperaba, en la infección por *T. spiralis* se presenta un aumento en el número de eosinófilos.

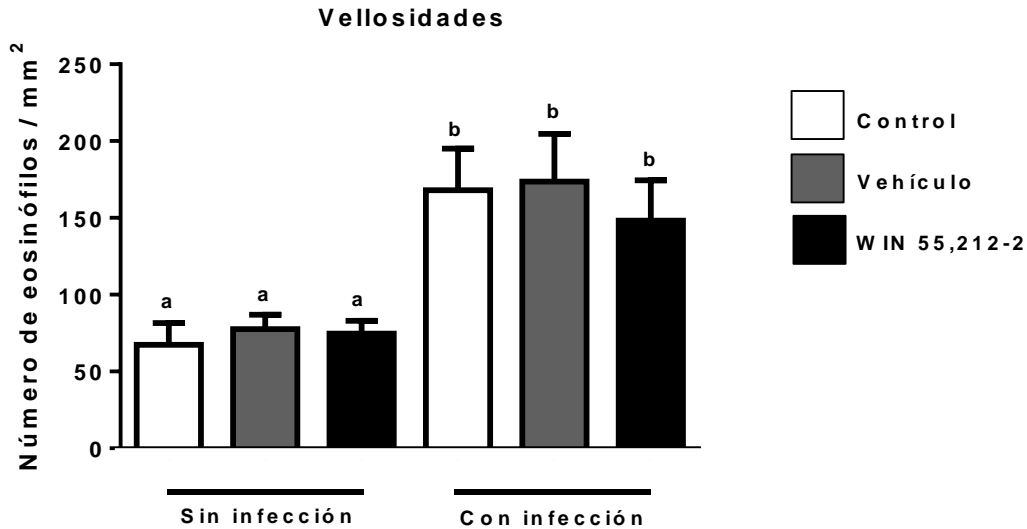


Figura 23. Conteo de eosinófilos por milímetro cuadrado en las vellosidades del duodeno. El conteo se realizó en cortes teñidos con H&E, para cada animal se realizó el conteo por triplicado y el promedio se graficó.

A nivel de glándulas, entre los grupos sin infectar no hay diferencias significativas, y la misma situación se presenta entre los grupos infectados, sin embargo, es de destacar que entre los grupos control y control infectado, así como entre los vehículo y vehículo infectado, hay diferencias asociadas a la infección, ya que como era de suponer, la infección con *Trichinella spiralis* induce un aumento en el número de eosinófilos, aunque entre los grupos tratados con WIN 55,212-2 y el correspondiente con infección, no se presenta diferencia que sea significativa, es decir, el grupo tratado con WIN 55,212-2 e infectado con *T. spiralis* es menos eficaz en reclutar eosinófilos a nivel glandular (Figura 24).

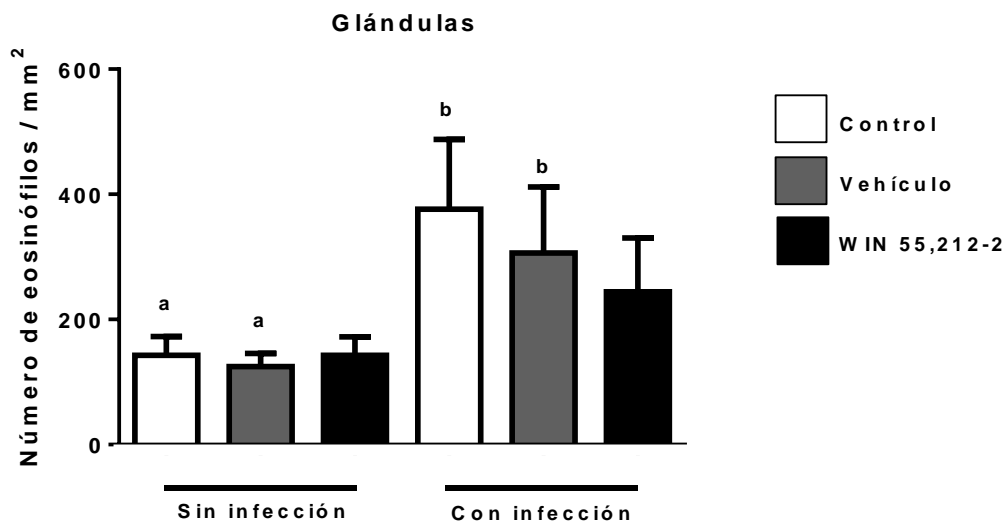


Figura 24. Conteo de eosinófilos por milímetro cuadrado en la zona glandular del duodeno. El conteo se realizó en cortes teñidos con H&E, para cada animal se realizó el conteo por triplicado y el promedio se graficó.

5.4 Subpoblaciones celulares por citometría de flujo

Se determinaron las subpoblaciones celulares, el porcentaje de positividad para los receptores a cannabinoides (CB1 y CB2) así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) en tres tejidos, duodeno, ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y bazo.

El primer tejido, el duodeno, fue para evaluar la respuesta más inmediata, en el caso de los animales que fueron infectados, ya que, a los 5 días de infección, los parásitos se encuentran en el duodeno; los GLM son los ganglios más cercanos a la infección; mientras que el bazo es considerado un órgano que posee memoria inmunológica. Es por ello, que los resultados se presentarán primero aquellos obtenidos en duodeno, seguido de los GLM y al final se presentan los resultados obtenidos en el bazo.

Los porcentajes de positividad para los receptores indican, como su nombre lo dice, el porcentaje de células que están expresando, en este trabajo, al receptor CB1 o al

receptor CB2, mientras que la intensidad media de fluorescencia indica cuánto se está expresando este receptor en determinada subpoblación celular, de tal manera que puede ocurrir que el porcentaje de positividad sea muy alto, pero la intensidad media de fluorescencia nos indique se están expresando poco, o viceversa.

5.4.1 Duodeno

En el porcentaje de células CD3⁺ en duodeno, en los animales sin infección hubo un incremento en el grupo tratado gestacionalmente con WIN 55,212-2, sin embargo, en los animales infectados, esta misma población se vio incrementada con respecto a los otros dos grupos, pero esta diferencia no llegó a ser significativa (Figura 25-A).

No hubo diferencias ni en los porcentajes de positividad ni en la IMF para ninguno de los dos receptores a cannabinoides, a excepción de la IMF para CB2, pero sólo en los animales de los grupos controles, y se asoció a la infección (Figura 25-E).

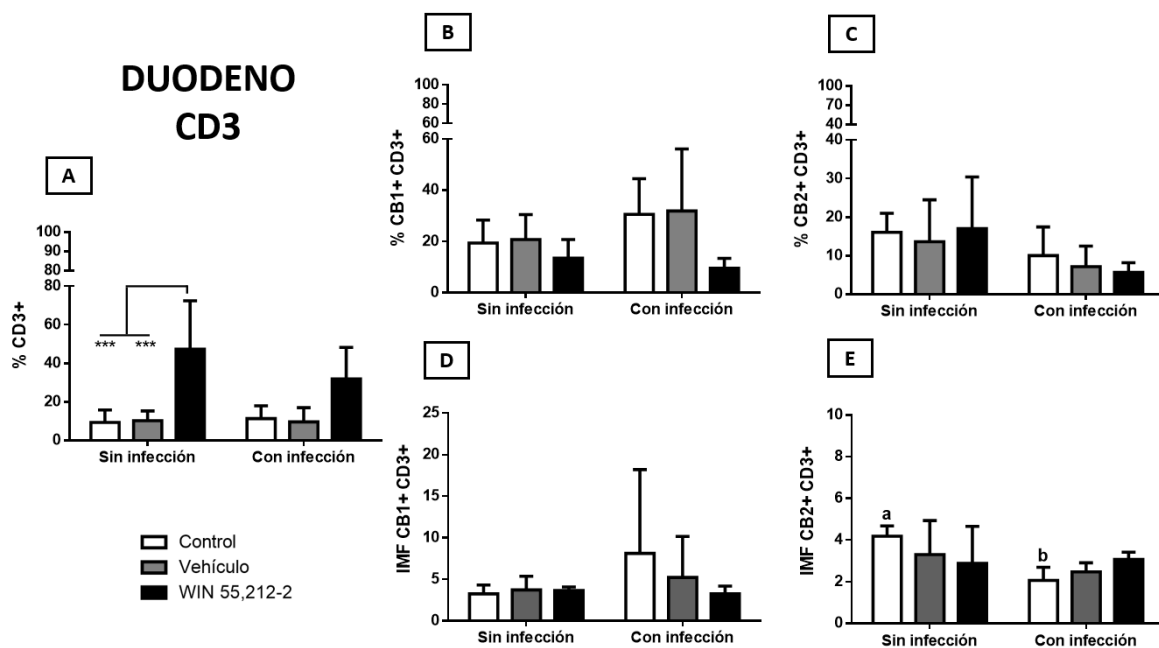


Figura 25. Células CD3⁺ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD3⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD3⁺ en duodeno. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD3⁺ de duodeno.

En el porcentaje de CD4⁺ no hubo diferencias entre los tratamientos, ni asociadas a la infección, sin embargo, al analizar los receptores a cannabinoides, estos no fueron detectados en duodeno (Figura 26).

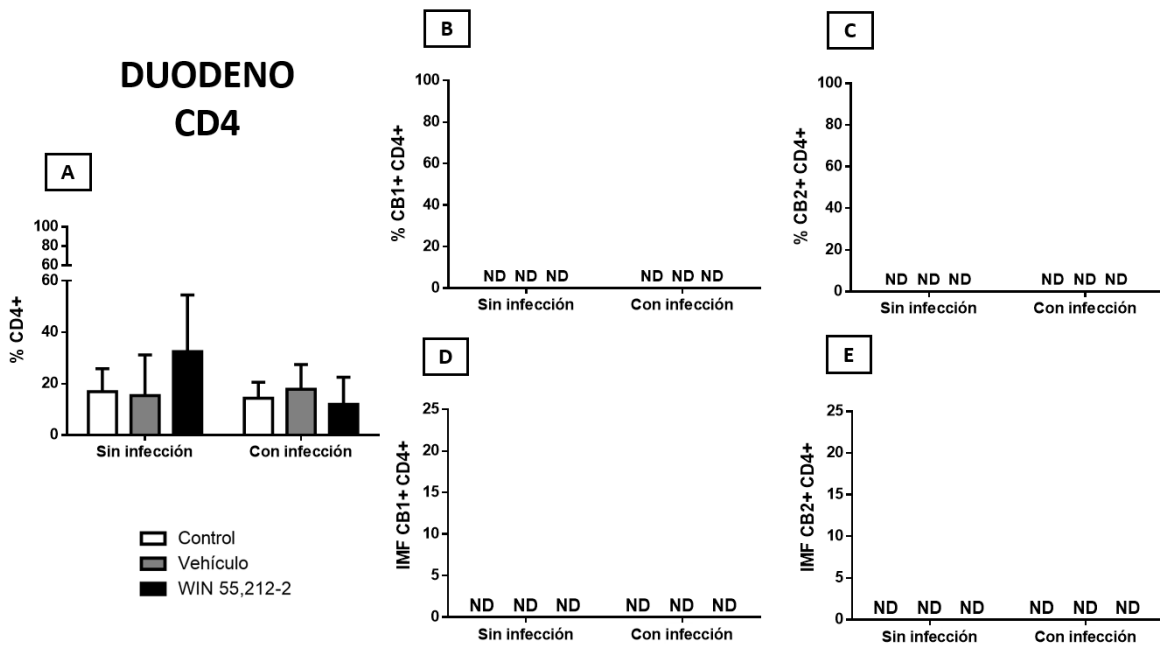


Figura 26. Células CD4⁺ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD4⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD4⁺ en duodeno. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD4⁺ de duodeno.

Las células CD8⁺ en duodeno mostraron un incremento asociado a la infección, pero sólo en los grupos controles, ya que los grupos tratados gestacionalmente con vehículo o WIN 55,212-2 no respondieron como los grupos controles.

En el caso del receptor CB1 no hubo diferencias, pero en el caso del receptor CB2, en grupo WIN 55,212-2 presentó un aumento en la población de células CD8⁺ que fueron positivas para CB2, sin embargo, cuando se observó la IMF para CB2, no hubo diferencias que indicaran que el grupo WIN 55,212-2 haya expresado más (Figura 27).

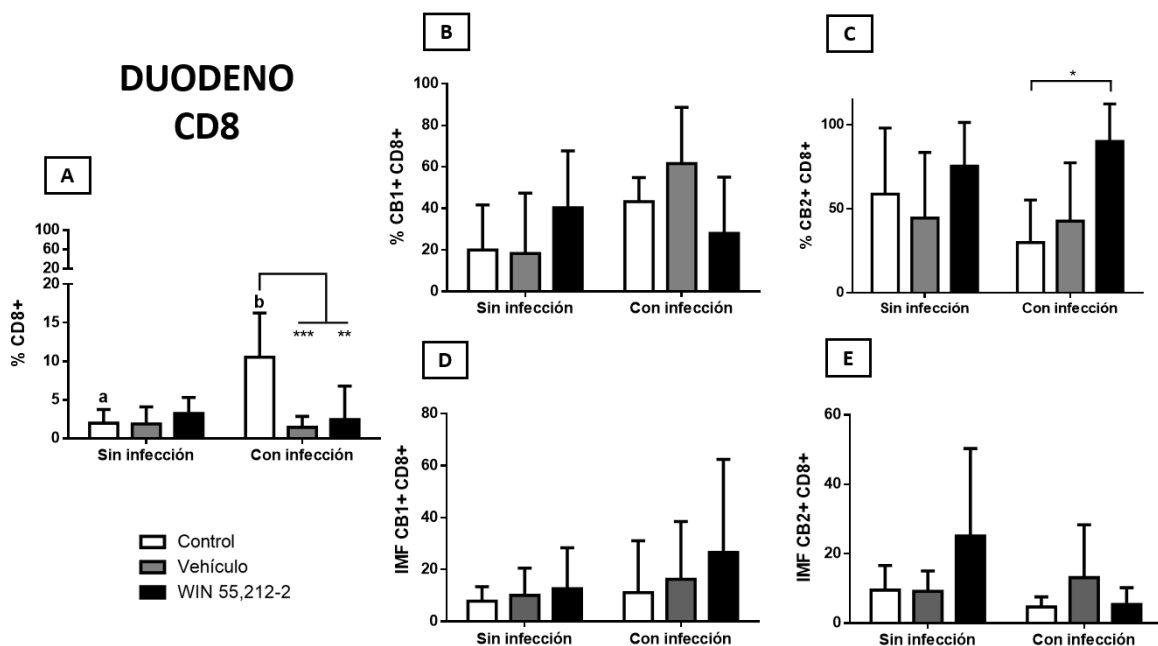


Figura 27. Células CD8⁺ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD8⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD8⁺ en duodeno. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD8⁺ de duodeno.

En el porcentaje de las células NK⁺, se puede observar (Figura 28-A) que el administrar vehículo o WIN 55,212-2, indujo un incremento en el porcentaje de estas poblaciones celulares y que, en presencia de la infección, en estos grupos se redujeron los porcentajes de células NK⁺.

No hubo diferencias en cuanto al receptor CB1, pero en el caso del receptor CB2, a pesar de que el porcentaje de células NK⁺ positivas para CB2 no mostró diferencia entre los diferentes grupos, sí lo hizo en la IMF el grupo tratado con WIN 55,212-2 al verse menos expresado en estas células (Figura 28-E).

