



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA ESTROGENIZACIÓN NEONATAL SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCIÓN ENTÉRICA CON
*Trichinella spiralis.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ITZTLI GRACIELA TREJO SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F. 2012.



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL: Ignacio Camacho Arroyo
SECRETARIO: Jorge Morales Montor
1^{er} SUPLENTE: Enrique Ortega Soto
2^{do} SUPLENTE: José Cordero Hernández

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de interacciones neuroinmunoendócrinas, departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, bajo la colaboración del Dr. Lenin Pavón Romero.

Dr. Jorge Morales Montor
ASESOR DEL TEMA

Q.F.B. Elizabeth Guadalupe Ibarra Coronado
SUPERVISOR TÉCNICO

Itztli Graciela Trejo Sánchez
SUSTENTANTE

DEDICATORIA

Dedico este trabajo completo, así como toda la difícil trayectoria que me ha llevado a alcanzar esta meta, a las dos personas sin las cuales nada de esto hubiera sido posible, pues es un esfuerzo conjunto y logro común. Con todo mi amor y agradecimiento a:

Mi madre, Patricia Sánchez Martínez

Por todos estos años de esfuerzo, de espera y de paciencia; sabiendo que no habrá palabras para agradecer todo el amor y el esmero que día a día has puesto en la magnífica formación que me has regalado para convertirme en la persona que soy, te hago este pequeño presente.

Mi hermano, Pedro Arturo Trejo Sánchez

Con toda mi admiración y respeto, por todo el apoyo incondicional, la paciencia y las palabras de aliento y consejo; pero sobre todo, por ser mi mejor amigo para toda la vida, te regalo este trabajo para que te sea muestra de que sí se puede y que tú también lo vas a lograr.

*Porque “No somos cocineros, pero somos familia...”
...y lo que es importante para ti, también lo es para mí.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme la oportunidad de cursar mi educación superior en sus aulas y con ello, otorgarme una formación no solo académica, sino también para la vida, de la cual, me siento orgullosa. A través este trabajo, reitero mi compromiso con, indudablemente, la mejor universidad de Iberoamérica, esperando que sea un ejemplo más del trabajo de excelencia que se realiza en esta institución orgullosamente pública.

A la **Facultad de Química** por todas las oportunidades de desarrollo y mejora que me otorgó y por el ambiente en el que forma profesionales competentes: estricto y disciplinado, pero también siempre apoyando a sus estudiantes, sobre todo a los que lo nunca fuimos de excelencia, pero que más necesitamos de este apoyo.

Agradezco a la **Red FarMed** y **CONACyT** por el apoyo económico aportado durante el desarrollo de este trabajo, así como las oportunidades que me brindó como becaria de esta red.

Al **Dr. Jorge Morales Montor** a quien le doy mi más sincero agradecimiento por haberme recibido como miembro de su magnífico equipo de investigación, por la confianza de hacerme responsable de un proyecto tan prometedor y fascinante; por la objetividad e interés puesto en el desarrollo de éste y en mi formación académica, así como por todas las oportunidades académicas que me han involucrado y apasionado en la ciencia. Con toda mi admiración hacia un excelente líder; así como a su equipo de investigación, de manera especial a:

cDra. Elizabeth Ibarra Coronado por ser alguien fundamental en el término de este proyecto, por la solidaridad y apoyo recibido, por los consejos, la ayuda, el tiempo y por nunca dejarme sola; pero sobre todo por haberme permitido conocerla y ganarme su valiosa y muy apreciada amistad. Gracias Eli.

Dra. Karen Nava Castro quien me compartió su conocimiento en el ámbito de la citometría de flujo y que pacientemente colaboró en el desarrollo y análisis de los experimentos realizados en este proyecto; así como por sus consejos y observaciones que sin duda, enriquecen este trabajo.

Bióloga Lorena López Griego. Técnico Académico del laboratorio; por su ayuda, enseñanza y asesoría de las técnicas que ocupé durante el desarrollo de mi tesis. Por sus recomendaciones y por la paciencia e interés puesto en cada experimento, pero le agradezco más el haberme recibido desde el primer día que llegué con esa gran sonrisa y optimismo que siempre me contagian.

Dr. Rómel Hernández Bello por su contribución en el desarrollo del modelo de infección con *Trichinella spiralis*. Por ser un miembro muy especial del equipo, por la paciencia, la tolerancia, sus invenciones raras (dispositivo posicionador F y otros); por las pizzas, las comidas, los chistes en francés no-graciosos, los ataques de risa y más aún por ser “el posdoc”.

p.Q.F.B. Ricardo Ramírez Nieto por su apoyo en cada uno de los experimentos, por ser la voz de mi conciencia en momentos de locura, por ser el camino de migajitas que me llevó al laboratorio de interacciones neuroinmunoendócrinas y más que nada por el tiempo compartido y su paciente y muy atesorada amistad.

A mis compañeros de laboratorio **Nelly, Rosalía, Valeria, Nancy, Karencita, Saé, Angie, Yola y Paul**, por compartir conmigo su apoyo, consejos, risas, por la convivencia, los viernes de antro, las bromas, pero sobre todo por acogerme desde el primer día como parte del equipo, dándome la oportunidad de conocerlos y regalarme su amistad. Así como a los nuevos elementos, que aunque hemos convivido poco, ya son parte del equipo: **Anita, Nash, Armando, Montse, Marisa, Víctor y Jonathan**, esperando que llegemos a ser más que sólo buenos compañeros.

Dr. Armando Pérez Torres Por su asesoría en la interpretación de los cortes histológicos mostrados en este trabajo. A **Verónica Rodríguez** y el grupo de trabajo del laboratorio de técnicas histológicas de la Facultad de Medicina, UNAM por la enseñanza y revisión de la técnica histológica utilizada.

Al **Dr. Julio César Carrero Sánchez**, así como al grupo de trabajo del Dr. Juan Pedro Laclette: **Óscar, María, Hugo, Yuliette, Janis, Paty y Roberto**, de quienes recibí la primera formación en un laboratorio de investigación y quienes nunca me negaron su apoyo para completar el presente trabajo.

A los profesores **José Sullivan López, Christian Pérez Shibayama, Ana Esther Aguilar, Ignacio Camacho Arroyo y Martha Menjívar**, quienes de alguna manera me iniciaron en el camino del estudio en el ámbito de la Inmunología y la Endocrinología con su invaluable enseñanza, conocimiento y ejemplo. Con profunda admiración y respeto.

Agradezco a la familia Sánchez por ser parte del núcleo en el que me formé, especialmente a mi abuelo **Pedro Sánchez Castillo (q.e.p.d.)** por sus enseñanzas de trabajo y de esfuerzo, que siguen rindiendo fruto en la familia, siendo este trabajo resultado de su ejemplo. A mi abuela **Ángela Martínez Negrete**, por su ejemplo de fortaleza y devoción admirables que le han permitido fungir exitosamente como pilar de la familia. Gracias.

A todos mis amigos, quienes han dejado un poquito de sí en mi corazón, mitigando con su compañía los momentos amargos: **Alianny, Moisés, Joe, Chava, Marthis, Socia, Brenda, Vicky, Daniela, Mariel (q.e.p.d.), Colega, Maribel, Maggye, Omar, Myriam, Jaz, Bere, Yudi, Jaimico**. Gracias chicos.