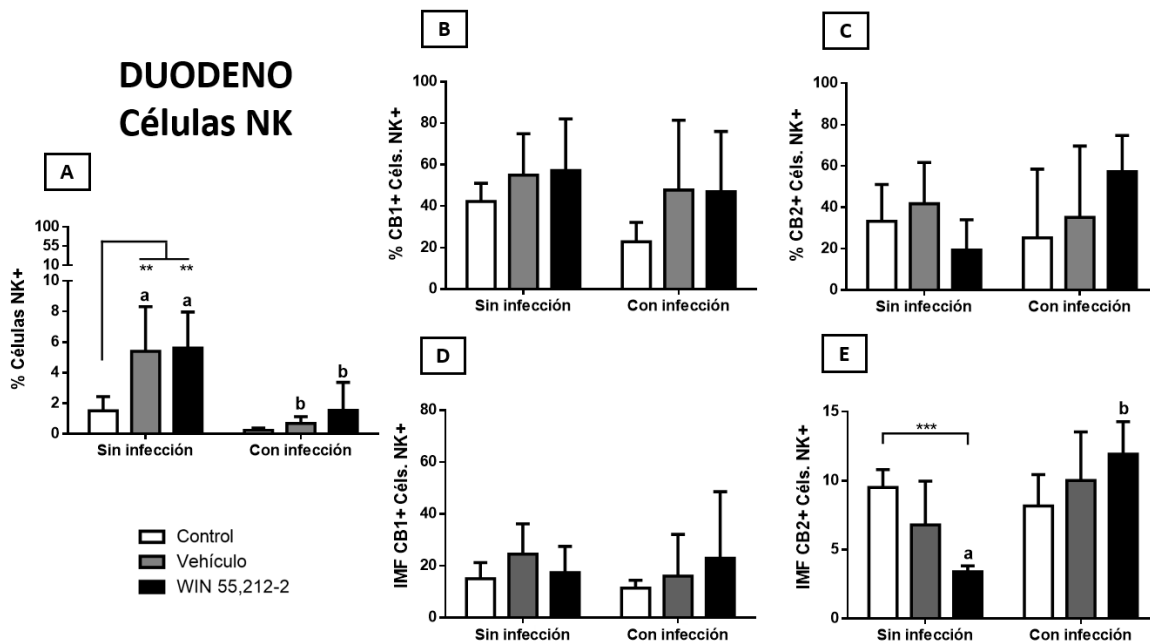


Figura 28. Células NK⁺ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células NK⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células NK⁺ en duodeno. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células NK⁺ de duodeno.

En duodeno, el porcentaje de células $T\gamma\delta^+$ en el grupo tratado con WIN 55,212-2 fue mayor, en comparación con los otros dos grupos, pero en condición de infección, fue el que menor porcentaje de células $T\gamma\delta^+$ presentó (Figura 29-A).

Las células $T\gamma\delta^+$ positivas al receptor CB1 se vieron disminuidas en el grupo control infectado, no así en los otros grupos con infección, sin embargo, la IMF para estos tres grupos con infección fueron similares y no mostraron diferencias.

Para el receptor CB2, no hubo diferencia entre los porcentajes de positividad, sin embargo, se expresaron menos en el grupo WIN 55,212-2 sin infección (Figura 29-E).

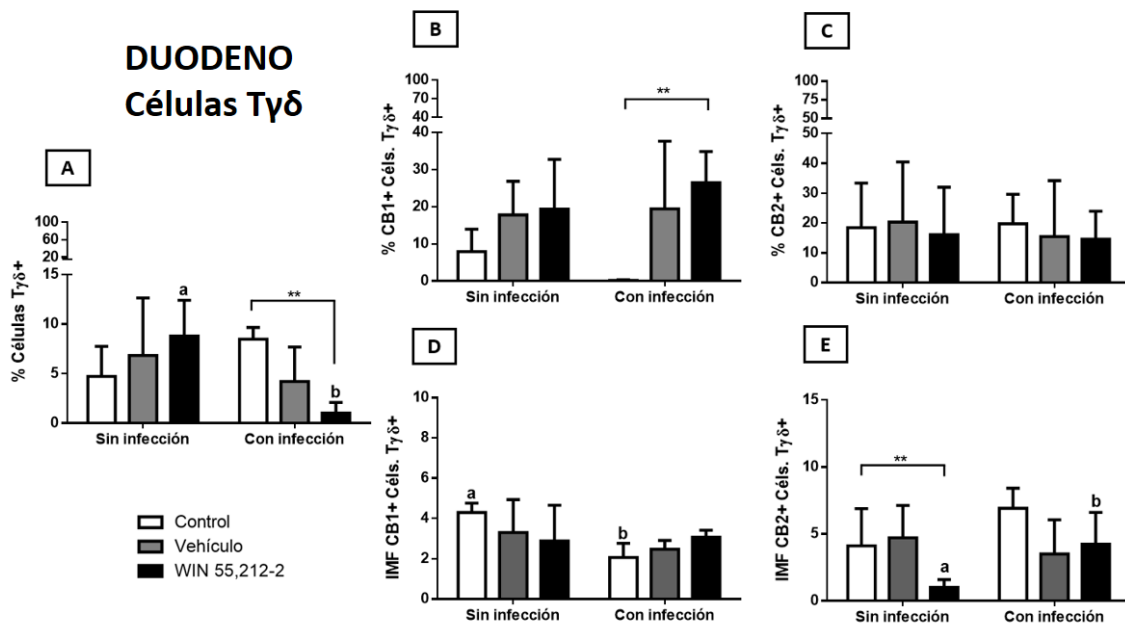


Figura 29. Células $T\gamma\delta^+$ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células $T\gamma\delta^+$ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células $T\gamma\delta^+$ en duodeno. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células $T\gamma\delta^+$ de duodeno.

Para la población celular CD45⁺, el grupo control con infección presentó un incremento en comparación con los grupos sin infección, sin embargo, en los otros dos grupos con infección no se apreció este incremento, aunque en el grupo tratado con WIN 55,212-2 e infectado con *T. spiralis*, se presentó un incremento de positividad para los receptores CB1 (Figura 30-B), aunque no en la IMF.

En cuanto al receptor CB2, no hubo diferencia ni en el porcentaje de positividad en estas células, ni en la IMF.

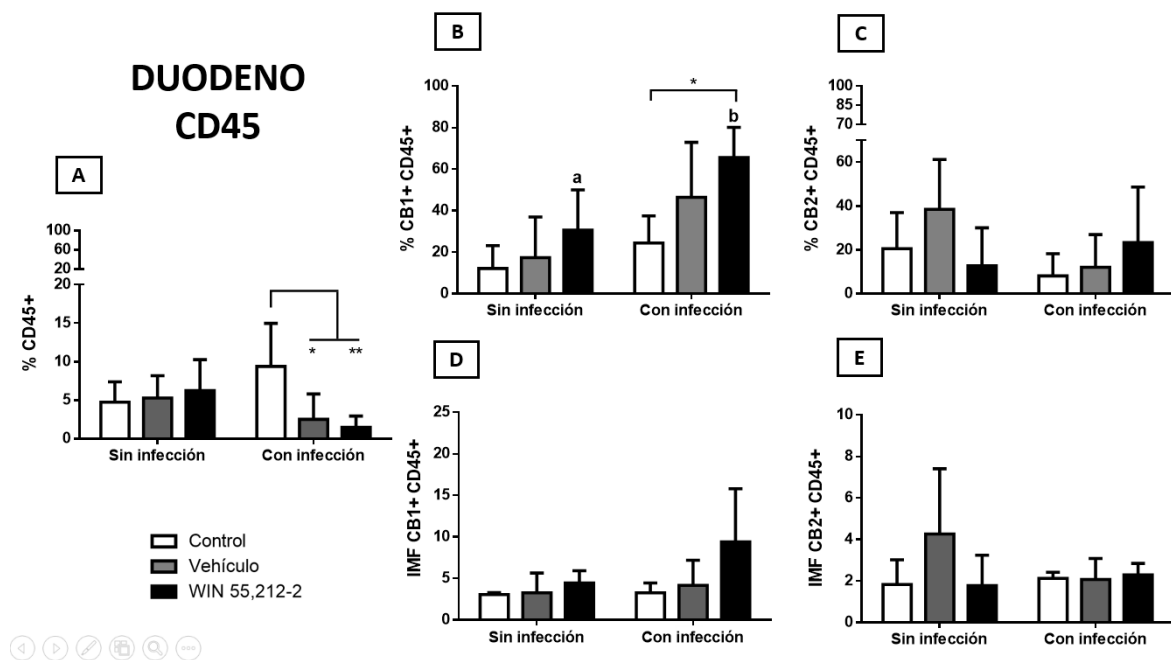


Figura 30. Células CD45⁺ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD45⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD45⁺ en duodeno. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD45⁺ de duodeno.

Para resumir los resultados obtenidos por citometría de flujo en el duodeno se puede decir que los porcentajes de las poblaciones de células CD3⁺, NK⁺ y Tγδ⁺ se encontraron aumentados en los grupos tratados con WIN 55,212-2, mientras que cuando este grupo estaba infectado, los porcentajes para las células NK⁺ y Tγδ⁺ se disminuyeron, mientras que en el grupo control infectado, los porcentajes para CD3⁺ y CD45⁺ se aumentaron. Interesantemente, en duodeno, la población CD4⁺ no fue detectada. En cuanto a los receptores a cannabinoides en duodeno, no hubo diferencias entre los grupos sin infección, mientras que el receptor CB1 se presentó en mayor proporción en las poblaciones de las células Tγδ⁺ y CD45⁺ en el grupo WIN 55,212-2 infectados, mientras que el receptor CB2 se presentó en mayor porcentaje en el grupo WIN 55,212-2 infectado. Además, se encontraron diferencias significativas asociadas a la infección y no por el tratamiento gestacional, para el receptor CB1 se observó que las células CD45⁺ lo expresaron más en el grupo WIN 55,212-2 con infección. También se observó que la IMF para el receptor CB2 en las células NK⁺ y Tγδ⁺ fue baja en el grupo WIN 55,212-2 al compararse con el control, pero ante el reto inmunológico, se expresó más el receptor CB2 en estas subpoblaciones celulares que ante sus grupos sin infección.

5.4.2 Ganglios linfáticos mesentéricos

En los GLM, los porcentajes de células CD3⁺ (Figura 31) no presentaron diferencias entre los grupos que no fueron infectados, sin embargo, en presencia de la infección, los grupos tratados gestacionalmente con el vehículo o con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2, se encontró disminuido el porcentaje de las células CD3⁺, siendo el efecto observado dependiente de la infección en estos dos grupos.

En cuanto a la positividad de los receptores a cannabinoides, así como su intensidad media de fluorescencia, no presentaron diferencia significativa, ni con respecto al tratamiento ni a la infección.

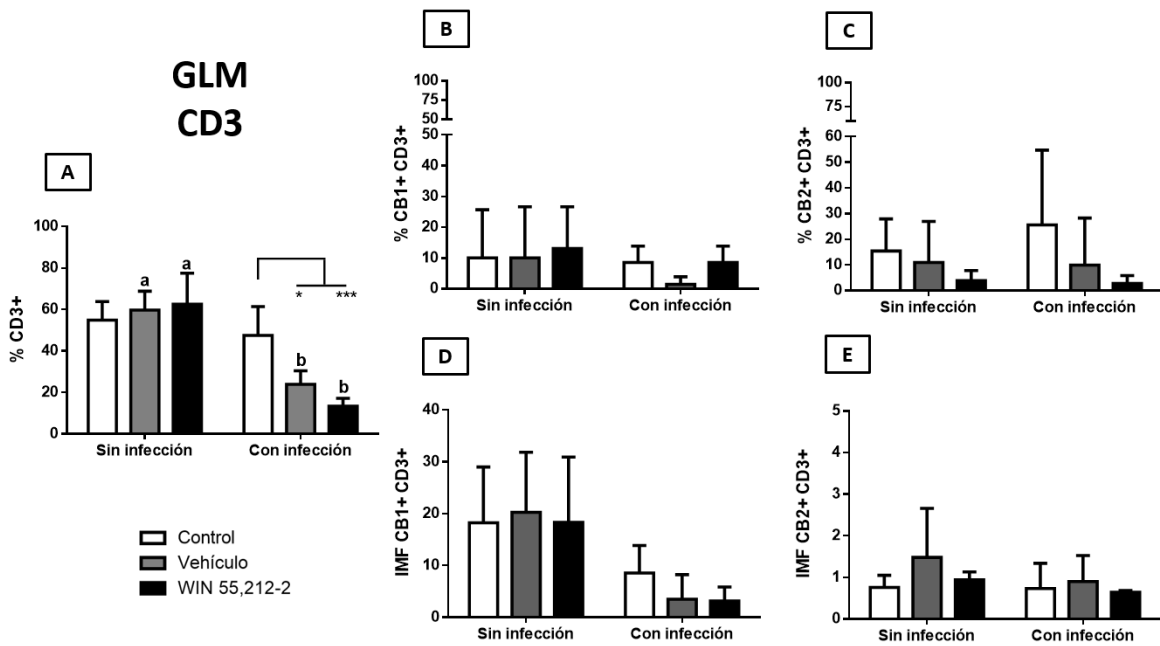


Figura 31. Células CD3⁺ en muestras de GLM de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD3⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD3⁺ en GLM. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD3⁺ de GLM.

En la figura 32 se observan los resultados obtenidos para la población celular CD4⁺ en los GLM. Los porcentajes de CD4⁺ se encontraron aumentados en el grupo tratado con WIN 55,212-2, en comparación con el grupo control, sin embargo, ante el reto inmunológico, este mismo grupo junto con el grupo vehículo, se vieron disminuidos en comparación con el grupo control.

En cuanto al porcentaje de positividad en esta población, para el receptor CB1 se representó una diferencia que se asoció a la infección entre los grupos tratados con el cannabinoide, mientras que para el receptor CB2 la diferencia se presentó entre los grupos control, mientras que los grupos vehículo y WIN 55,212-2 se comportaron de manera similar sin y con la infección. En cuanto a la IMF para estos dos receptores, no hubo diferencia alguna, ni debida a los tratamientos ni asociada a la infección.

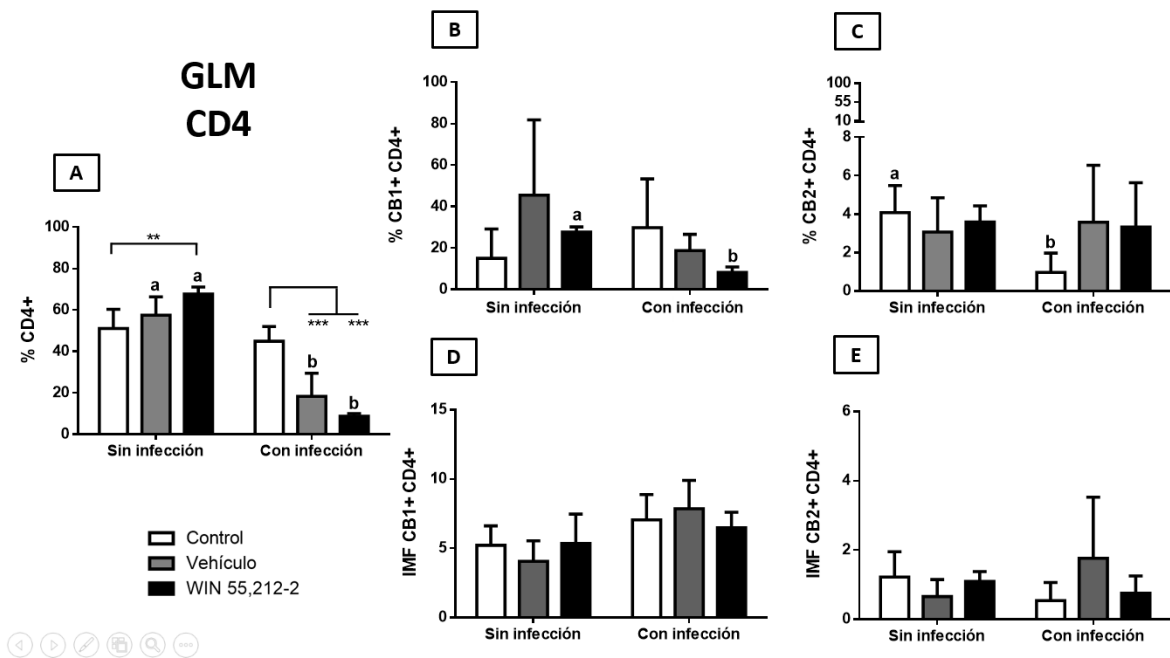


Figura 32. Células CD4⁺ en muestras de GLM de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD4⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD4⁺ en GLM. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD4⁺ de GLM.

En la población celular CD8⁺ no se obtuvo diferencia alguna en el porcentaje de esta entre todos los grupos experimentales. Tampoco hubo diferencia en el porcentaje de positividad para alguno de los receptores a cannabinoides, y en cuanto a la IMF, para el receptor CB1 tampoco hubo diferencias, pero para la IMF del receptor CB2 en las células CD8⁺, como se observa en la figura 33, que el tratamiento con WIN 55,212-2 indujo una menor intensidad de señal, aunque cuando este grupo se encontraba en presencia de la infección se comportó como los otros dos grupos.

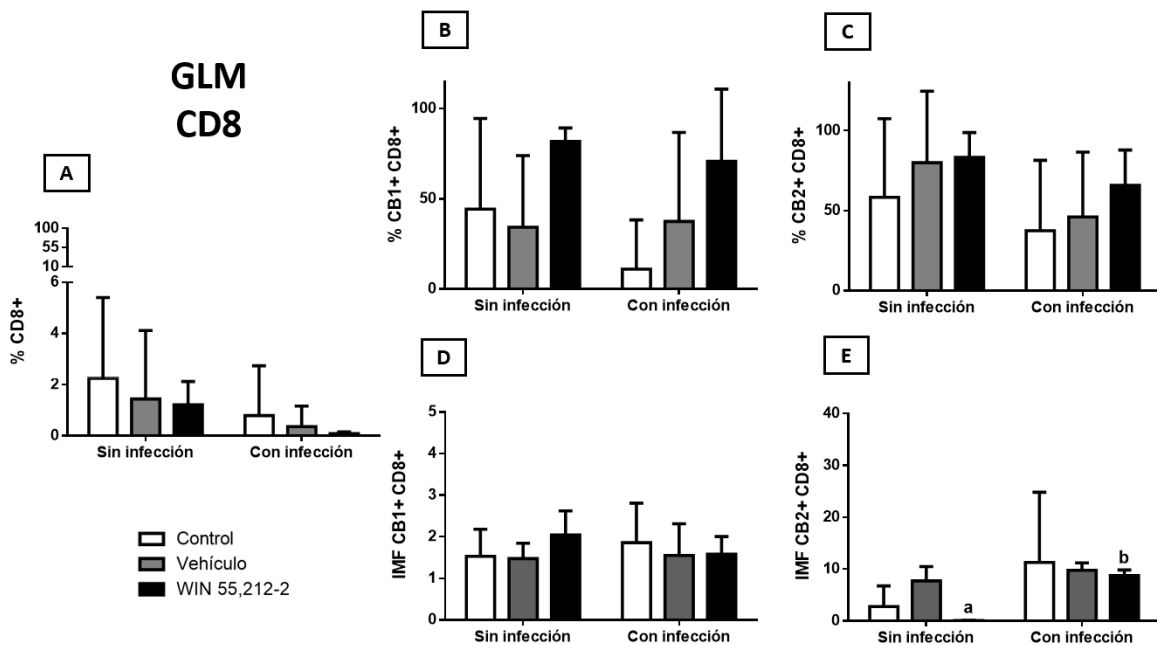


Figura 33. Células CD8⁺ en muestras de GLM de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD8⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD8⁺ en GLM. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD8⁺ de GLM.

El porcentaje de las células NK⁺ se vio disminuido en presencia de la infección con *T. spiralis* a nivel de los GLM. En cuanto al porcentaje de positividad para los receptores a cannabinoides, CB1 y CB2, se encontró disminuido en los animales tratados con el cannabinoides, mientras que, en condición de infección, en este mismo grupo, se incrementó el porcentaje de positividad para ambos receptores.

La intensidad media de fluorescencia para CB1 en las células NK⁺ de los GLM disminuyó en el grupo tratado con WIN 5,212-2, y en presencia de la infección aumentó. Con respecto a la IMF para CB2 en las células NK⁺ en el grupo tratado con el cannabinoide e infectado hubo una disminución de este (Figura 34).

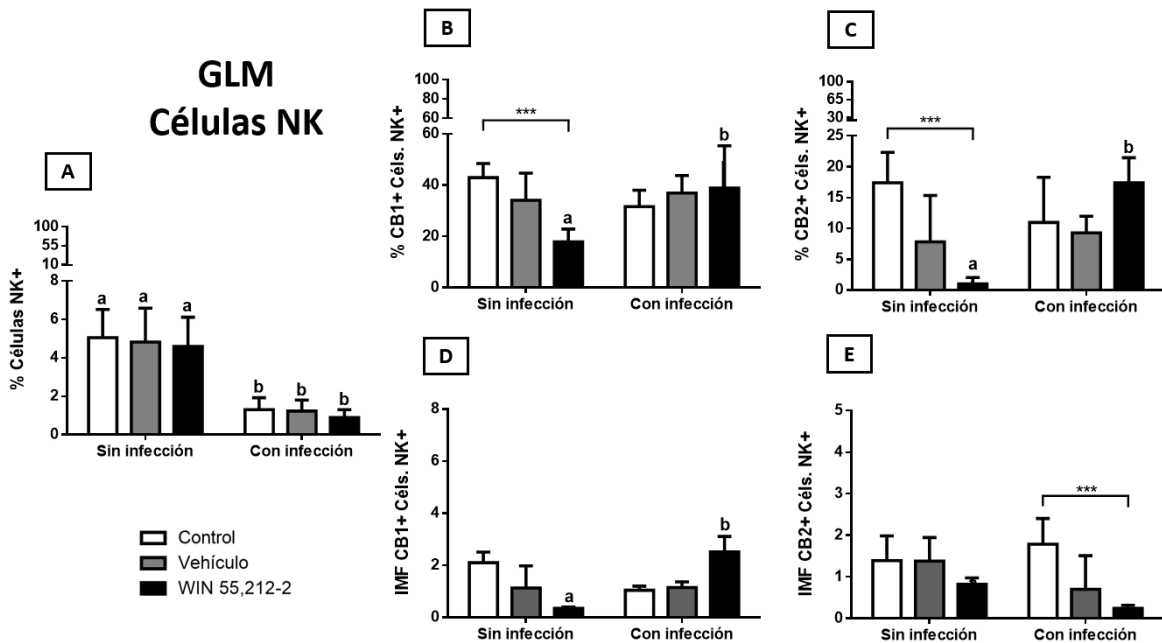


Figura 34. Células NK⁺ en muestras de GLM de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células NK⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células NK⁺ en GLM. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células NK⁺ de GLM.

Las células $\text{T}\gamma\delta^+$ presentaron porcentajes menores en todos los grupos con infección, aunque hay que señalar que los porcentajes para estas células son valores muy pequeños.

No se pudo detectar la presencia del receptor CB1, mientras que para el receptor CB2, podemos ver que el grupo tratado con el cannabinoide sintético disminuyó en esta subpoblación, aunque la IMF indique que puede actuar de manera similar a los de los otros dos grupos. En cuanto a los grupos infectados, se presentó un incremento en el porcentaje de positividad a CB2 en el grupo tratado con WIN 55,212-2, pero la IMF indicó que pudo estar menos expresado (Figura 35).

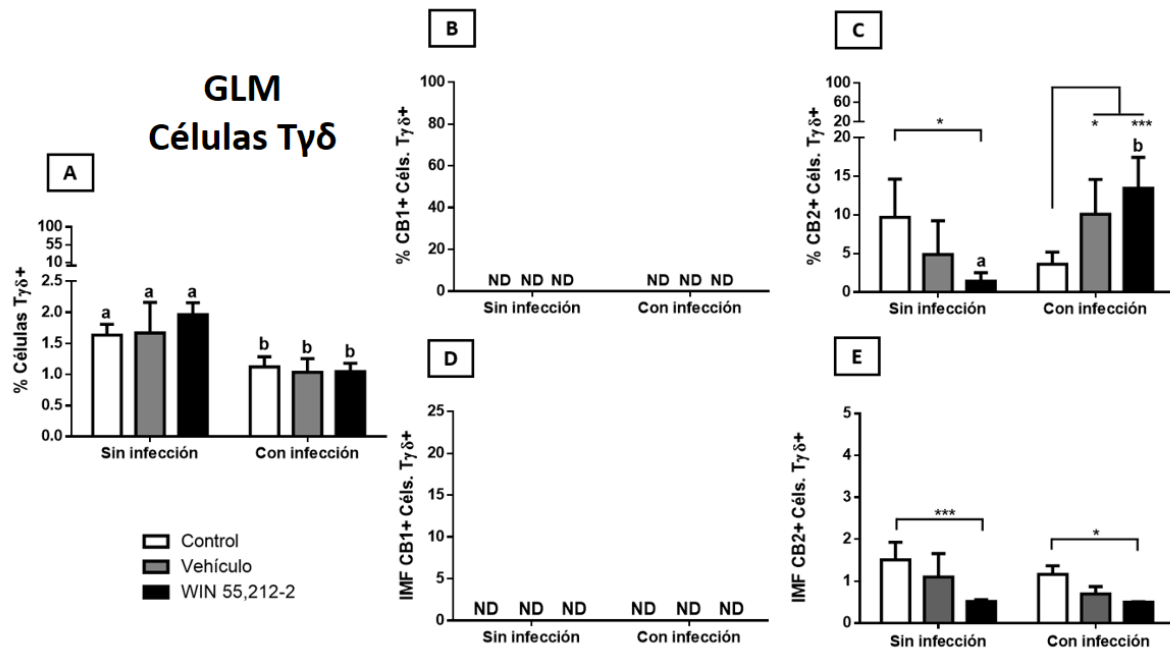


Figura 35. Células $T\gamma\delta^+$ en muestras de GLM de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células $T\gamma\delta^+$ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células $T\gamma\delta^+$ en GLM. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células $T\gamma\delta^+$ de GLM.

En la figura 36 se presentan los resultados obtenidos para la subpoblación $CD45^+$. En el porcentaje de esta subpoblación, podemos observar que el grupo tratado con WIN 5,212-2 presentó un aumento en el mismo, pero bajo la condición de infección, esta subpoblación disminuyó en el mismo grupo celular.

En cuanto al porcentaje de positividad para CB1 no se presentó diferencia alguna, aunque sí la hubo en la IMF, ya que el grupo tratado con el cannabinoide obtuvo una expresión mayor, en comparación con el control.

En el caso de CB2, el tratamiento con el cannabinoide indujo un decremento en el porcentaje de positividad a CB2, mientras que en los grupos controles, la infección

produjo una disminución en el porcentaje de positividad para CB2, aunque la IMF no se ve alterada, ni en función del tratamiento ni asociado a la infección.

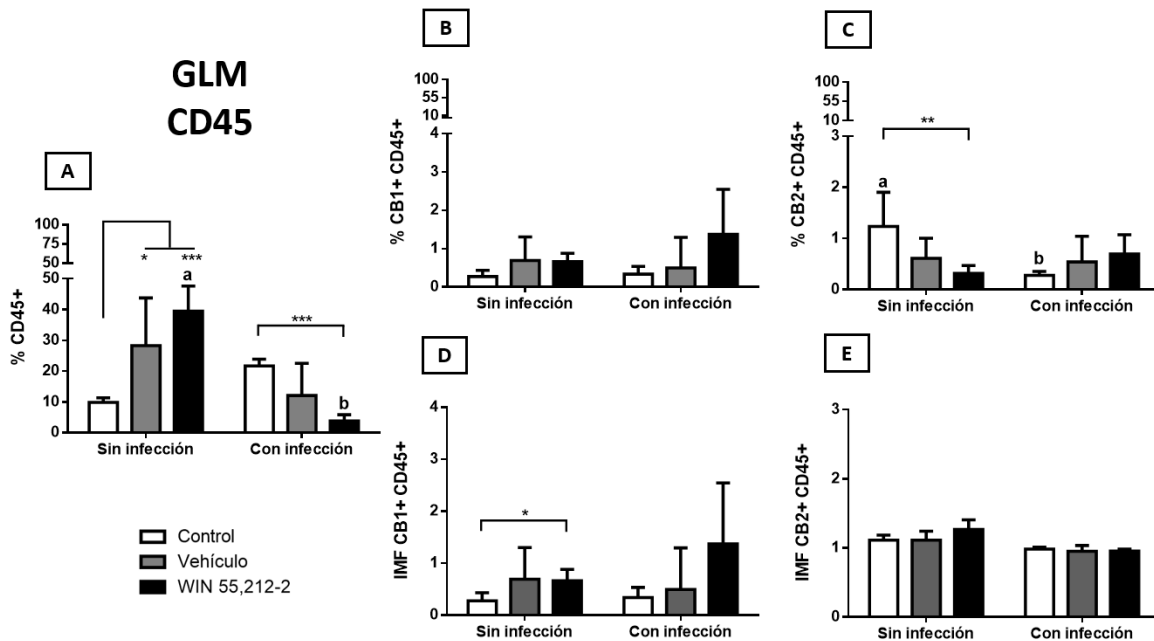


Figura 36. Células CD45⁺ en muestras de GLM de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD45⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD45⁺ en GLM. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD45⁺ de GLM.

Los resultados para los GLM nos indicaron que el tratamiento gestacional con el cannabinoide sintético indujo un aumento en los porcentajes de células CD4⁺ y CD45⁺ y que, en estas subpoblaciones, además de CD3⁺, en presencia de la infección, disminuyeron.

Las células NK⁺ se expresaron menor proporción del receptor CB1 en los animales tratados únicamente con WIN 55,212-2, mientras que para el receptor CB2, las células NK⁺, T γ δ ⁺ y CD45⁺ se expresaron en menores cantidades en el mismo grupo experimental,

y ante el reto inmunológico, las células $T\gamma\delta^+$ fueron más positivas a expresar el receptor CB2, el cual se expresó de manera baja. Los receptores CB1 no fueron detectados en las células $T\gamma\delta^+$ de los GLM.

Efectos propios de la infección a nivel de los GLM fueron que los porcentajes de células NK^+ y $T\gamma\delta^+$ se disminuyeron a los 5 dpi, además de que los receptores CB1 y CB2 que se encontraban expresados en las células NK^+ se incrementaron en el grupo tratado con WIN 55-212-2 infectado.