Finalmente, agradezco a Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida y poderlo compartir en compañía de las personas que amo.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Antecedentes.....	12
1. <i>17β-estradiol</i>	12
1.1 <i>Biosíntesis y mecanismos de acción.</i>	
1.2 <i>Efectos fisiológicos generales.</i>	
1.3 <i>Efectos sobre el sistema inmune.</i>	
2. <i>Interacciones neuroinmunoendócrinas</i>	20
3. <i>Efectos ambientales sobre el desarrollo de los organismos</i>	22
3.1 <i>Periodos críticos de desarrollo.</i>	
3.2 <i>Plasticidad de los sistemas en desarrollo</i>	
3.3 <i>Programación durante el desarrollo</i>	
4. <i>Compuestos Disruptores Endócrinos (CDE)</i>	27
4.1 <i>CDE estrogénicos.</i>	
4.2 <i>Fuentes y vías de exposición.</i>	
4.3 <i>Mecanismo de acción.</i>	
4.4 <i>Efectos fisiológicos en humanos</i>	
5. <i>Trichinella spiralis</i>	36
5.1 <i>Ciclo de vida</i>	
5.2 <i>Aspectos clínicos</i>	
5.3 <i>Epidemiología y distribución geográfica.</i>	
5.4 <i>Respuesta inmune asociada a la infección entérica.</i>	
Planteamiento del problema.....	43
Justificación.....	44
Hipótesis.....	45

Objetivos.....	45
1. <i>Objetivo general.</i>	
2. <i>Objetivos particulares.</i>	
Materiales y métodos.....	46
1. <i>Obtención de grupos de animales experimentales.</i>	
2. <i>Administración de 17β-estradiol.</i>	
3. <i>Mantenimiento del ciclo de vida de T. spiralis.</i>	
4. <i>Obtención de larvas musculares de T. spiralis.</i>	
5. <i>Infección</i>	
6. <i>Sacrificio y obtención de tejidos.</i>	
7. <i>Cuenta de parásitos en intestino.</i>	
8. <i>Procesamiento de duodeno para tinción con Hematoxilina-Eosina.</i>	
9. <i>Citometría de flujo.</i>	
10. <i>Análisis estadístico.</i>	
Resultados.....	51
1. <i>Carga parasitaria.</i>	
2. <i>Citometría de flujo.</i>	
3. <i>Tinción H-E de duodeno.</i>	
Discusión.....	64
Conclusiones.....	72
Perspectivas.....	73
Referencias.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>T. spiralis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
ACK	Solución amortiguadora para lisis de eritrocitos
Ad	Adultos, parásitos
AhR	Receptor a arilhidrocarburos
AIF	Factor de interacción del receptor a aril hidrocarburos
Arnt	Proteína traslocadora nuclear del receptor a aril hidrocarburos
BPA	Bisfenol A
CAR	Receptor constitutivo de androsterona
CDE	Compuestos disruptores endócrinos
CEE	Células enteroendócrinas
CO ₂	Dióxido de carbono
CPK	Creatinina-cinasa, examen
CPS	Coproparasitoscópico, examen
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DES	Dietilestilbestrol
DHL	Deshidrogenasa láctica, examen
E2	17 β -estradiol
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER α	Receptor a estrógenos alfa
ER β	Receptor a estrógenos beta
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia, solución amortiguadora
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona folículo-estimulante
GBG	Globulina de unión a esteroides sexuales
H-E	Hematoxilina-Eosina, tinción.

ICC	Células intestinales de Cajal
IDR	Prueba intradérmica de Montenegro
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
iNOS	Sintetasa inducible de óxido nítrico
ITF	Factor de trébol intestinal
LH	Hormona luteinizante
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MMPs	Metaloproteínas de matriz
Muc	Mucina
NKs	Asesinas Naturales, células
NO	Óxido nítrico
P450scc	Enzima de corte de la cadena lateral del colesterol
PARs	Respuestas adaptativas predictivas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PXR	Receptor X de pregnano
RPM	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
Stat6	Activador de la transcripción 6
SXR	Receptor de esteroides y xenobióticos
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, estudia la influencia de la exposición neonatal al 17β -estradiol, sobre la respuesta inmune intestinal contra *Trichinella spiralis*. Anteriormente, nuestro laboratorio reportó que los ratones tratados con una sola dosis de 17β -estradiol en el periodo neonatal muestran resistencia a la cisticercosis producida por *Taenia crassiceps*. Este efecto estaba asociado a un incremento de IFN- γ en suero en las hembras, mientras que en los machos el incremento era de IL-4. En el estudio que aquí se presenta, se administró una única dosis de esta hormona a ratones neonatos; posteriormente, en la etapa adulta fueron infectados con larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Cinco días después, durante la etapa entérica o aguda de la infección, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron diversos órganos del sistema inmune para detectar si existían diferencias cuantitativas en las poblaciones de células inmunes entre grupos tratados y control. Los resultados nos permiten observar un decremento en la cuenta parasitaria en animales estrogenizados respecto a los controles; así como un incremento atribuido al tratamiento neonatal con estradiol de las células CD3 en bazo de hembras, así como en timo tanto de hembras como de machos y de macrófagos en ganglios linfáticos mesentéricos de hembras. Estos cambios son atribuidos al ambiente endócrino estrogénico que se asocia con una respuesta inmune protectora durante la infección aguda con *T. spiralis*, induciendo resistencia. Así, la exposición a 17β -estradiol durante un periodo crítico de desarrollo, como lo es la etapa neonatal en ratones, tiene influencia en la activación y tipo de respuesta inmune frente al reto antigénico particular de la infección en fase entérica con *T. spiralis* en animales adultos.

ANTECEDENTES

1. 17β -estradiol.

El 17β -estradiol es una hormona esteroide sexual liposoluble con actividad estrogénica, es decir, tiene efecto feminizante y afecta la proliferación, diferenciación y función de tejidos y órganos del sistema reproductor femenino; aunque también tiene efectos importantes y es necesaria para el desarrollo adecuado en machos^{3, 14}. La molécula de estradiol, se compone de un núcleo esteroide de dieciocho átomos de carbono que conforman tres anillos ciclohexilo y un anillo ciclopentilo, además de un grupo hidroxilo unido al anillo A (3-OH) y otro unido al anillo D (17-OH); los números hacen referencia a las posiciones en la estructura del esteroide⁴⁰. El estradiol se encuentra en circulación, principalmente unido en un 60% a albúmina y en un 38% a la globulina de unión a esteroides sexuales (GBG); por lo que sólo se encuentra libre para poder interactuar con sus receptores en un 2%¹⁴. Prácticamente todo el estradiol endógeno es producido por los ovarios y tiene dos picos de secreción: uno antes de de la ovulación y otro durante la mitad de la fase lútea. Al inicio de la fase folicular, son secretados alrededor de 19-140 pg/mL diarios, 110-410 pg/mL antes de la ovulación y 19-160 pg/mL durante la mitad de la fase lútea; por otro lado, en varones, el índice de secreción por día es de alrededor de 14-55 pg/mL y es producido en los testículos¹⁵.