5.4.3 Bazo

El porcentaje de $CD3^+$ en bazo no se alteró ni por el tratamiento gestacional ni asociado a la infección (Figura 37-A). En cuanto al porcentaje de positividad al receptor CB1 en esta subpoblación no hubo diferencia, pero en la IMF, el grupo tratado con WIN 55,212-2 se expresó en mayor proporción, en comparación con el grupo control, además de que la infección indujo un incremento en el grupo control, no así en los otros dos grupos. El porcentaje de positividad para el receptor CB2 disminuyó en el grupo control infectado, haciendo que haya diferencia significativa en comparación con el grupo tratado con vehículo.

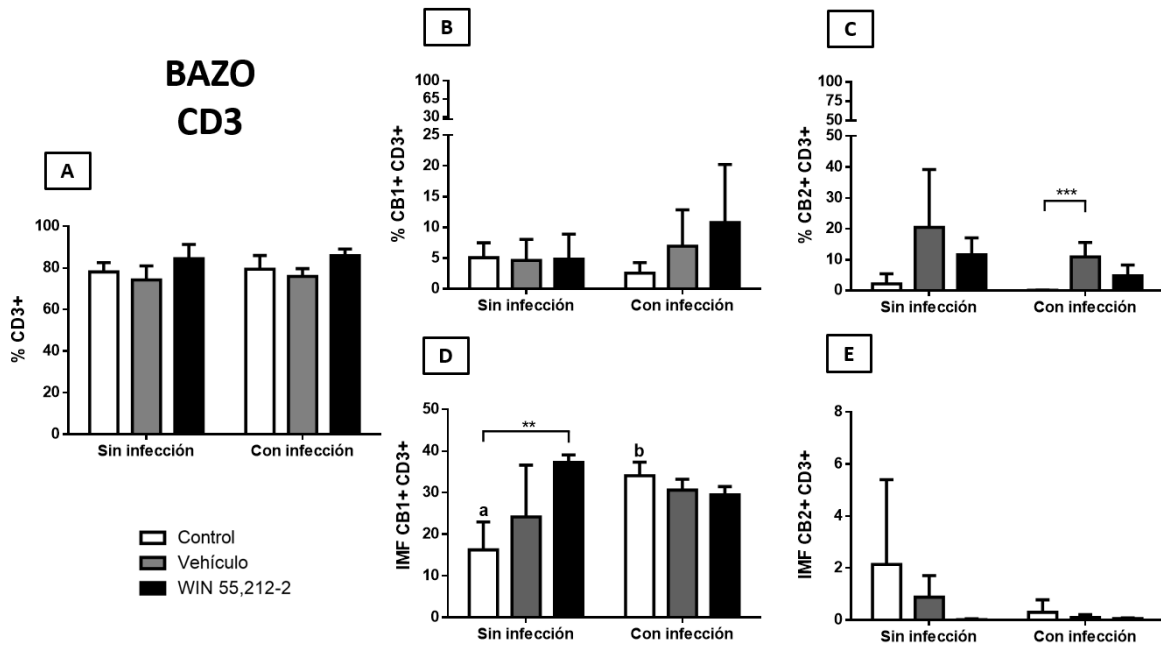


Figura 37. Células CD3⁺ en muestras de bazo de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD3⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD3⁺ en bazo. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD3⁺ de bazo.

En la población celular CD4⁺ no hubo diferencias significativas ni el porcentaje de estas, ni en el porcentaje de positividad para el receptor CB1 ni para su IMF correspondiente. Lo único llamativo se presentó en las células CD4⁺ que expresan CB2, ya que si se observa la figura 38-C, en los grupos controles no se expresó gran cantidad de este receptor, sin embargo, en los grupos tratados con el vehículo o con el cannabinoide que fueron infectados, presentaron un mayor porcentaje de positividad a este receptor, aunque su IMF no indicó que se expresaran más.

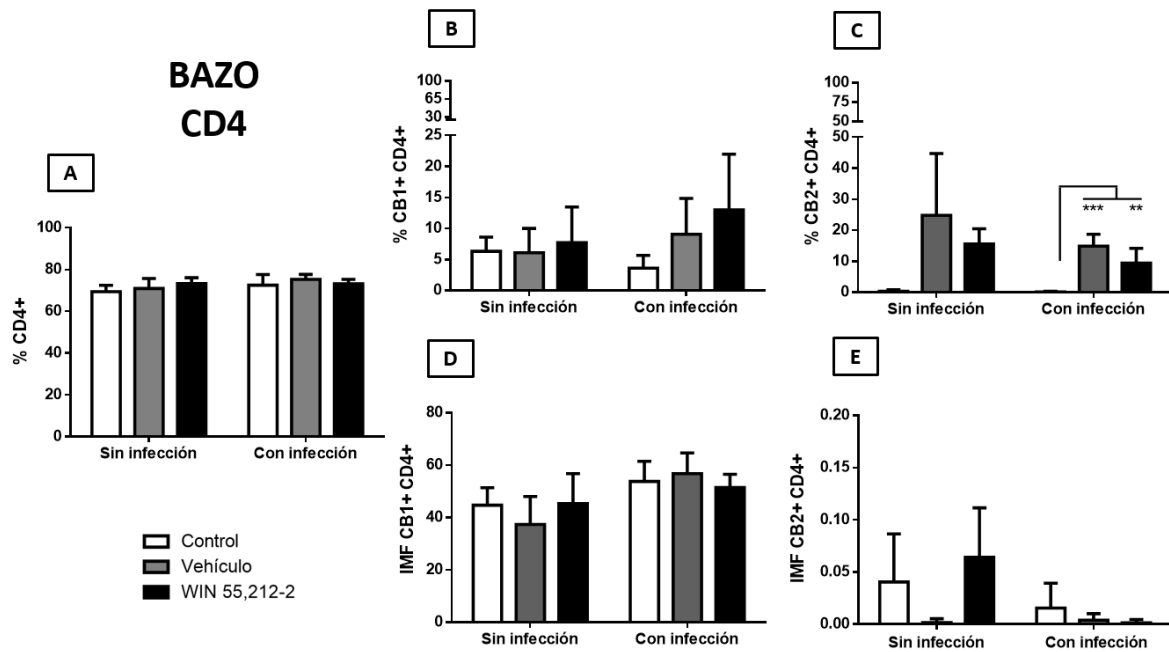


Figura 38. Células CD4⁺ en muestras de bazo de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD4⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD4⁺ en bazo. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD4⁺ de bazo.

En el grupo tratado con el cannabinoide se presentó un menor porcentaje para la población CD8⁺ en bazo, ya sea en ausencia o presencia de la infección. No hubo diferencias en cuanto al receptor CB1, mientras que para el receptor CB2 se presentó un menor porcentaje de positividad en el grupo WIN 55,212-2 en presencia de infección, y se asoció con un nivel bajo de expresión (Figura 39).

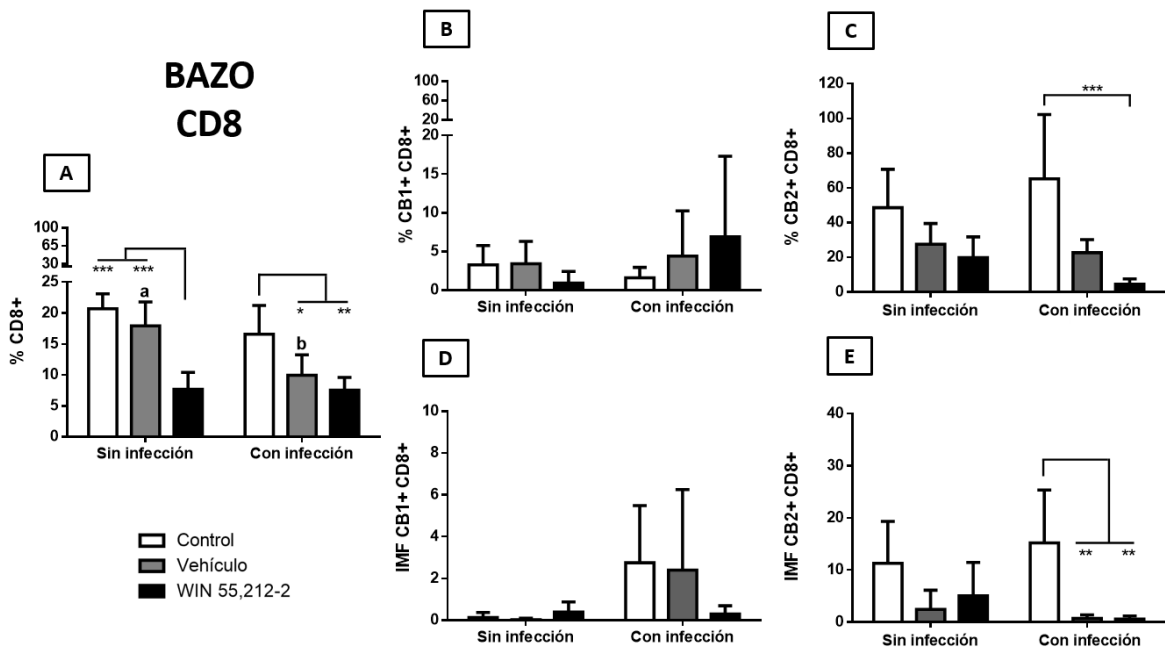


Figura 39. Células CD8⁺ en muestras de bazo de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD8⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD8⁺ en bazo. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD8⁺ de bazo.

En la figura 40 se aprecia que el grupo tratado gestacionalmente con el cannabinoide sintético es el que tuvo más cambios con relación a las células NK⁺ en el bazo. Primeramente, en el porcentaje total de células NK⁺ el grupo WIN 55,212-2 presentó mayor porcentaje al compararse con el grupo control, y en condiciones de infección, es el que menos porcentaje presentó.

El porcentaje de positividad para los receptores CB1 y CB2 disminuyó en el grupo WIN 55,212-2, así como su expresión en ambos casos. Cuando se encontraban infectados, los porcentajes de positividad fueron mayores que el grupo control, y su IMF también se incrementó.

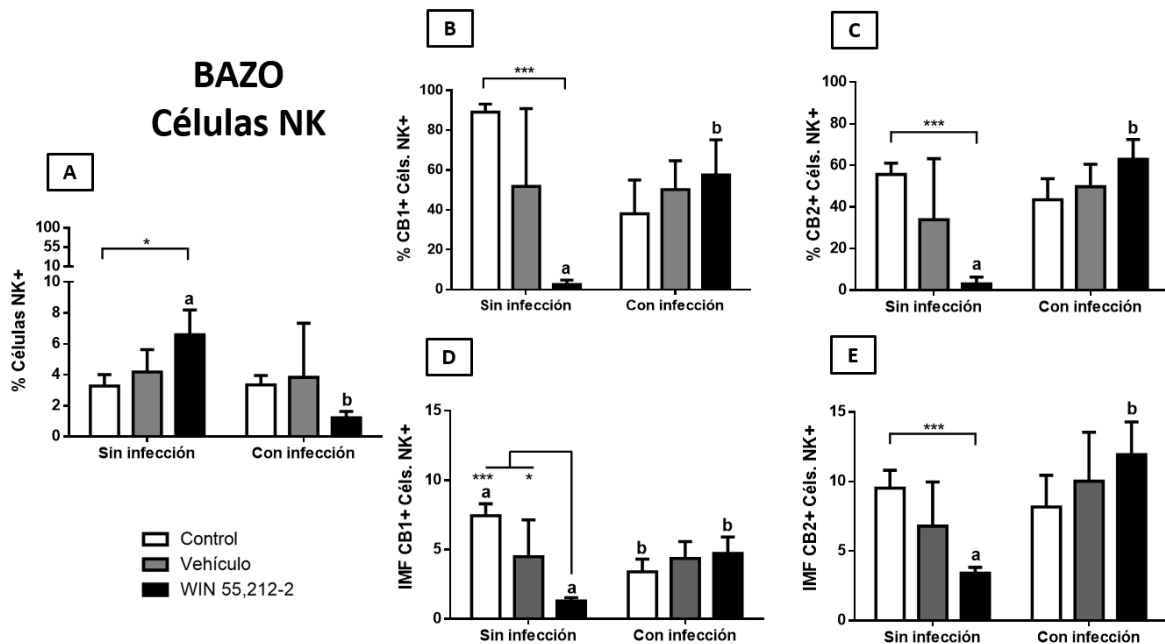


Figura 40. Células NK⁺ en muestras de bazo de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células NK⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células NK⁺ en bazo. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células NK⁺ de bazo.

Los porcentajes de células $T\gamma\delta^+$ en el grupo tratado con WIN 55,212-2 fueron mayores que el grupo control, y en condiciones de infección estos se observaron disminuidos.

Los receptores CB1 y CB2 no se detectaron en el grupo tratado con el cannabinoide, pero en este mismo grupo en presencia de la infección ya fueron detectables (Figura 41).

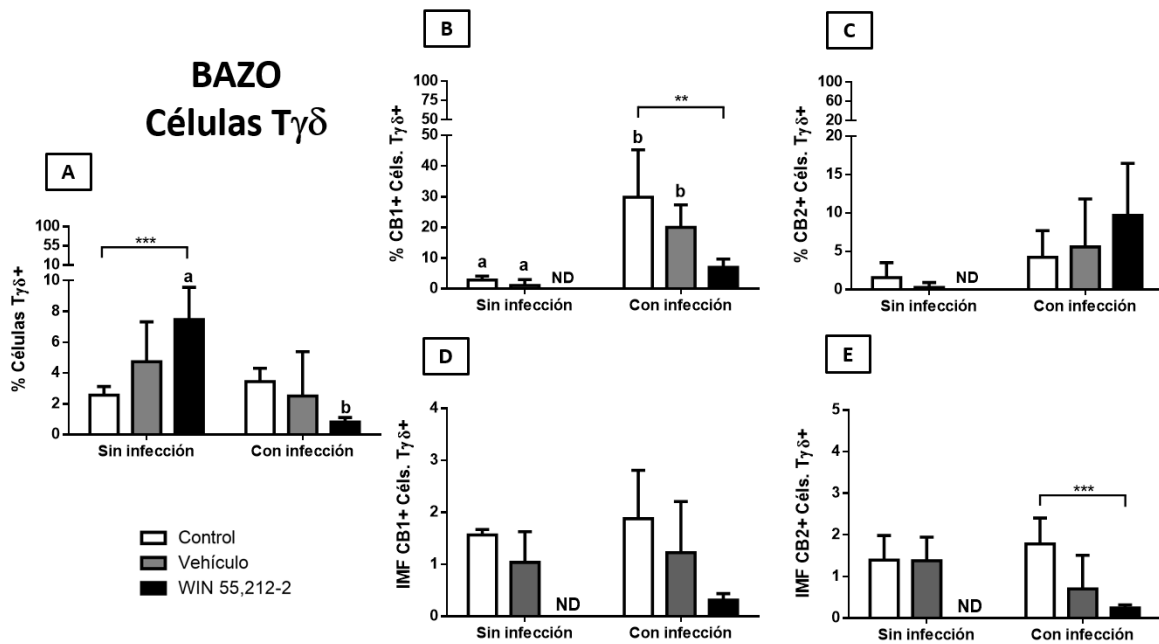


Figura 41. Células $T\gamma\delta^+$ en muestras de bazo de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células $T\gamma\delta^+$ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células $T\gamma\delta^+$ en bazo. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células $T\gamma\delta^+$ de bazo.