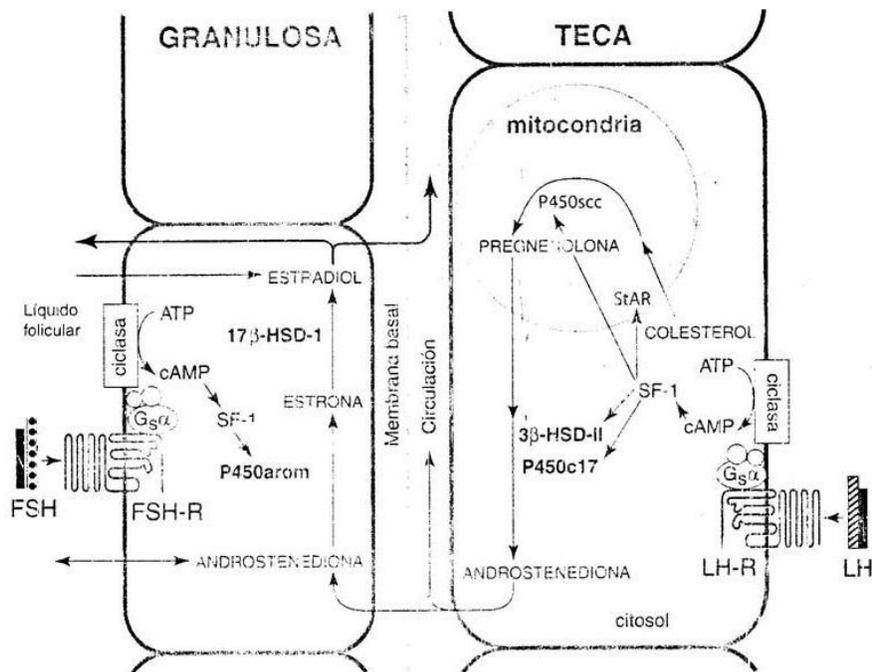
1.1. *Biosíntesis y mecanismo de acción.*

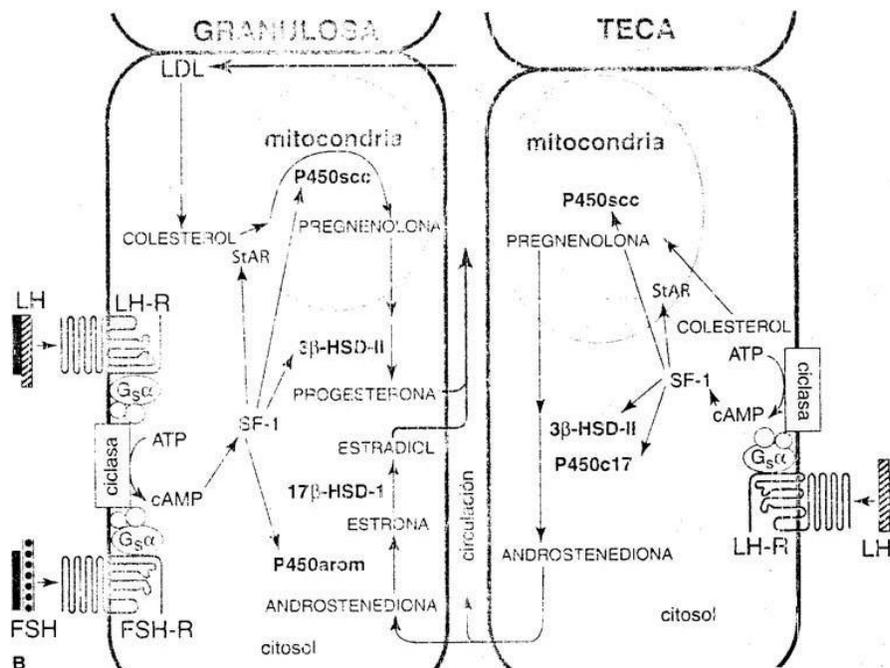
Biosíntesis.

La síntesis del estradiol es una secuencia de seis pasos enzimáticos que, durante la fase folicular y la fase lútea del ciclo menstrual es producida. El paso determinante para la síntesis de hormonas esteroides sexuales es la reacción que cataliza la enzima que corta la cadena lateral de colesterol (P450scc)^{14, 26}, esta

reacción convierte el colesterol en pregnenolona; una vez que ésta es formada, los pasos que dirigen a la síntesis de la hormona que finalmente será secretada dependen del órgano endócrino y tipo de célula que la sintetice^{3, 14}. Esta síntesis se lleva a cabo en diferentes órganos; en la mujer, principalmente, ocurre en ovarios en las células de la teca interna y células de la granulosa; así como en las zonas fasciculada y reticular de la corteza suprarrenal¹⁴.

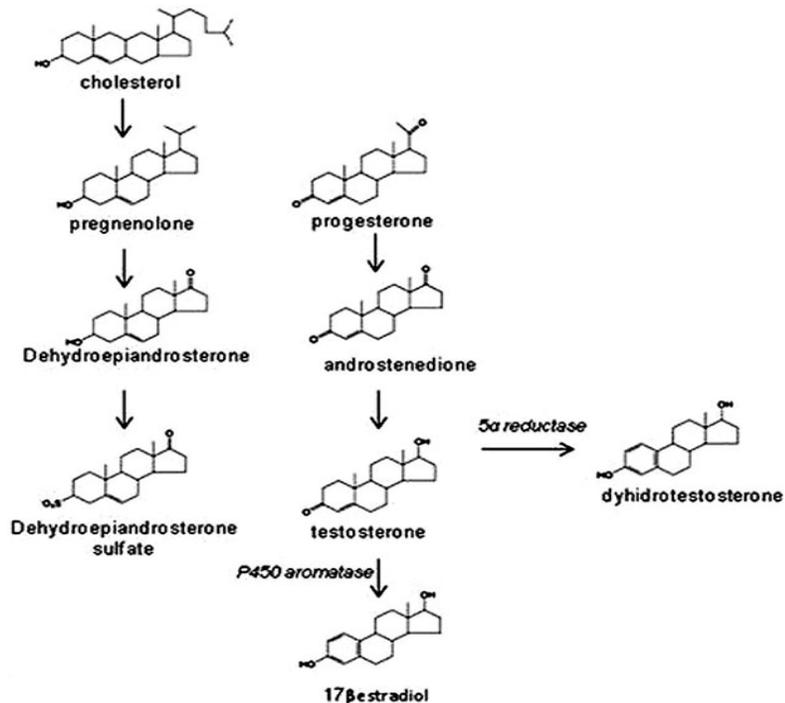
Una característica determinante en la síntesis de estradiol, es que es un proceso altamente regulado: es necesaria la síntesis de los andrógenos testosterona y androstenediona, posteriormente, la conversión de testosterona a estradiol depende de la enzima aromatasa que cataliza esta reacción^{3, 14}. Adicionalmente, la síntesis es estimulada por FSH y LH, liberadas por la hipófisis en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de origen hipotalámico. La FSH y LH actúan mediante cAMP, ya que el proceso depende de éste para aumentar la actividad de la aromatasa y la conversión de colesterol a androstenediona¹⁴. Además, está limitada la disponibilidad de sustrato por la traslocación de colesterol a la mitocondria mediante la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR)¹⁵. Las figuras 1, 2 y 3 esquematizan la biosíntesis del estradiol en fase folicular y fase lútea.





Figuras 1-2. Biosíntesis del estradiol. El folículo prevulatorio produce estradiol en fase folicular, las células de la teca proveen del sustrato androstenediona a las células de la granulosa. En el cuerpo lúteo, durante la fase lútea, las células de la granulosa aumentan la síntesis de progesterona y las células de la teca son la fuente de androstenediona para la producción de estradiol. De *Endocrinología Básica de Greenspan, 7ª edición.*

Figura 3. Biosíntesis del estradiol con las estructuras de los intermediarios. De *Bulzomi y Marino, Frontiers in Bioscience* 16, 2011.



Mecanismo de acción.

El mecanismo por el que el estradiol ejerce efecto sobre las células blanco, se lleva a cabo por la interacción de esta hormona con su receptor; existen dos tipos de receptores a estrógenos: ER α y ER β , ambos pueden localizarse en citoplasma o en la membrana plasmática y algunos tejidos tienen uno u otro tipo, pero también existen tejidos que pueden presentar ambos^{12, 14}; El ER α se localiza principalmente en útero, riñones, hígado y corazón, en tanto que el ER β es encontrado principalmente en ovarios, próstata, pulmones, tracto gastrointestinal, sistema hematopoyético y SNC¹⁴.

De esta manera, el estradiol ejerce diferentes efectos sobre la célula, que pueden ser tanto genómicos, como no genómicos^{12, 28}. Los primeros se llevan a cabo después de que el estradiol ha atravesado la membrana celular y se une con su receptor; de manera que el dominio de unión del ER se orienta en el espacio como una cavidad en forma de bolsa y la molécula de estradiol se ajusta a ésta de manera precisa; además de este ajuste, las interacciones químicas entre la hormona y el receptor contribuyen a la afinidad de esta unión. Adicionalmente, los dos grupos hidroxilo son determinantes para la unión de estradiol en la bolsa de unión del ER porque el punto inicial de contacto entre la molécula de estradiol su receptor es el 3-OH que interactúa en una ubicación exacta en la bolsa de unión. Una vez formado el complejo hormona-receptor, éste reconoce una secuencia específica de ADN, denominado elemento de respuesta a estrógenos (ERE), al que también se le unen proteínas correguladoras y que actúa como un factor de transcripción; es decir, promueve la transcripción de ciertos genes induciendo la síntesis de ARN que resulta en la producción final de nuevas proteínas^{12, 40}. Ver figura 4.

El mecanismo de acción no-genómico del estradiol es un proceso rápido, que ocurre en segundos o minutos, por lo que no intervienen procesos de transcripción y síntesis de proteínas para producir su efecto^{28, 40}; de acuerdo con lo anterior, debe ser mediado por un receptor de membrana. Recientemente se han localizado

ER mitocondriales y se sabe que regulan la estructura y función en este organelo, induciendo la eficiencia respiratoria y el balance antioxidante⁷.

Algunos de los efectos mediados por el estradiol de manera no-genómica son: en tejido cardiovascular, donde inhibe canales de Ca^{2+} en músculo liso vascular, reduciendo la acción de vasoconstrictores y que explica su efecto en la vasodilatación. En sistema óseo, ejerce su efecto a través de sitios de unión a estrógenos en osteoblastos y osteoclastos; así como en sistema nervioso central, donde el estradiol ejerce sus propiedades neuroprotectoras^{3, 7, 12}.

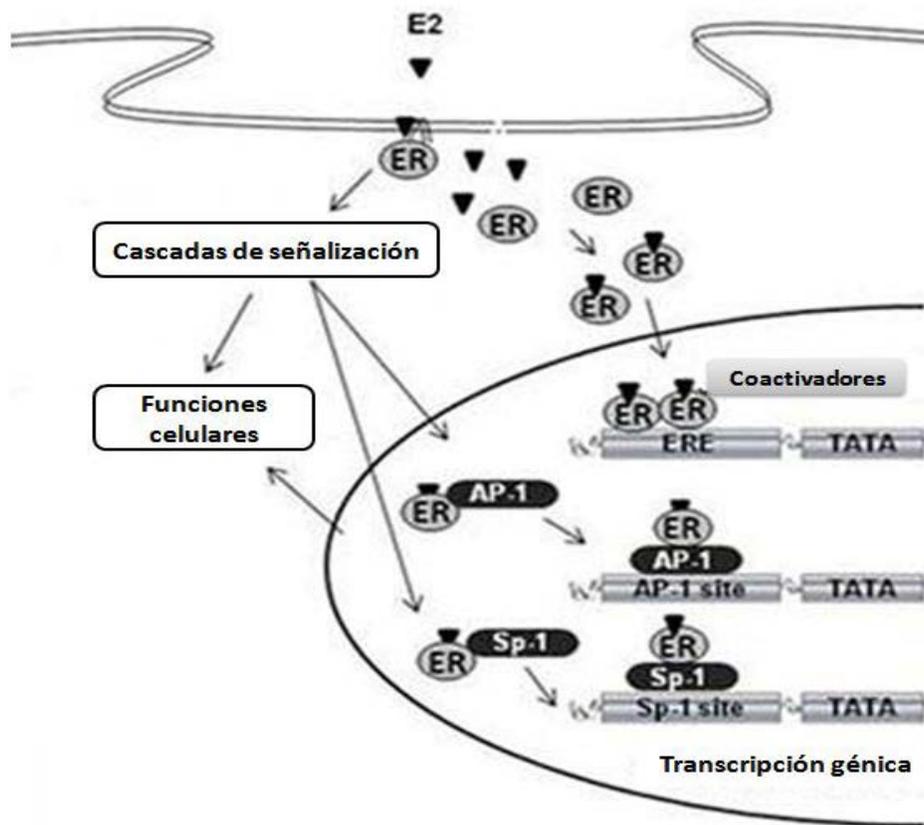


Figura 4. Mecanismo de acción del estradiol. El complejo ER-E2 activado se dimeriza y trasloca al núcleo, donde se une a ERE y activa la transcripción (efecto genómico). Cuando el E2 se une a su receptor de membrana, son dirigidas diversas cascadas de señalización necesarias para llevar a cabo las funciones celulares. AP-1, factor de activación 1, Sp-1, factor estimulante 1. Modificada de Bulzomi y Marino. *Frontiers in Bioscience* 16, 2011.

1.2. Efectos fisiológicos generales.

Las funciones del estradiol, son, por una parte, a nivel del eje reproductor y por otra, a nivel orgánico. Entre los primeros los más importantes son:

1. Sobre los genitales femeninos: facilitan el crecimiento de los folículos ováricos y aumentan la movilidad de las trompas de Falopio. Aumentan la cantidad de músculo uterino y su contenido de proteínas contráctiles^{3, 14, 28}.
2. Sobre órganos endócrinos: disminuye la secreción de FSH y disminuye la secreción de LH, según el caso^{3, 14}.
3. Caracteres sexuales secundarios femeninos: inducen el crecimiento de las glándulas mamarias y el estrechamiento de hombros, ensanchamiento de caderas, muslos convergentes y brazos divergentes¹⁴.

Respecto a las funciones que los estrógenos tienen a nivel orgánico y sistémico, se incluyen las siguientes de manera importante:

1. Sobre sistema nervioso central: son los causantes del comportamiento estral en los animales y aumentan la libido en los humanos. Adicionalmente, aumentan la proliferación de las proyecciones dendríticas en las neuronas y tiene un efecto neuroprotector ante radicales activos de oxígeno inhibiendo la liberación de iNOS y NO^{3, 7, 14, 28}.
2. Sobre la actividad metabólica: presentan cierta actividad anabólica que se traduce en retención de nitrógeno, sal y agua, con tendencia a la formación de edemas; disminuyen la concentración plasmática de colesterol y en hígado, incrementan la síntesis de enzimas y factores de coagulación^{3, 14}.
3. En tejido óseo: bloquea la actividad de las citocinas implicadas en la resorción ósea, lo cual explica la pérdida de masa ósea que se produce a partir de la menopausia^{3, 14}.
4. Efectos cardiovasculares: producen vasodilatación rápida mediante el incremento de la producción local de óxido nítrico^{3, 14, 28}.