En la figura 42 se observan los resultados obtenidos para la población celular $CD45^+$ en bazo. El porcentaje de éste fue menor en el grupo WIN 55,212-2, en los grupos sin y con infección.

No se detectó al receptor CB1 en los grupos sin infección, pero en los grupos infectados fue posible detectarlos, siendo el grupo control el que mayor porcentaje de positividad presentó. En cuanto al grupo CB2 no hubo diferencia alguna.

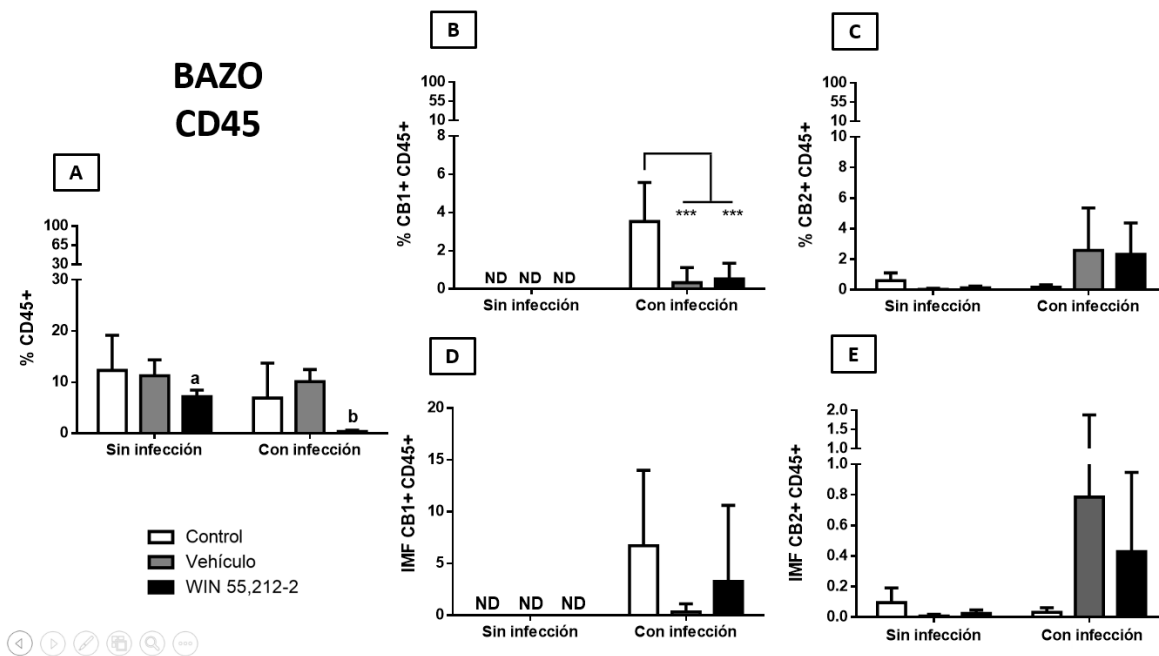


Figura 42. Células CD45⁺ en muestras de bazo de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2. Porcentaje de células CD45⁺ (A). Porcentaje de positividad para los receptores CB1 (B) y CB2 (C) en las células CD45⁺ en bazo. Intensidad media de fluorescencia de los receptores CB1 (D) y CB2 (E) en las células CD45⁺ de bazo.

En el órgano inmunológico de memoria, el bazo, se encontraron disminuidos los porcentajes de células CD8⁺ en el grupo tratado solamente con WIN 55,212-2, mientras que, en este mismo grupo, las células NK⁺ expresaron menor porcentaje de ambos receptores a cannabinoides, además de que sus IMF respectivas nos indican que se expresaron muy poco, en comparación con los otros dos grupos sin infección. Ninguno de los receptores se detectó en las células T $\gamma\delta$ ⁺ en los grupos que no fueron infectados.

Con la infección, los resultados fueron diferentes en el porcentaje de células CD8⁺ en el grupo WIN 55,212-2, ya que en presencia de la infección este disminuyó; y en cuanto al porcentaje de positividad para el receptor CB2 en las células CD3⁺ y CD4⁺ aumentó. En el caso de las células CD8⁺ disminuyó, éste último y las células T $\gamma\delta$ ⁺ presentaron las expresiones más bajas del receptor.

No se detectaron receptores CB1 ni CB2 en los animales tratados únicamente con WIN 55,212-2, aunque bajo la condición de infección sí. Hay que mencionar que esta es una subpoblación que está presente principalmente en mucosas, y que en este análisis se contó con una cantidad baja de ello desde los porcentajes totales, y que puede ser una explicación a que no se hayan detectado.

Entre los cambios asociados a la infección y no al tratamiento se encuentran que los porcentajes de células NK⁺, T γ δ ⁺ y CD45⁺ disminuyeron en el grupo tratado con el cannabinoide y que fueron infectados, además de que el porcentaje de positividad del receptor CB1 en las células NK⁺ aumentó en el grupo infectado.

5.5 Expresión de RNA mensajero en muestras de duodeno y bazo

Se determinaron las expresiones relativas del RNA mensajero para las citocinas IL-1 β , IL-4 e IL-13 en muestras de duodeno y de bazo.

En la figura 43 se observan las expresiones relativas para la IL-4, del lado izquierdo en muestras de duodeno, mientras que en el lado derecho se encuentran los resultados obtenidos en muestras de bazo. En duodeno, entre los animales que solo recibieron o no tratamiento gestacional no hubo diferencias significativas, mientras que entre los grupos con infección tampoco la hubo. Lo interesante está al comparar los grupos vehículo, ya que se presentó diferencia significativa asociada con la infección, no así en los grupos controles y los tratados gestacionalmente con WIN 55,212-2. En el caso de bazo no hubo diferencia significativa alguna.

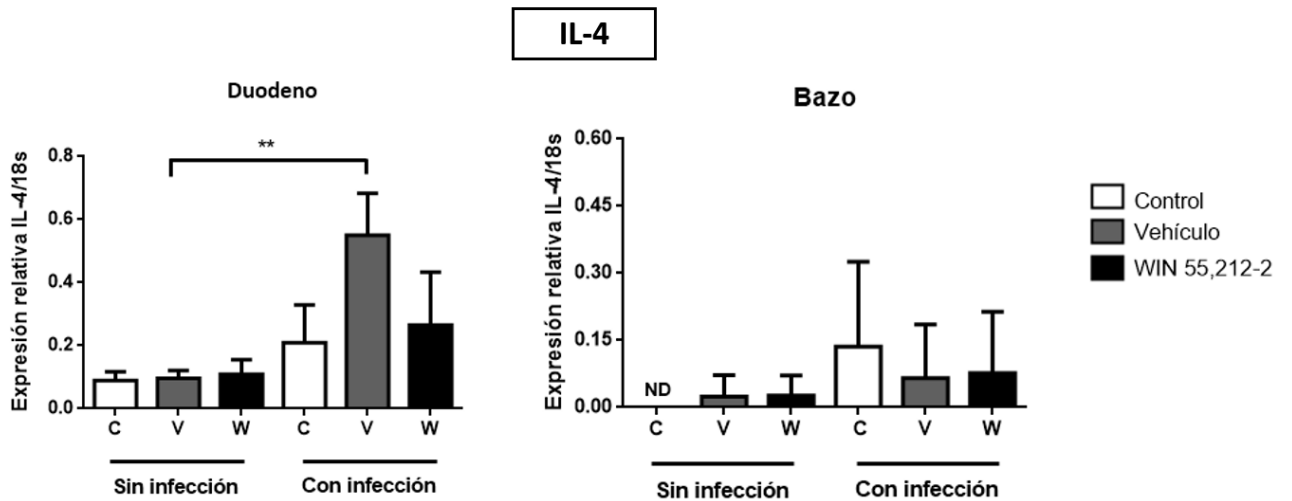


Figura 43. Expresión del RNA mensajero para IL-4 en duodeno (izquierda) y bazo (derecha) en animales sin y con infección. La densidad relativa se obtuvo con relación al gen constitutivo 18s.

En el caso de la otra citocina analizada del perfil Th2, IL-13, los resultados obtenidos fueron similares a los de IL-4, en duodeno no hubo diferencia entre los tres grupos experimentales, ya sea sin y con infección, y la única diferencia se presentó entre los grupos que recibieron prenatalmente el vehículo, mientras que en el bazo no hubo diferencia alguna (Figura 44).

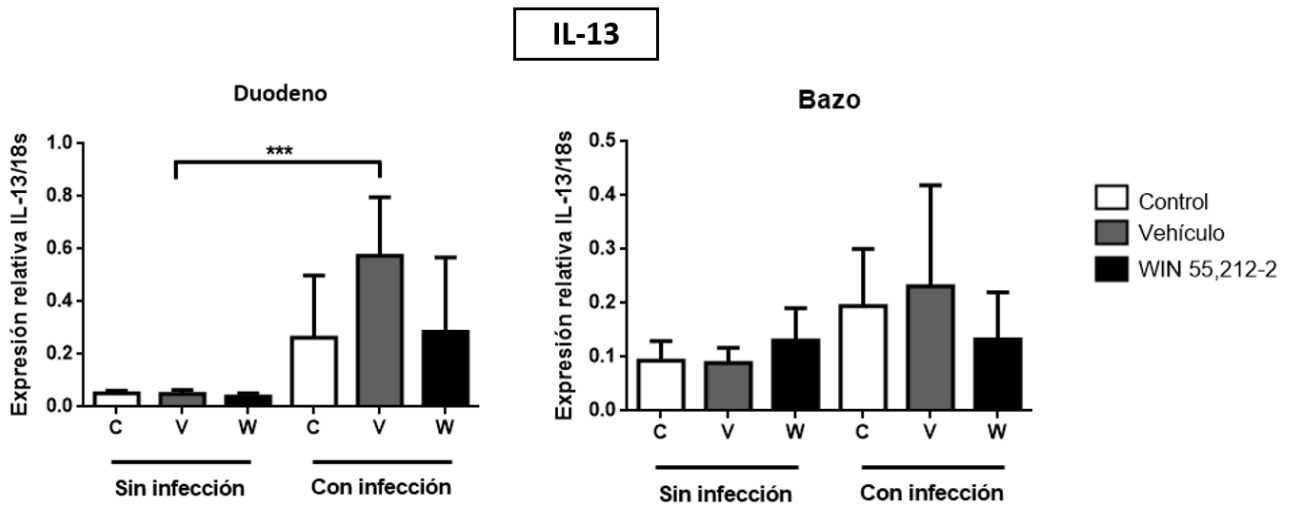


Figura 44. Expresión del RNA mensajero para IL-13 en duodeno (izquierda) y bazo (derecha) en animales sin y con infección. La densidad relativa se obtuvo con relación al gen constitutivo 18s.

Los resultados obtenidos para IL-1 β (Figura 45) mostraron el mismo patrón que para las dos citocinas anteriores, IL4 e IL3, debido a que, en el duodeno, no hay diferencias entre los grupos que fueron o no infectados, sin embargo, entre los grupos vehículos sí se presentaron diferencias, al presentar el grupo vehículo infectado una mayor expresión relativa, en comparación al grupo vehículo sin infección. Mientras que en el bazo no hubo diferencias entre ningún grupo experimental, aunque se puede apreciar una leve tendencia a disminuir la expresión de esta citocina en los grupos con infección.

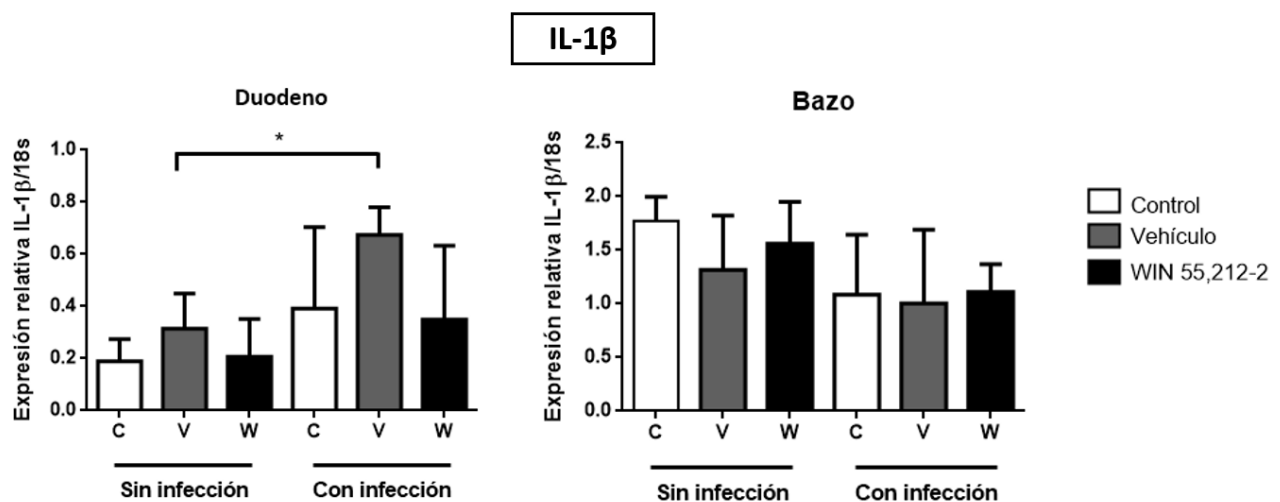


Figura 45. Expresión del RNA mensajero para IL-1 β en duodeno (izquierda) y bazo (derecha) en animales sin y con infección. La densidad relativa se obtuvo con relación al gen constitutivo 18s.

5.6 Detección de anticuerpos totales por ELISA

Por último, se midieron los títulos de anticuerpos totales en todos los grupos experimentales, y los resultados se pueden observar en la figura 46. Entre los grupos que no fueron infectados se observa una pequeña diferencia ($p=0.0055$) entre los grupos control y los tratados gestacionalmente con WIN 55,212-2, mientras que en los animales

que fueron infectados con *T. spiralis* no hubo diferencias entre los tres grupos, control, vehículo y WIN 55,212-2. La infección indujo que entre los grupos control y vehículo sean significativamente diferentes, al verse disminuidos los títulos de anticuerpos totales, sin embargo, en los animales de los grupos tratados con WIN 55,212-2, no se presentó diferencia asociada a la infección.

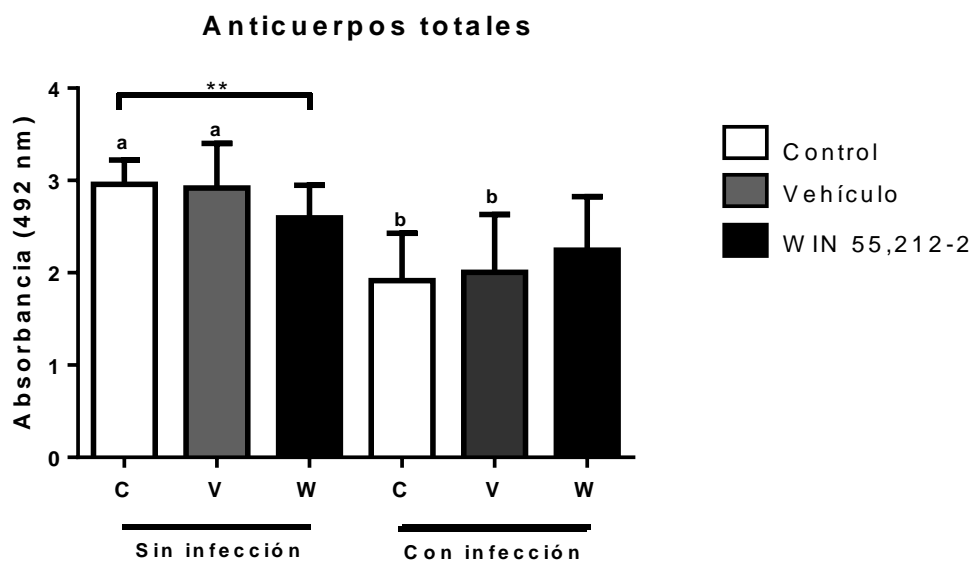


Figura 46. Anticuerpos totales mediante la técnica de ELISA. Se midieron los títulos de IgG totales en los sueros de los animales de los 3 grupos experimentales (Control, Vehículo y WIN 55,212-2), en ausencia o presencia de infección. (n=7 por grupo, 3 pozos por animal, dos ensayos independientes).