1.3. *Efectos sobre el sistema inmune.*

El sistema inmune, es preponderante para la supervivencia de las especies, de manera que tiene la capacidad y función de distinguir lo propio de lo ajeno y responder ante éste para impedir el establecimiento de agentes patógenos en el organismo²⁵. Cuando esta función no se lleva a cabo de manera correcta, el sistema inmune pierde su capacidad de protección o dirige de forma errónea su actividad, desencadenando diversas patologías que llevan a la enfermedad e incluso la muerte²⁵. De acuerdo con esto, es necesario que sea un sistema ampliamente regulado, de manera que genera una enorme variedad de células que actúan en conjunto en una red dinámica¹¹.

Así, el sistema inmune, lleva a cabo sus funciones no solamente a través de sus moléculas específicas, sino que también el sistema endócrino ejerce influencia sobre éstas^{11, 38, 39}, ya que la respuesta inmune requiere de la proliferación celular y la transformación de sus componentes; estos procesos precisan de cambios metabólicos y factores de crecimiento. En consecuencia, en el control de la respuesta inmune, participan de manera activa diversas hormonas que tienen efectos sobre las células del sistema inmune por la acción sobre sus receptores específicos¹¹.

En concordancia con estos antecedentes, dentro de las múltiples funciones que el estradiol ejerce, una de las más importantes es la modulación de la inmunidad y la autoinmunidad^{7, 11, 23, 36, 38, 39}; un mecanismo por el cual puede ejercerlo, es a través de la regulación de la secreción de citocinas^{7, 11, 36, 38, 39}. Por ejemplo, a nivel molecular, se ha descubierto que la región promotora del gen IFN- γ tiene un elemento de respuesta a estrógenos y se ha encontrado un incremento en los transcritos de este gen en linfocitos estimulados con estrógenos¹¹.

De manera general, el estradiol tiene efectos duales sobre la respuesta inmune, de modo que el tipo de respuesta inmune que se llevará a cabo, depende de la concentración del estradiol^{11, 36}. A concentraciones altas (cercanas a las del embarazo, 5-16 ng/mL^{11, 14}), el estradiol inhibe la secreción de importantes

citocinas proinflamatorias como: TNF, IL-1 β , IL-6, MCP-1, la expresión de iNOS, la producción de MMPs y la actividad de células NKs. Adicionalmente, el estradiol estimula la secreción de citocinas antiinflamatorias como son: IL-4, IL-10 y TGF- β . En contraste, a concentraciones bajas el estradiol (de post-menopausia) estimula la secreción de TNF, IFN- γ , IL-1 β , así como la actividad de células NKs^{11, 36}.

Aunado a esto, en las células T CD4+ periféricas, el estradiol tiene una fuerte influencia sobre el desarrollo y mantenimiento de la función tímica y de esta forma, sobre la generación de células T vírgenes CD4+ y CD8+⁷. Cabe recalcar, de manera importante, que esta dicotomía de los efectos del estradiol sobre sistema inmune, no es observada en células B, en las cuales a cualquier concentración de estradiol, es promovida la producción de anticuerpos. En las figuras tres y cuatro, están resumidos los efectos que tiene el estradiol sobre las diferentes células del sistema inmune³⁶.

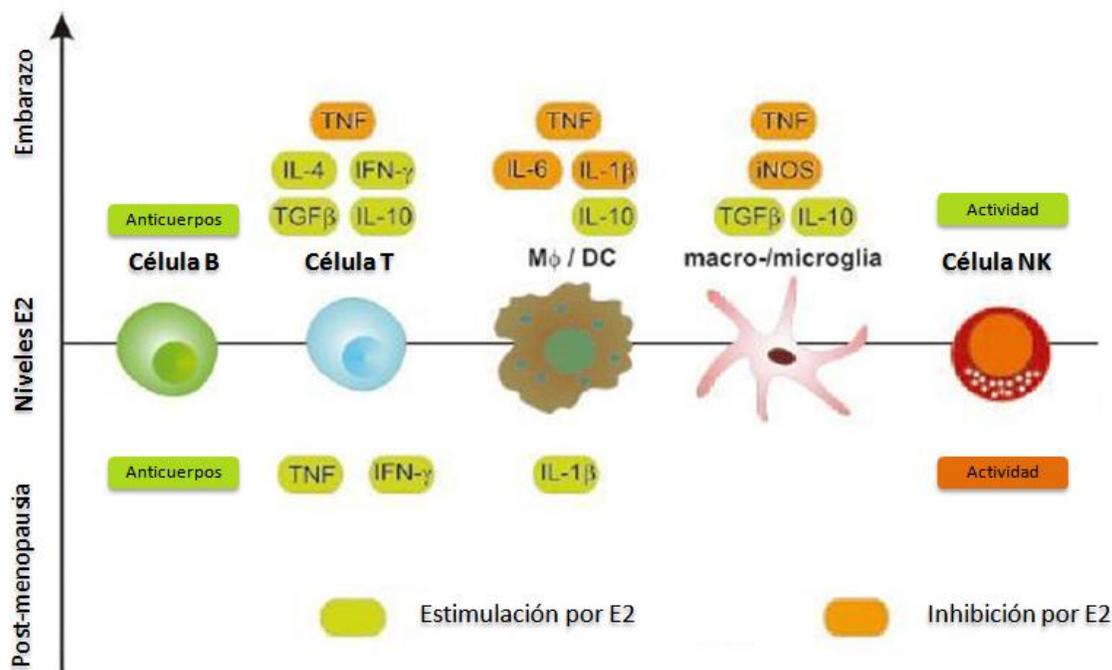


Figura 5. Efecto del Estradiol dosis-dependiente sobre diversas células del sistema inmune. Modificada de *Straub R., Endocrine Reviews 28(5), 2007.*

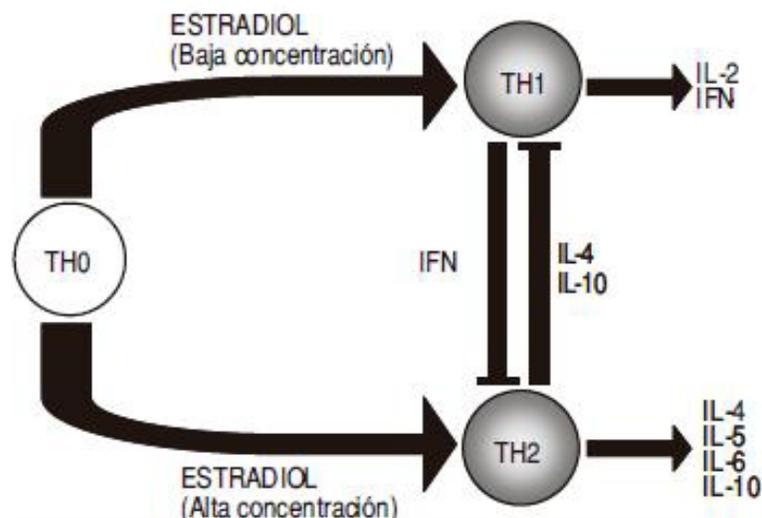


Figura 6. Efecto dual del estradiol dependiente de la concentración sobre la diferenciación de células T. Modificada de De León-Nava MA., Morales-Montor J. *Rev. Inv. Clin* 58(2), 2006

Por otra parte, vale la pena mencionar que si bien el sistema endócrino, a través de sus componentes solubles puede regular las funciones del sistema inmune, también éste tiene la capacidad de regular al sistema endócrino de manera que estos sistemas se encuentran en una continua interacción bidireccional. Así mismo, esta interacción también contempla al sistema nervioso, de manera que se sabe que estos sistemas conforman una red de comunicación denominada red neuroinmunoendócrina.

2. Interacciones neuroinmunoendócrinas

Actualmente, existen pruebas sustanciales que proveen de información acerca de la interacción entre los sistemas neuroendocrino e inmune, de manera que se sabe que mantienen una comunicación bidireccional^{7, 11, 38, 39}. Así, diversas hormonas y neuropéptidos han demostrado influir en el desarrollo y la función inmune en los individuos; ya que las células inmunes expresan receptores para muchos de estos ligandos y de manera similar, los receptores de citocinas y

factores de crecimiento se han identificado en las células de los sistemas nervioso central y endócrino^{11, 38, 39}.

Los descubrimientos reportados al respecto, son la base para interpretar estos mecanismos de interacción en el mantenimiento de la homeostasis^{11, 38, 39}. Las evidencias a nivel celular, molecular y funcional de la interconexión entre estos sistemas son: 1. Las células de los sistemas inmune, nervioso y endócrino expresan receptores para hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos. 2. Las sustancias producidas por las células de estos sistemas coexisten en el tejido linfoide, nervioso y endócrino. 3. Algunos mediadores endócrinos y nerviosos afectan al sistema inmune y a su vez, los mediadores inmunes pueden afectar la función endócrina y nerviosa³⁹.

Normalmente, estas redes de regulación forman un circuito de retroalimentación negativa en la que la homeostasis se mantiene entre los sistemas inmune y nervioso central. Las alteraciones en estos sistemas pueden conducir a la activación o supresión inmune, dependiendo de los sistemas que están siendo afectados y la naturaleza de los estímulos³⁸. Los mediadores hormonales y neuropéptidos que vinculan el sistema endocrino, sistema nervioso central e inmunológico constituyen los ejes específicos principales de la regulación de la homeostasis: el eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenales (HPA), el eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides y el eje Hipotálamo-Pituitaria-Gónada, éstos se ven afectados en algunos de sus componentes por los factores involucrados en la red neuroinmunoendócrina: neurotransmisores, citocinas y hormonas^{38, 39}.

De estos factores, las hormonas esteroides sexuales juegan un papel importante en las diferencias en la susceptibilidad asociadas al sexo en ciertas enfermedades infecciosas y autoinmunes; por ejemplo, se sabe que las hembras en algunas especies, presentan una respuesta tipo humoral más intensa frente a la infección; además, en hembras es más frecuente la producción de anticuerpos autorreactivos³⁹. Adicionalmente, las hormonas sexuales modulan varios mecanismos implicados en la activación de la respuesta inmune, los cuales han

sido mencionados en la sección que atañe a los efectos del estradiol en este trabajo. La figura 16 ilustra las interacciones entre los sistemas endócrino, inmune y nervioso.

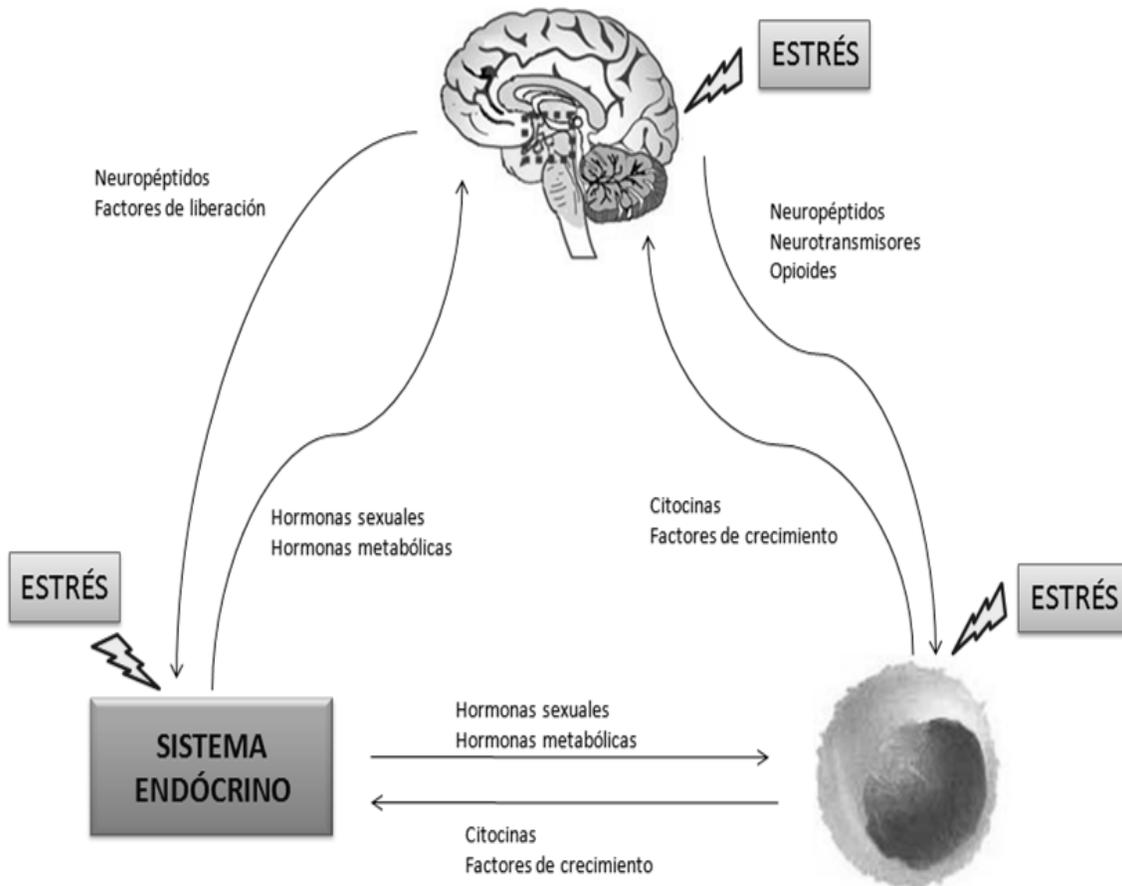


Figura 16. Interacciones neuroinmunoendócrinas. La interacción está mediada principalmente, a través de producción de factores solubles de inmune y neuroendocrino. Las células de los sistemas endocrino, nervioso e inmune en reposo o activadas por antígenos específicos, citocinas, estrés o lesiones, expresan receptores para hormonas y péptidos que permiten responder a los ligandos. Modificado de *Taub D., Cell Immunol. 2008.*

Si bien esta interacción ocurre principalmente con componentes endógenos para mantener las funciones fisiológicas adecuadas, también puede ser afectada por diversos componentes exógenos con capacidad de actuar sobre receptores específicos de las células involucradas en la red neuroinmunoendócrina.

3. *Efectos ambientales sobre el desarrollo de los organismos.*

Durante las últimas décadas, diversos estudios epidemiológicos retrospectivos han arrojado información de la creciente incidencia de enfermedades en individuos adultos que se relacionan con el bajo peso en el nacimiento, como la hipertensión, enfermedades coronarias, diabetes tipo 2 y obesidad, entre otras^{10, 16, 19, 27, 34}. Estos resultados, han llevado a la hipótesis de que algunas de estas enfermedades son provocadas no solamente por factores genéticos y el estilo de vida, sino también por factores ambientales que actúan durante las etapas prenatal y perinatal de los individuos^{10, 16, 19, 34}. Lo anterior, está sustentado en el hecho de que los sistemas orgánicos en desarrollo presentan una plasticidad que les permite modificar su fenotipo en respuesta a factores ambientales; así como en el hecho que existen periodos críticos en los que estos sistemas son más susceptibles a dicha exposición, de manera que los individuos expuestos son programados desde que se encuentran en el útero materno o en edad neonatal para manifestar ciertos padecimientos en la madurez^{10, 16, 19, 34}.