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se administró durante la gestación un cannabinoide sintético, el WIN 55,212-2, un análogo del THC, y se evaluó en las crías adultas si hay efectos en el sistema inmunológico de las mismas, con la finalidad de tener estudios básicos que permitan entender los procesos en los humanos.

Con la dosis y esquema de administración de WIN 55,212-2 utilizada en este estudio (0.5 mg/Kg, del DG5 al DG16) no se reportaron diferencias significativas en los parámetros de reproducción como lo es la duración de la gestación, el número y peso de las obtenido de crías, así como la mortalidad postgestacional, resultados que concuerdan con los de Harbison y cols., en donde al utilizar dosis mayores de 1 mg/Kg, incluyendo el DG1 al DG6, se aumenta la frecuencia de absorciones fetales y de malformaciones al nacimiento (Harbison, *et al.*, 1972). Es por ello por lo que se puede afirmar que los resultados aquí presentados son causados por el tratamiento gestacional y/o la infección parasitaria y no porque desde un inicio los individuos de estudio presentaran discrepancias inherentes al nacimiento.

Debido a que la etapa gestacional es una etapa crítica del desarrollo, no podría generalizarse de que al consumir marihuana se pueden obtener efectos dañinos o benéficos, ya que todo depende de la dosis utilizada, tiempo y duración de la exposición, además de que hay que tomar en cuenta de la potencia de la marihuana, ya que ésta se ha incrementado en las últimas décadas, al ser de 6 a 7 veces más potente en comparación a 1970 (Sevigny, 2013), y en cuanto al contenido de THC se reporta que desde 1993 a 2008, se ha incrementado de un 3.4% hasta un 8.8% de THC (Mehmedic, *et al.*, 2010). Además, a pesar de que por mucho tiempo se ha descrito que el consumo de marihuana no representa un riesgo alto para la salud, se han reportado cada vez más problemas de trastorno conductual y neurobiológicos como ansiedad, depresión, psicosis, déficits cognitivos y sociales, así como adicciones (SEIC, 2002).

Para ver si la administración durante la gestación del cannabinoide induce efectos sobre el funcionamiento del SI ya en la etapa adulta, se decidió infectar a los animales ya

adultos y recuperaron las larvas que no fueron expulsadas. De manera interesante, el grupo tratado con WIN 55,212-2 fue menos eficaz al momento de expulsar a los parásitos. Las diferencias entre los grupos tratados con WIN 55,212-2 y el control, así como de entre el WIN 55,212-2 y el vehículo fueron de 405 y 515, respectivamente. Este número podría parecer poco representativo, teniendo en cuenta que se infectaron con 2000 LM, sin embargo, se sabe que una hembra de *Trichinella spiralis* puede producir de 200 a 400 LRN al día, y que durante las seis semanas que corresponden a su periodo de vida, puede producir hasta 10,000 LRN, mismas que se diseminarán por todo el organismo, y provocarán síntomas en el hospedero. Por trabajos realizados en el laboratorio, se sabe que 300 larvas pueden ser sumamente importantes en la patología de la enfermedad. Si a un ratón se infecta con 300 LM y se deja continuar el ciclo, sabemos que en la etapa muscular podrían obtenerse de 10,000 a 20,000 LM. En humanos, 1 LM/g de peso induce triquinelosis clínica, es decir, el individuo ya refiere síntomas y su calidad de vida ya se ve comprometido, mientras que 5 LM/g pueden inducir la muerte.

Se decidió observar la morfología general del duodeno en función del reto inmunológico. No se esperaba encontrar diferencias entre los grupos que no fueron infectados, sin embargo, para nuestra sorpresa vimos que el grupo WIN 55,212-2, presentaba una alteración morfológica a nivel de las células caliciformes, y mediante tinciones con H&E y Azul Alcían, se vio que estas células, tanto a nivel de glándulas como de vellosidades, presentaban una deficiencia de mucina, con lo cual aparecían como vacías, fenómeno similar a todos los grupos que fueron infectados. Ya se ha reportado previamente que un compuesto administrado gestacionalmente puede inducir efectos morfológicos en animales después de nacidos, como lo reportado por Mendoza y cols., en ratones expuestos durante la gestación y lactancia a bisfenol A, un disruptor endócrino que induce cambios en diversos parámetros reproductivos, incluyendo un aumento en el grosor de los epitelios uterinos y el estroma, modificando el ciclo reproductivo de las hembras (Mendoza, *et al.*, 2011). El análisis histológico también determinó que los eosinófilos no se reclutan tan eficazmente a nivel de las glándulas en el grupo WIN 55,212-2 infectado.

Los resultados que se obtuvieron por medio de la citometría de flujo son muchos y sería complicado el tratar de explicar cada subpoblación por separado, sin embargo, si lo vemos como un todo, las diferencias más notables se dieron al analizar las subpoblaciones de CD45⁺, células NK⁺ y T γ δ ⁺. Por el tratamiento gestacional con WIN 55,212-2, en el duodeno se incrementan los porcentajes de CD3⁺, T γ δ ⁺ y de NK⁺; en los GLM se incrementan los CD4⁺ y los CD45⁺; mientras que en el bazo se incrementan las NK⁺ y las T γ δ ⁺, además de que se disminuyen los CD8⁺. Como se pretendía hacer, el funcionamiento del sistema inmunológico se puso a prueba con la infección intestinal causada por el parásito *Trichinella spiralis*, y los resultados obtenidos fueron interesantes, ya que el porcentaje de células NK⁺ y T γ δ ⁺, que se encontraban aumentadas en el duodeno, ante la infección, disminuyen, en los GLM las células CD4⁺ y CD45⁺ que se encontraban aumentadas, ante la infección, se disminuyen; mientras que en el bazo, que es un órgano linfóide de memoria, los porcentajes de CD8⁺ siguen disminuidos, aunque ante la infección los porcentajes de células T γ δ ⁺ disminuye. En los resultados obtenidos por del Arco, et al, en donde administraron durante la gestación de ratas el cannabinoide HU-210, se vieron disminuidas las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ en el bazo, así como los linfocitos B en sangre periférica, y también se sugiere que puede deberse a efectos epigenéticos (del Arco, et al., 2000), específicamente alteraciones en los perfiles de microRNA, ya que se ha visto que la activación del sistema eCB mediante la activación de los receptores a cannabinoides regulan funciones celulares en diferentes tejidos a través de alteraciones epigenéticas en los miRNAs, específicamente en células reguladoras implicadas en la producción de interleucinas y en respuestas inflamatorias (Chandra, et al., 2015; Szutorisz, 2018), como por ejemplo, en el caso de la AEA, que puede suprimir la respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por células de tipo Th-17, al inducir IL-10, que a su vez desencadena miRNA que se dirigen a las vías proinflamatorias (Jackson, et al., 2014). En cuanto a otros posibles mecanismos epigenéticos que se pueden estar alterando, uno de ellos podría ser la metilación del DNA, ya que se ha visto que la metilación del DNA en el cerebro es reversible, además de que su distribución cambia a lo largo de la maduración neuronal y el envejecimiento, así como en trastornos del neurodesarrollo, como por ejemplo, en las adicciones, como la cocaína (Feng, et al., 2016; Szutorisz, 2018).

En cuanto a los receptores a cannabinoides, los más sensibles fueron los que se encontraban en las células $T\gamma\delta^+$ y NK^+ en duodeno; NK^+ , $T\gamma\delta^+$ y $CD45^+$ en los GLM; y NK^+ , $CD4^+$ y $CD8^+$ en el bazo. La diferencia en la expresión de los receptores a cannabinoides puede ser explicada en parte a que depende de los efectos que se hayan presentado en la etapa prenatal o posnatal temprana, así como también se presentan diferencias asociadas al dimorfismo sexual y el estímulo recibidos. Es de esta manera que se conoce que el estrés prenatal, así como el origen del individuo, en este caso las ratas provenientes de diferentes orígenes, ya sea compradas, donadas o mantenidas en el laboratorio donde se llevaron a cabo los experimentos, a pesar de ser de la misma cepa, tener la misma edad y mantenerlas en condiciones de alimento, agua, luz, temperatura y humedad iguales, no expresan el mismo patrón en cuanto a los receptores a cannabinoides en diferentes áreas del SNC, además de que también hay diferencias entre sexos, aun cuando dentro de un mismo origen, hembras y machos, se desarrollaron bajo las mismas características (Dow-Edwards, *et al.*, 2016). Lo anterior nos indica que efectivamente, la gestación es una etapa crítica del desarrollo, y que cualquier estímulo proveniente del exterior puede tener repercusiones a largo plazo, específicamente sobre la expresión de receptores, por lo que los resultados aquí obtenidos no pueden ser comparados o esperar a que se comporten exactamente igual a otros provenientes de situaciones similares. Varios modelos han demostrado que los receptores a cannabinoides, sobre todo CB1, al ser el más estudiado en el SNC por ser el que se expresa en mayor grado que el CB2, se ve afectado y la dimensión y/o dirección del cambio depende de la edad a la que se experimenta el estrés o estímulo, el número de días del estímulo, el grado de estimulación y el sexo del animal (Dow-Edwards, *et al.*, 2016).

Se midió el RNA mensajero de dos citocinas de tipo Th2 que son importantes en la defensa contra *T. spiralis*, IL-4 e IL-13, así como una de tipo Th1, la IL-1 β , observándose un incremento en la expresión del RNA mensajero que codifica para las 3 citocinas sólo en el grupo control infectado a nivel de duodeno, no así de bazo, y en relación con esto hay dos aspectos importantes que señalar, el primero es que son sólo cinco días de infección y es por ello por lo que la expresión de RNA mensajero para las diferentes citocinas apenas nos permita ver los indicios de diferencias significativas, sobre todo a nivel de duodeno, que es

el lugar en donde la infección está presente, y no tanto en el bazo, que es donde se apreciaría una respuesta de memoria. El segundo punto importante, no es comparar las diferencias del grupo vehículo con respecto al grupo control, sino al grupo WIN 55,212-2 con respecto a los otros dos, ya que, en teoría se debería esperar que el grupo vehículo se comportara similar al grupo control, sin embargo, en este trabajo se ha visto que el vehículo llega a ejercer efectos en muchos resultados aquí presentados, es por ello que se pueden comparar los efectos con respecto al WIN 55,212-2, ya que a pesar de también se administró a nivel gestacional, no está produciendo los mismos efectos que el vehículo, sino que, al menos en el duodeno, la expresión de las citocinas IL-4, IL-13 e IL-1 β , en condiciones de infección, no induce un incremento en esta, sino que se comporta como los animales control. Una vez más, se menciona que son cinco días de infección, y sería interesante medir estas citocinas a periodos más prolongados de la infección para poder observar si la administración gestacional de WIN 55,212-2 podría afectar una respuesta inmunológica tardía, al menos en cuanto a la expresión de citocinas.

Hablando del vehículo, en este caso el DMSO:PBS pH 7.2, en una relación 1:2, se pudo ver que produjo efectos marcados en varios parámetros aquí estudiados. Una de las primeras cosas que podría pensarse es que el DMSO es un agente tóxico, pero se conoce que es un fármaco antiinflamatorio, antibacteriano y analgésico, que además se ha propuesto como agente para atenuar las cicatrices hipertróficas (Sari, *et al.*, 2017), con lo cual se puede dejar la hipótesis de la toxicidad del DMSO como descartada al tratar de explicar los efectos observados en los grupos vehículos. Lo que se espera cuando se administra un vehículo es que los animales correspondientes a ese grupo se comporten como el grupo control, aquellos animales que no reciben ningún tratamiento o estímulo, para poder decir que el compuesto estudiado es el que presenta los efectos esperados, eso, al menos en la teoría, pero en la práctica no siempre es así. Tal vez se pueda pensar que, si los tratamientos se administran durante la gestación, y si se evalúan parámetros en la vida adulta, lo que haya acompañado al compuesto a estudiar no ejerza efectos, o simplemente hay estudios en donde el grupo control es omitido y las comparaciones se hacen con respecto al grupo que ha recibido el vehículo. Por ejemplo, en un trabajo en donde administraron WIN 55,212-2 prenatalmente, el cual fue diluido en 0.3% de Tween

80/solución salina y por lo tanto el vehículo fue la solución de Tween 80/solución salina, se encontró que en las crías adultas la función de los receptores CB1, los niveles de AEA y la actividad de las enzimas metabolizadoras de AEA, la NAPE-PLD y la FAAH, difieren entre los grupos tratados prenatalmente con WIN 55,212-2 y el grupo vehículo, en regiones del SNC como el hipocampo, núcleo estriado y áreas límbicas, ya a una edad adulta (Castelli, *et al.*, 2007), es decir, en este trabajo se compararon los resultados obtenidos para el grupo WIN 55,212-2 con los obtenidos con el tratado con el vehículo, sin haber tomado en cuenta un grupo que no hubiera recibido ningún tratamiento gestacional. Otro ejemplo se encuentra en el trabajo realizado por del Arco y cols., en donde utilizaron el cannabinoide sintético HU-210 y tomaron como valores basales los obtenidos con los animales administrados con el vehículo, aceite de sésamo, y reportaron haber encontradas disminuidas las subpoblaciones CD4⁺ en bazo y los linfocitos B en sangre periférica, además de reportar que las concentraciones de la hormona luteinizante y la corticosterona se encuentran afectadas solo en los “niveles basales”, entendiéndose los tratados con aceite (del Arco *et al.*, 2000). Lo anterior sirve para demostrar que un estímulo a una edad de desarrollo crítica puede generar efectos a largo plazo, y que siempre será necesario hacer la comparación contra un grupo que no haya recibido estímulo alguno.

Lo último que se midió fueron los anticuerpos totales y se encontró una respuesta similar a los resultados obtenidos por Lombard y cols., en donde administraron 50 mg/Kg de peso de THC en ratonas gestantes, y a los productos ya en edad adulta los administraron con la proteína VIH-1 p17/p24/gp120, y midieron los anticuerpos específicos hacia esta proteína, obteniéndose que en los ratones expuestos gestacionalmente al THC presentaban menores títulos de anticuerpos específicos (Lombard, *et al.*, 2011), sugiriendo que estos animales pueden tener aumentado el riesgo de contraer infecciones como el VIH . En este trabajo, interesantemente, también se encontraron menores títulos, aunque hacia anticuerpos totales, medidos en este caso a los cinco días, sugiriendo, tal vez, que ante una enfermedad puede no responder eficientemente para producir anticuerpos para tratar de eliminar al o los microorganismos patógenos. En este trabajo se indujo una respuesta aguda intestinal en los animales

infectados con *Trichinella spiralis*, y aunque se midieron los anticuerpos específicos contra el parásito no fueron detectados a los cinco días de infección, que como ya se ha mencionado, es en el tiempo en el cual se puede actuar farmacológicamente con el fin de eliminar a los parásitos.