3.1. *Periodos críticos de desarrollo.*

Un periodo crítico de desarrollo comprende un intervalo de tiempo, en el cual, ocurre la división celular, diferenciación celular y morfogénesis^{31, 34}. Es fundamental recalcar que para cada sistema en desarrollo, existen uno o más periodos críticos de desarrollo³¹; sin embargo, durante las dos primeras semanas siguientes a la fecundación, la mayor parte del desarrollo consiste en la formación de estructuras embrionarias; por lo que los factores ambientales pueden causar cualquiera de dos situaciones: una muerte precoz y aborto espontáneo del embrión, o bien, sus efectos nocivos quedan compensados por las potentes propiedades reguladoras del embrión joven. En contraste, el desarrollo del embrión se altera con más facilidad durante la formación de tejidos y órganos, es decir, durante el periodo de organogénesis³¹. La figura 7, esquematiza los periodos críticos prenatales en humanos.

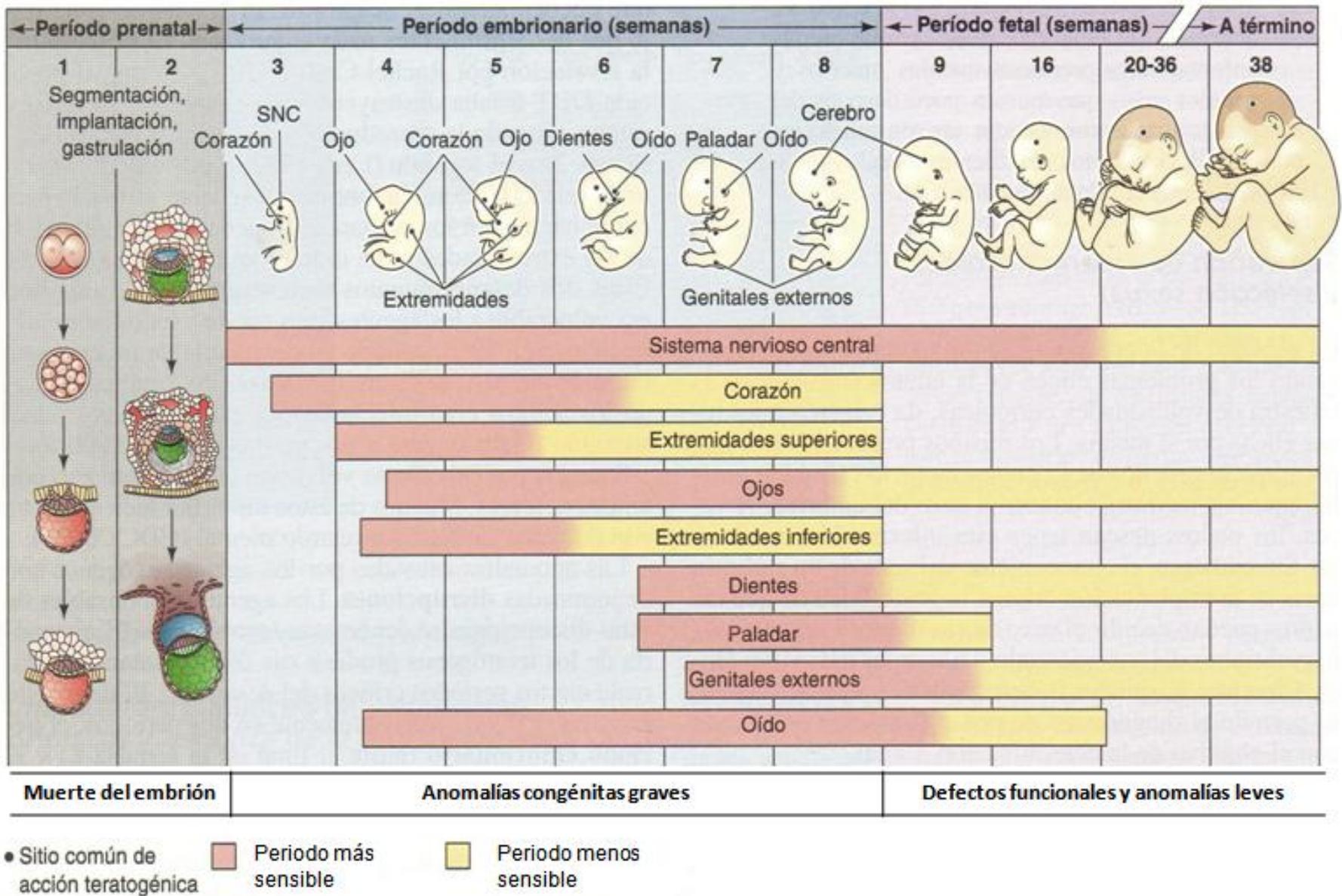


Figura 7. Periodos perinatales críticos de desarrollo prenatales en humanos. Modificado de Embriología Clínica de Moore, 7ª edición, 2000.

3.2. *Plasticidad de los sistemas en desarrollo.*

La plasticidad de los sistemas en desarrollo, es un concepto estrechamente relacionado con el de la programación durante el desarrollo, ya que es a través de esta plasticidad que un organismo pueda ser programado hacia la progresión de alguna patología^{16, 19, 31}.

Esta plasticidad de los sistemas en desarrollo, provee a los organismos de la habilidad para cambiar la estructura y función celular en respuesta a diferentes señales ambientales, que pueden ser tanto endógenas como exógenas^{16, 31, 34}; esta respuesta, ocurre durante los periodos críticos de desarrollo y sus efectos son irreversibles^{16, 19, 31, 34}. De tal forma que esta plasticidad permite la formación de una serie de fenotipos a partir de un solo genotipo en respuesta a las condiciones ambientales^{16, 31}.

Existen bastantes mecanismos por los cuales las señales o factores ambientales pueden influir en el programa de desarrollo. Primero, pueden afectar la expresión génica, particularmente por inducción de cambios epigenéticos en el ADN^{10, 16, 19, 34}; es decir, fenómenos que no afectan la secuencia de ADN de los genes, pero que sí varían su expresión dependiendo de ciertas condiciones bioquímicas como la metilación del ADN o de las histonas, o la forma de la cromatina. En otras palabras, son cambios reversibles del ADN que permiten o impiden la expresión de diversos genes, subordinados a las condiciones ambientales⁴³.

Las respuestas durante el desarrollo a estímulos ambientales, pueden ser, por una parte, disruptivas y por la otra, adaptativas¹⁶. Las primeras no tienen significancia evolutiva por lo que desencadenan malformaciones y enfermedades congénitas asociadas, como en el caso de los teratógenos³¹; en contraste, las respuestas del tipo adaptativo confieren al organismo en desarrollo alguna ventaja para su supervivencia¹⁶. Las denominadas *respuestas adaptativas predictivas* (PARs, por sus siglas en inglés), son un tipo de respuesta que parecen tener un valor adaptativo futuro, pues la ventaja no necesariamente es inmediata, pero

puede originarse a la expectativa de las condiciones ambientales futuras; de manera que optimizan el fenotipo durante la fase de plasticidad en el desarrollo para las condiciones probables del ambiente en el que se desenvolverá el organismo maduro, esto a través de un mecanismo, posiblemente, epigenético¹⁶.