Los resultados aquí obtenidos demuestran que va de la mano con la “Hipótesis del doble golpe”, la cual explica que la exposición prenatal a cannabis, similar a un teratógeno del neurodesarrollo, produce un primer golpe a la señalización del SEC, que se ve comprometido de tal manera que un segundo golpe, es decir, un estresor postnatal, precipitarán la aparición de un fenotipo específico (Richardson, *et al.*, 2016). En este trabajo, el primer golpe es la exposición gestacional al compuesto cannabinoide sintético WIN 55,212-2 o el vehículo, mientras que el segundo golpe es la infección a *Trichinella spiralis*, en el caso de los animales sometidos a infección. Las perturbaciones del medio intrauterino a través del compuesto exógeno WIN 55,212-2 predispuso a la descendencia a que el sistema inmunológico respondiera de una manera poco eficaz al tratar de eliminar a los parásitos.

VII.RESUMEN DE RESULTADOS

- Al utilizar una dosis de 5 mg/Kg de peso durante los DG5 al DG16 en ratas gestantes, no se alteran parámetros reproductivos como disminución en la gestación, número de crías, peso de las crías, ganancia de peso y mortalidad postgestacional.

La administración prenatal con el cannabinoide WIN 55,212-2 induce en las crías macho adultas:

- Un llenado parcialmente vacío de células caliciformes a nivel de glándulas y vellosidades en el duodeno.
- Los porcentajes de las subpoblaciones celulares CD3⁺, T γ δ ⁺ y NK⁺ se aumentan en duodeno; CD4⁺ y CD45⁺ en GLM; mientras que en el bazo se incrementan los porcentajes de NK⁺ y T γ δ ⁺, además de que se disminuyen los CD8⁺.
- Células CD4⁺ positivas para CB1 no fueron detectadas en el duodeno.
- Las células NK⁺ positivas para CB1, así como las células NK⁺, T γ δ ⁺ y NK⁺ disminuyen en los GLM; mientras que, en el bazo, las células NK⁺ positivas tanto para CB1 y CB2, así como su nivel de expresión se encuentran disminuidas.
- No hay diferencia en el RNA mensajero para las citocinas IL-4, IL-13 e IL-1 β , ni a nivel de duodeno ni de bazo.
- Hay un menor título de anticuerpos totales.

La administración prenatal de WIN 55,212-2 en las crías macho adultas e infectados con *Trichinella spiralis* induce:

- Una menor eficiencia para eliminar parásitos.
- Un menor reclutamiento de eosinófilos a nivel glandular en el duodeno.
- Los porcentajes de las subpoblaciones celulares NK^+ y $T\gamma\delta^+$ disminuyen en duodeno, $CD4^+$ y $CD45^+$ disminuyen en los GLM, y las $CD8^+$ siguen disminuidas en bazo, además de los porcentajes para las células $T\gamma\delta^+$.
- El porcentaje de células $T\gamma\delta^+$ y $CD45^+$ positivas para CB1 aumenta, mientras que el porcentaje para las $CD8^+$ positivas para CB2 aumenta en duodeno; las células $T\gamma\delta^+$ positivas para CB2 aumenta en GLM, aunque su nivel de expresión sea bajo; mientras que, en el bazo, las células $CD3^+$ y $CD4^+$ positivas para CB2 aumentan y en las $CD8^+$ disminuye el porcentaje, aunque en este último caso su nivel de expresión sea poco.
- No hay diferencia en el RNA mensajero para las citocinas IL-4, IL-13 e IL-1 β , ni a nivel de duodeno ni de bazo.
- No hay diferencia en el título de anticuerpos totales.

VIII. CONCLUSIÓN

La administración del cannabinoide WIN 55,212-2 durante la gestación induce cambios perdurables hasta la etapa adulta sobre el funcionamiento del sistema inmune en ratas macho Wistar infectadas con *Trichinella spiralis*.

IX. PERSPECTIVAS

- Utilizar dosis más bajas o altas del cannabinoide WIN 55,212-2, así como el compuesto THC, y vía de administración más cercana a la realidad
- Llevar a cabo estudios conductuales de las crías a diferentes tiempos de desarrollo.
- Valerse de otro modelo experimental para retar el sistema inmunológico, o en su defecto, tener más tiempo de infección para ver cómo se comportan los animales en una infección crónica.
- Realizar un análisis histológico más minucioso, como las células cebadas, células motoras, así como la expresión de los receptores a cannabinoides en el intestino delgado
- Comparar los resultados entre machos y hembras para saber si existen efectos dimórficos

X. BIBLIOGRAFÍA

Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tattoli, M., Cassano, T., Tanganelli, S., Finetti, S., Mazzoni, E., Trabace, L., Steardo, L., Cuomo, V. & Ferraro, L. (2005). Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. *Cerebral Cortex*, 15(12), 2013–2020.

Baldwin, G. C., Tashkin, D. P., Buckley, D. M., Park, A. N., Dubinett, S. M. & Roth, M. D. (1997). Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokane production. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(5), 1606–1613.

Bambang, K. N., Karasu, T., Gebeh, A., Taylor, A. H., Marczylo, T.H., Lam, P., Willets, J. M. & Konje, J.C. (2010). From fertilisation to implantation in mammalian pregnancy- modulation of early human reproduction by the endocannabinoid system. *Pharmaceuticals*, 3(9), 2910-2929.

Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A, Di Marzo, V. & Fernández-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*, 33(3), 181–191.

Bertrand, K. A., Hanan, N. J., Honerkamp-Smith, G., Best, B. M. & Chambers, C. D. (2018). Marijuana use by breastfeeding mothers and cannabinoid concentrations in breast milk. *Pediatrics*, 142(3), 1-11.

Biegon, A. & Kerman, I. A. (2001). Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *NeuroImage*, 14(6), 1463–1468.

Busquets Garcia, A., Soria-Gomez, E., Bellocchio, L. & Marsicano, G. (2016). Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *F1000Research*, 5(990) 1-9.

Castaldo, P., Magi, S., Gaetani, S., Cassano, T., Ferraro, L., Antonelli, T., Amoroso, S. &

Cuomo, V. (2007). Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 increases glutamate uptake through overexpression of GLT1 and EAAC1 glutamate transporter subtypes in rat frontal cerebral cortex. *Neuropharmacology*, 53(3), 369–378.

Castelli, M. P., Paola Piras, A., D'Agostino, A., Pibiri, F., Perra, S., Gessa, G. L., Maccarrone, M. & Pistis, M. (2007). Dysregulation of the endogenous cannabinoid system in adult rats prenatally treated with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2. *European Journal of Pharmacology*, 573(1–3), 11–19.

Cencioni, M. T., Chiurchiù, V., Catanzaro, G., Borsellino, G., Bernardi, G., Battistini, L. & Maccarrone, M. (2010). Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *PLoS ONE*, 5(1), 2–11.

Center for behavioral health statistics and quality. (2017). 2016 National survey on drug use and health: detailed tables. *Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Rockville, MD*. Retrieved from <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUH-DetTabs-2016/NSDUH-DetTabs-2016.pdf>

Cervantes Villagrana, R. D., González Espinosa, C. & Cruz Martín del Campo, A. L. (2011). Endocannabinoides e inflamación. *El Residente*, VI(2), 127–135.

Chandra, L.C., Kumar, V., Torben, W., Vande Stouwe, C., Winsauer, P., Amedee, A., Molina, P.E. & Mohan, M. (2015). Chronic administration of Δ 9-tetrahydrocannabinol induces intestinal anti-inflammatory microRNA expression during acute simian immunodeficiency virus infection of rhesus macaques. *Journal of virology*, 89(2); 1168-1181.

Compton, D. R., Gold, L. H., Ward, S. J., Balster, R. L. & Martin, B. R. (1992). Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 263(3), 1118–1126.

Costa, M. A. (2016). *The endocannabinoid system: A novel player in human placentation*. *Reproductive Toxicology*, 61, 58-67.

Dahl, R. E., Scher, M. S., Williamson, D. E., Robles, N. & Day, N. (1995). A longitudinal study of prenatal marijuana use. Effects on sleep and arousal at age 3 years. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 149(2), 145–150.

Dalterio, S. L. (1980). Perinatal or adult exposure to cannabinoids alters male reproductive functions in mice. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 12(1), 143–153.

Day, N. L., Goldschmidt, L. & Thomas, C. A. (2006). Prenatal marijuana exposure contributes to the prediction of marijuana use at age 14. *Addiction*, 101(9), 1313-1322.

del Arco, I., Muñoz, R., Rodríguez De Fonseca, F., Escudero, L., Martín-Calderón, J. L., Navarro, M. & Villanúa, M. A. (2000). Maternal exposure to the synthetic cannabinoid HU-210: effects on the endocrine and immune systems of the adult male offspring. *Neuroimmunomodulation*, 7(1), 16–26.

Derocq, J. M., Ségui, M., Marchand, J., Le Fur, G. & Casellas, P. (1995). Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *FEBS Letters*, 369(2–3), 177–182.

Devane, W. A., Dysarz, F. A. 3rd., Johnson, M. R., Melvin, L.S. & Howlett, A.C. (1988). Determination rat brain and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 605–613.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946–1949.

Di Marzo, V. & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for experimental neurotherapeutics*, 12(4), 692-698.

Ding, J., Bai, X., Wang, X., Shi, H., Cai, X., Luo, X., Liu, M. & Liu, X. (2017). Immune cell responses and cytokine profile in intestines of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Frontiers in Microbiology*, 8(2069), 1–9.

Dixon, H., Blanchard, C., Deschoolmeester, M. L., Yuill, N. C., Christie, J. W., Rothenberg,

M. E. & Else, K. J. (2006). The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection. *European journal of immunology*, 36(7), 1753–1763.

Dow-Edwards D, Frank, A., Wade, D., Weedon, J. & Izenwasser, S. (2016). Sexually-dimorphic alterations in cannabinoid receptor density depend upon prenatal/early postnatal history. *Neurotoxicology and teratology*, 58; 31-39.

ElSohly, M. A., Mehmedic, Z., Foster, S., Gon, C., Chandra, S. & Church, J. C. (2016). Changes in cannabis potency over the last 2 decades (1995-2014): Analysis of current data in the United States. *Biological Psychiatry*, 79(7), 613–619.

Everett, R. M., Descotes, G., Rollin, M., Greener, Y., Bradford, J. C., Benziger, D. P. & Ward, S. J. (1993). Nephrotoxicity of pravadoline maleate (WIN 48098-6) in dogs: Evidence of maleic acid-induced acute tubular necrosis. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the society of toxicology*, 21(1), 59–65.

Feng₂ J., Shao₂ N., Szulwach₂ K.₂E., Vialou₂ V., Huynh₂ J., Zhong₂ C., Le₂ T, Ferguson₂ D., Cahill₂ M.₂E., Li₂ Y., Koo₂ J.₂W., Ribeiro₂ E., Labonte₂ B., Laitman₂ B.₂M., Estey₂ D., Stockman₂ V., Kennedy₂ P., Couroussé₂ T., Mensah₂ I., Turecki₂ G., Faull₂ K.₂F., Ming₂ G.₂L., Song₂ H., Fan₂ G., Casaccia₂ P., Shen₂ L., Jin₂ P. & Nestler₂ E.₂J. (2015). Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nature neuroscience*, 18(4); 536-544.

Fried, P. A. (1980). Marihuana use by pregnant women: Neurobehavioral effects in neonates. *Drug and alcohol dependence*, 6(6), 415–424.

Fried, P. A. & Makin, J. E. (1987). Neonatal behavioural correlates of prenatal exposure to marihuana, cigarettes and alcohol in a low risk population. *Neurotoxicology and teratology*, 9(1), 1–7.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European*

journal of biochemistry, 232(1), 54–61.

Glass, M., Dragunow, M. & Faull, R. L. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study on the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77(2), 299–318.

Gottstein, B., Pozio, E. & Nöckler, K. (2009). Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 127–145.

Habayeb, O. M., Taylor, A. H., Evans, M. D., Cooke, M. S., Taylor, D. J., Bell, S. C. & Konje, J. C. (2004). Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women - A potential role in pregnancy maintenance and labor? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(11), 5482–5487.

Harbison, R.D. & Mantilla-Plata, B. (1972). Prenatal toxicity, maternal distribution and placental transfer of tetrahydrocannabinol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 180(2), 446–453.

Hernández-Cervantes, R. & Córdoba-Aguilar, Á. (2017). Nuestra Tierra Divulgación de la Ciencia 1. *Nuestra Tierra. Órgano de divulgación de la estación regional del noroeste, UNAM*, 28, 3–5.

Hofman, A., Jaddoe, V. W., Mackenbach, J. P., Moll, H. A., Snijders, R. F., Steegers, E. A., Verhulst, F. C., Witteman, J. C. & Büller, H. A. (2004). Growth, development and health from early fetal life until young adulthood: The Generation R Study. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 18(1), 61–72.

Howlett, A. C. & Abood, M. E. (2017). *CB1 and CB2 receptor pharmacology. Advances in pharmacology*, 1(80), 169-206.

Ishikawa, N., Wakelin, D. & Mahida, Y. R. (1997). Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*, 113(2), 542–549.

Jackson, A.R., Nagarkatti, P. & Nagarkatti, M. (2014). Anandamide attenuates Th-17 cell-mediated delayed-type hypersensitivity response by triggering IL-10 production and consequent microRNA induction. *PLoS One*, 9(4); 1-9.

Jakubovic, A., T., H., & McGeer, P. L. (1973). Radioactivity in suckled rats after giving 14C-tetrahydrocannabinol to the mother. *European journal of pharmacology*, 22(2), 221–223.

Jutras-Aswad, D., DiNieri, J. A., Harkany, T. & Hurd, Y. L. (2009). Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 259(7), 395–412.

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

Khan, W. I., Richard, M., Akiho, H., Blennerhasset, P. A., Humphreys, N. E., Grecis, R. K., Van Snick, J. & Collins, S. M. (2003). Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infection and immunity*, 71(5), 2430–2438.

Klein, T. W., Newton, C. A., Nakachi, N. & Friedman, H. (2000). Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *Journal of immunology*, 164(12), 6461–6466.

Klein, T. W., Newton, C., Larsen, K., Lu, L., Perkins, I., Nong, L. & Friedman, H. (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *Journal of leukocyte biology*, 74(4), 486-496.

Klein, T. W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics, 5(5), 400–411.

Laprairie, R. B., Kelly, M. E. & Denovan-Wright, E. M. (2012) The dynamic nature of type 1 cannabinoid receptor (CB1) gene transcription. *British journal of pharmacology*, 167(8):1583-95.

Lombard, C., Hegde, V. L., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P. S. (2011). Perinatal exposure to

Δ^9 -tetrahydrocannabinol triggers profound defects in T cell differentiation and function in fetal and postnatal stages of life, including decreased responsiveness to HIV antigens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 339(2), 607–617.

Lowin, T., Pongratz, G. & Straub, R. H. (2016). The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 mesylate decreases the production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by activating CB2, TRPV1, TRPA1 and yet unidentified receptor targets. *Journal of Inflammation*, 13(15), 1–10.

Maccarrone, M., Valensise, H., Bari, M., Lazzarin, N., Romanini, C. & Finazzi-Agrò, A. (2001). Progesterone up-regulates anandamide hydrolase in human lymphocytes: role of cytokines and implications for fertility. *Journal of Immunology*, 166(12), 7183–7189.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almong, S., Martin, B. R., Compton, D. R. & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology*, 50(1), 83–90.

Mechoulam, R. & Gaoni, Y. (1965). A total synthesis of dl- Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, 87(14), 3273–3275.

Mendoza-Rodríguez, C.A., García-Guzmán, M., Baranda-Ávila, N., Morimoto, S., Perrot-Appianat, M. & Cerbón, M. (2011). Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reproductive toxicology*, 31(2), 177-183.

Mereu, G., Fà, M., Ferraro, L., Cagianò, R., Antonelli, T., Tattoli, M., Ghiglieri, V., Tanganelli, S., Gessa, G. L. & Cuomo, V. (2003). Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 100(8), 4915–4920.

Morris, C. V., DiNieri, J. A., Szutorisz, H. & Hurd, Y. L. (2012). Molecular mechanisms of

maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment. *The European journal of neuroscience*, 34(10), 1574–1583.

Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61–65.

Murphy, L. L., Gher, J. & Szary, A. (1995). Effects of prenatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on reproductive, endocrine and immune parameters of male and female rat offspring. *Endocrine*, 3(12), 875–879.

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gu, S. & Liu, Q.R. (2012). CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *Journal of psychopharmacology*, 26(1), 92-103.

Ortega-Pierres, M. G., Arriaga, C. & Yépez-Mulia, L. (2000). Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology*, 93(3–4), 201–225.

Pascual Simón, J. R. & Fernández Rodríguez, B. L. (2017). Breve reseña sobre la farmacología de los cannabinoides. *Medisan*, 21(3), 334–345.

Pozio, E., Sacchini, D., Sacchi, L., Tamburrini, A. & Alberici, F. (2001). Failure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(4), 638-642.

Richardson, K. A., Hester, A. K. & McLemore, G. L. (2016). Prenatal cannabis exposure - The "first hit" to the endocannabinoid system. *Neurotoxicology and teratology*, 58; 5-14.

Rodríguez, U., Carrillo, E. & Soto, E. (2005). Cannabinoides: Neurobiología y usos médicos. *Elementos*, 60, 3–9.

Rostami, A., Gamble, H. R., Dupouy-Camet, J., Khazan, H. & Bruschi, F. (2017). Meat sources of infection for outbreaks of human trichinellosis. *Food Microbiology*, 64, 65–71.

Sánchez, C., Velasco, G. & Guzmán, M. (1997). Metabolic stimulation of mouse spleen lymphocytes by low doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Life Sciences*, 60(19), 1709–1717.

Sari, E., Bakar, B., Dincel, G.C. & Budak Yildiran, F.A. (2017) Effects of DMSO on rabbit ear hypertrophic scar model: A controlled randomized experimental study. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 70(4); 509-517.

Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC). (2002). *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Universidad Complutense de Madrid, España.

Sevigny, E. L. (2013). Is today's marijuana more potent simply because it's fresher? *Drug testing and analysis*, 5(1), 62–67.

Shabani, M., Divsalar, K. & Janahmadi, M. (2012). Destructive effects of prenatal WIN 55,212-2 exposure on central nervous system of neonatal rats. *Addiction & health*, 4(1–2), 9–19.

Sonon, K. E., Richardson, G. A., Cornelius, J. R., Kim, K. H. & Day, N. L. (2015). Prenatal marijuana exposure predicts marijuana use in young adulthood. *Neurotoxicology and teratology*, 47, 10–15.

Svíženská, I., Dubový, P. & Sulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures-- a short review. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 90(4), 501-511.

Szutorisz, H. & Hurd Y. L. (2018). High times for cannabis: Epigenetic imprint and its legacy on brain and behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 85; 93-101.

United Nations Office on Drug and Crime (UNODC). (2015). *World Drug Report 2015*. United Nations publication.

United Nations Office on Drug and Crime (UNODC). (2016). *World Drug Report 2016*. United Nations publication.

United Nations Office on Drug and Crime (UNODC). (2019). *World Drug Report 2019*. United Nations publication.

Vallance, B. A., Matthaei, K. I., Sanovic, S., Young, I. G. & Collins, S. M. (2000). Interleukin-5 deficient mice exhibit impaired host defence against challenge *Trichinella spiralis*

infections. *Parasite Immunology*, 22(10), 487–492.

Vaswani, K., Chan, H. W., Peiris, H. N., Nitert, M. D., Bradley, R. J., Armitage, J. A., Rice, G. E., Mitchell, M. D. (2015). Gestation related gene expression of the endocannabinoid pathway in rat placenta. *Mediators of inflammation*, 2015.

Wang, H., Guo, Y., Wang, D., Kingsley, P. J., Marnett, L. J., Das, S. K., DuBois, R. N. & Dey, S. K. (2004). Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nature Medicine*, 10(10), 1074–1080.

Wang, H., Xie, H. & Dey, S. K. (2008). Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. *PLoS ONE*, 3(10), 1–8.

Wenger, T., Fragkakis, G., Giamrikou, P., Probonas, K. & Yiannikakis, N. (1997). Effects of anandamide on gestation in pregnant rats. *Life Sciences*, 60(26), 2361–2371.

Zhu, W., Friedman, H. & Klein, T. W. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 286(2), 1103–1109.

Zurolo, E., Iyer, A. M., Spliet, W. G., Van Rijen, P. C., Troost, D., Gorter, J. A. & Aronica, E. (2010). CB1 and CB2 cannabinoid receptor expression during development and in epileptogenic development pathologies. *Neuroscience*, 170(1): 28–41.

XI. ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

* SOLUCIÓN DE DIGESTIÓN

<i>Pepsina</i>	<i>10 g</i>
<i>Ácido clorhídrico</i>	<i>10 ml</i>

Preparar en una campana de extracción. Disolver la pepsina en un litro de agua destilada o Milli Q, agitar y agregar poco a poco el ácido clorhídrico, la reacción es exotérmica por lo que hay que tener cuidado. Mantener en agitación hasta su completa disolución.

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

* PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

<i>NaCl</i>	<i>8 g</i>
<i>KCl</i>	<i>0.2 g</i>
<i>Na₂HPO₄</i>	<i>1.44 g</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>0.27 g</i>

Disolver los reactivos, uno por uno en 800 ml de agua destilada o Milli Q, manteniendo en agitación, y hasta que esté todo 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 (400 ml)*

<i>DEPC 0.1 %</i>	<i>500 µl</i>
<i>H₂O Milli Q</i>	<i>400 ml</i>

A 400 ml de agua Milli Q se le agregan 500 µl de dietilpirocarbonato (DEPC), 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, que inhibe completamente a estas fosfatasas.

Reactivos para histología

** PARAFORMALDEHÍDO AL 4 % (FIJADOR)*

<i>Paraformaldehído</i>	<i>40 g</i>
<i>H₂O Milli Q</i>	<i>c.b.p. 1 litro</i>

Poner en agitación hasta su completa disolución en agua Milli Q, y llevar a un litro. Si tarda mucho en disolverse se pueden agregar unas lentejas de hidróxido de sodio para facilitar la disolución. Para Histología, debe de usarse fresco.

** TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)*

** HEMATOXILINA DE HARRIS*

<i>Hematoxilina</i>	<i>5 g</i>
<i>Etanol absoluto</i>	<i>50 ml</i>

<i>Alumbre de potasio o de amonio</i>	<i>100 g</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Óxido de mercurio</i>	<i>2.5 g</i>
<i>Ácido acético glacial</i>	<i>20 ml</i>

Se utiliza un recipiente de 2000 ml para el alumbre y el agua destilada, y uno más pequeño para el etanol y la hematoxilina. Agitar vigorosamente para disolver la hematoxilina en el alcohol, a temperatura ambiente. Se disuelve completamente el alumbre en el agua destilada, en un agitador magnético con calor. Quitar del calor el alumbre y el agua destilada. Hacer que llegue al hervor rápidamente, en menos de un minuto, remover del calor y añadir lentamente el óxido de mercurio. Tener precaución de añadirlo lentamente, de lo contrario la solución cambiará a un tono púrpura oscuro. Retirar de la fuente de calor y colocar en un recipiente que contenga agua fría para bajar la temperatura, una vez se haya enfriado la solución, añadir 20 ml de ácido acético glacial para intensificar la tinción nuclear. Filtrar la solución antes de usarla.

** ALCOHOL ÁCIDO*

Para 100 ml, se prepara primero etanol al 70% a partir de etanol absoluto.

<i>Etanol 70%</i>	<i>99 ml</i>
<i>Ácido clorhídrico</i>	<i>1 ml</i>

** AGUA AMONIACAL*

<i>Amoniaco</i>	<i>25 ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>75 ml</i>

** SOLUCIÓN MADRE SATURADA DE CARBONATO DE LITIO*

<i>Carbonato de litio</i>	<i>1.5 g</i>
---------------------------	--------------

Agua destilada *100 ml*

La solución requerida para la tinción se prepara a partir de la solución madre, de la cual se toman 30 gotas y se diluyen en 1000 ml de agua destilada.

** TINCIÓN DE AZUL ALCIÁN, pH 2.5*

<i>Azul Alcían</i>	<i>1 g</i>
<i>Ácido acético glacial</i>	<i>3 ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>97 ml</i>

Se agitan bien los reactivos con la ayuda de un agitador magnético, y se ajusta el pH a 2.5 con ácido acético. Antes de usar se debe de filtrar.

Reactivos para citometría de flujo

** BUFFER DE FACS (1 litro)*

<i>Azida de sodio</i>	<i>2 ml</i>
<i>Suero fetal bovino</i>	<i>20 ml</i>
<i>PBS 1X estéril</i>	<i>1000 ml</i>

Se prepara en la campana de extracción. Para un litro de PBS 1X estéril, se le agregan 2 ml de Azida de Sodio y 20 ml de suero fetal bovino. Se agita suavemente y puede ser almacenado a 4 °C hasta el momento de utilizarse.

** BUFFER DE LISIS DE ERITROCITOS (10X) (100 ML)*

<i>NH₄Cl</i>	<i>8.26 g</i>
<i>KHCO₃</i>	<i>1 g</i>
<i>EDTA</i>	<i>0.037 g</i>

Llevar a 100 ml con agua Milli Q, ajustar el pH A 7.1-7.4. Una vez mezclado, filtrar y guardar a 4°C hasta por 6 meses. Al momento de utilizarlo, se prepara una solución 1 X y usar a TA.

Reactivos para ELISA

** SOLUCIÓN DE CARBONATOS (0.1 M, PH 9.6) (1 LITRO)*

<i>Na₂CO₃</i>	<i>3.18 g</i>
<i>NaHCO₃</i>	<i>5.68 g</i>

Disolver los reactivos en agua bidestilada y aforar a 1 litro. Ajustar el pH a 9.6 y almacenar a 4°C hasta el momento de utilizarla.

** SOLUCIÓN DE LAVADO (PBS-TWEEN 20 AL 0.05%)*

<i>Tween 20</i>	<i>500 µl</i>
<i>PBS 10X, pH 7.2</i>	<i>100 ml</i>

Disolver en agua bidestilada y aforar a 1 litro. Almacenar a 4°C hasta el momento de utilizarla.

** SOLUCIÓN DE BLOQUEO (PARA UNA PLACA DE ELISA) (100 ML)*

Albúmina *1 g*

Disolver en 100 ml de una solución de PBS-Tween 20

** SOLUCIÓN DE CROMÓGENO (PARA UNA PLACA DE ELISA)*

Citrato de sodio 0.1 M *5 ml*

Ácido cítrico 0.1 M *5 ml*

Ortofenilendiamina (OPD) *5 µg*

H₂O₂ al 30% *5 µl*

Se disuelve la OPD en las soluciones de citratos, utilizando guantes en todo momento, y momentos antes de utilizar la solución se incorpora el H₂O₂.

ANEXO B. LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS	PÁGINA
1. Sistema endocannabinoide.....	7
2. Grupos de cannabinoides	8
3. Compuestos aminoalquilindoles	11
4. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2.....	14
5. Señalización clásica de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2.....	15
6. Porcentajes de personas mayores a 18 años que utilizaron drogas durante 2016	19
7. Porcentajes de mujeres embarazadas que utilizaron drogas durante 2016.....	20
8. Efectos posnatales del desarrollo asociados con la exposición prenatal al cannabis en humanos a diferentes etapas.	25
9. Larvas de <i>Trichinella spiralis</i>	31
10. Incidencia de la triquinelosis humana en México.	33
11. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	34
12. Respuesta inmunológica intestinal ante <i>Trichinella spiralis</i>	37
13. Esquema general de la metodología.....	41
14. Frotis vaginales con presencia de espermatozoides.	43
15. Esquema de los grupos experimentales.....	44
16. Número de larvas recuperadas del intestino delgado de los animales infectados con 2000 LM de <i>Trichinella spiralis</i>	58
17. Tinción de hematoxilina-eosina en muestras de duodeno de animales sin infección.....	60
18. Tinción de hematoxilina-eosina en muestras de duodeno de animales infectados con <i>Trichinella spiralis</i>	61
19. Tinción con Azul Alcían en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2, cortes longitudinales a nivel de glándulas	62
20. Tinción con Azul Alcían en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2 infectados con <i>T. spiralis</i> , cortes longitudinales a nivel de glándulas	63
21. Tinción con Azul Alcían en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2, cortes longitudinales a nivel de vellosidades	64
22. Tinción con Azul Alcían en muestras de duodeno de animales control, vehículo y WIN 55,212-2 infectados con <i>T. spiralis</i> , cortes longitudinales a nivel de vellosidades.....	65

23. Conteo de eosinófilos por milímetro cuadrado en las vellosidades del duodeno.....	66
24. Conteo de eosinófilos por milímetro cuadrado en la zona glandular del duodeno.....	67
25. Células CD3+ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2	68
26. Células CD4+ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	69
27. Células CD8+ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	70
28. Células NK+ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	71
29. Células T γ δ + en muestras de duodeno de animales sin y con infección de	

los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	72
30. Células CD45+ en muestras de duodeno de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	73
31. Células CD3+ en muestras de GLM de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	75
32. Células CD4+ en muestras de GLM de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	76
33. Células CD8+ en muestras de GLM de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	77
34. Células NK+ en muestras de GLM de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	78
35. Células T$\gamma$$\Delta$+ en muestras de GLM de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	79
36. Células CD45+ en muestras de GLM de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	80
37. Células CD3+ en muestras de bazo de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	82
38. Células CD4+ en muestras de bazo de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	83
39. Células CD8+ en muestras de bazo de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	84
40. Células NK+ en muestras de bazo de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	85
41. Células T$\gamma$$\Delta$+ en muestras de bazo de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	86
42. Células CD45+ en muestras de bazo de animales sin y con infección de	
los tres grupos experimentales, control, vehículo y WIN 55,212-2.....	87
43. Expresión del RNA mensajero para IL-4 en duodeno y bazo en animales	
sin y con infección	89
44. Expresión del RNA mensajero para IL-13 en duodeno y bazo en animales	
sin y con infección.	89
45. Expresión del RNA mensajero para IL-1β en duodeno y bazo en animales	
sin y con infección	90

46. Anticuerpos totales mediante la técnica de ELISA	91
--	----

TABLAS

1. Características farmacológicas de los principales agonistas cannabinoides.....	9
2. Tinciones y condiciones utilizadas para citometría de flujo.....	53
3. Estandarización de la temperatura y ciclos de los cebadores utilizados para RT-PCR.....	55
4. Parámetros reproductivos	57