3.3. Programación durante el desarrollo.

El término “programación durante el desarrollo”, se define como el proceso mediante el cual, en respuesta a las condiciones ambientales durante las etapas fetal o perinatal, se incrementa la susceptibilidad a padecer enfermedades en la vida adulta^{16, 19, 31}. A este concepto, se le ha llamado *hipótesis de Barker*³¹; la cual, ha cobrado importancia recientemente con la observación de estudios epidemiológicos y de los indicadores de salud fetales. A partir de ello, se han realizado experimentos en varias especies que indican que esta programación se produce durante periodos críticos de desarrollo y dado que, el crecimiento y desarrollo fetal y perinatal constituyen los periodos de mayor plasticidad celular y dependen no sólo del componente genético, sino que también, de manera importante, del ambiente en que se desenvuelve el individuo. Así, la exposición materna a factores ambientales durante el embarazo y la lactancia, tiene consecuencias sobre el fenotipo de su descendencia^{10, 16, 19, 34}.

En este punto, es menester hacer notar que estas teorías acerca de la programación durante el desarrollo y los cambios fenotípicos provocados por la exposición a diversos factores ambientales, han alcanzado gran aceptación en últimas fechas¹⁶. Aunque se han estudiado para plantear diversos modelos que explican los cambios demográficos de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, como lo es la diabetes tipo 2, síndrome metabólico o la obesidad^{10, 16, 34}, prácticamente no se han estudiado sus efectos sobre otros padecimientos del tipo infeccioso¹⁸, ni se ha probado qué tipo de factores ambientales pudieran intervenir en la resistencia o susceptibilidad a éstas o si el tipo de respuesta que éstos provocan es del tipo disruptiva o adaptativa, de manera puntual, en enfermedades infecciosas.

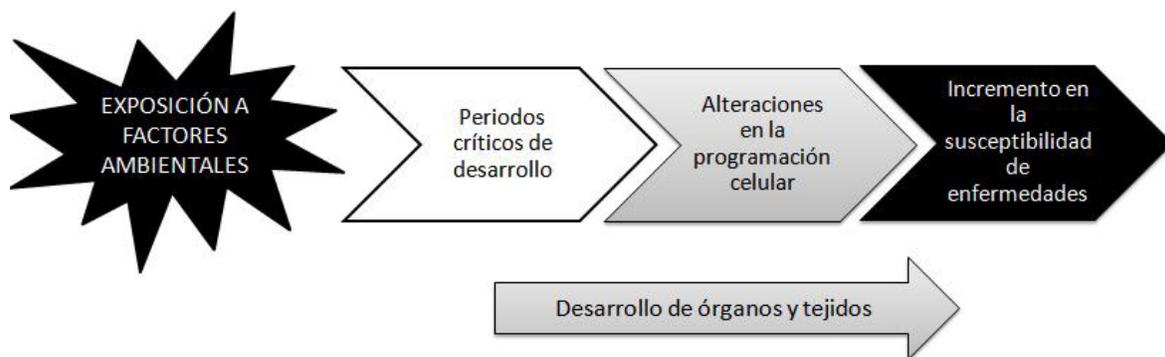


Figura 8 Modelo que ilustra la exposición a factores ambientales en la inducción de cambios funcionales a nivel celular, lo cual da origen a cambios en el estado fisiológico tisular y finalmente desencadena enfermedades en la vida adulta. . Modificado de *Schug T.T. et al. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 127, 2011.*

4. Compuestos disruptores endócrinos.

Dentro de los diversos factores ambientales que pueden ejercer efectos sobre los sistemas orgánicos en desarrollo, se encuentran los denominados compuestos disruptores endócrinos (CDE), los cuales son sustancias exógenas altamente lipofílicas que pueden actuar como agonistas o antagonistas hormonales debido a la semejanza estructural con hormonas esteroides sexuales; de acuerdo con el tipo de actividad que presentan pueden ser estrogénicos, anti-estrogénicos o anti-androgénicos¹⁹. Son capaces de interferir en la biosíntesis, almacenamiento, metabolismo y función de diversas hormonas en los organismos expuestos a ellos, así como en su descendencia^{10, 16, 19, 34} y sus efectos dependen de la dosis y periodo de exposición^{19, 34}. Los CDE pueden ser de procedencia natural, como los fitoestrógenos contenidos en la soya, o bien, sintética, como los residuos producidos en la fabricación de pinturas y plásticos, además de diversos plaguicidas^{5 19, 27}.

4.1. CDE estrogénicos.

Para objeto de este estudio, son de interés los CDE con actividad estrogénica, puesto que se buscó identificar si el estradiol ejerce influencia como disruptor endócrino; por lo que el alcance de este trabajo únicamente incluye a este tipo de CDE. Por consiguiente, los CDE estrogénicos son compuestos que tienen efecto agonista hacia los receptores de estrógenos y que interfieren en las vías fisiológicas en las que participan estas hormonas. Los CDE estrogénicos de mayor importancia, dado su uso industrial y farmacológico son: de origen sintético, el dietilestilbestrol (DES), el Bisfenol A (BPA) y el octilfenol; y de origen natural, la genisteína contenida en la soya¹⁹.

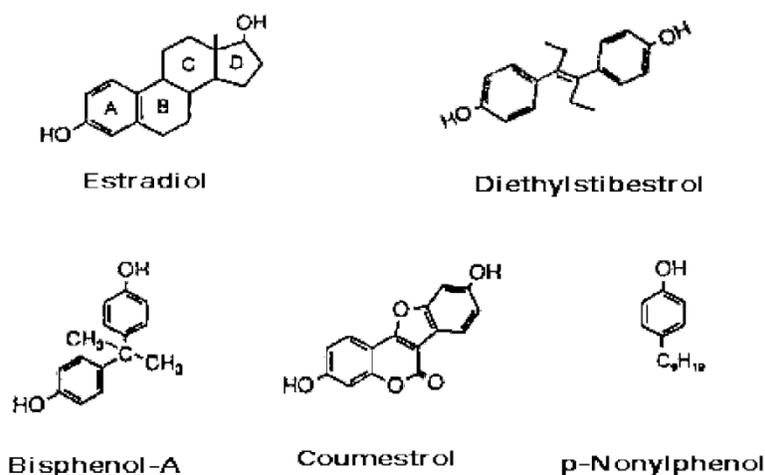


Figura 9. Estructuras químicas del estradiol y algunos CDE estrogénicos. Obsérvense las semejanzas estructurales. Modificado de *Witorsch R., Regulatory Toxicology and Pharmacology 36, 2002.*

4.2. Fuentes y vías de exposición.

De manera general, las fuentes de CDE son bastas y pueden ser tanto naturales como de origen sintético, que son producidos por la actividad industrial o como diversos pesticidas en la actividad agrícola. Las fuentes de exposición de los CDE estrogénicos, incluyen contaminantes de origen industrial como: octilfenol,

utilizado principalmente, en la fabricación de detergentes^{19, 27} y BPA para la producción de plásticos, principalmente el policarbonato y las resinas epoxi, que son aplicadas en la fabricación de electrónicos, electrodomésticos, botellas de agua reutilizables, recipientes para almacenar alimentos, así como revestimientos para envases de alimentos y bebidas^{19, 44}. Los CDE de origen natural, principalmente son los fitoestrógenos como genisteína y daidzeína; también existen los de uso farmacológico como el ya mencionado DES^{19, 40}.

Así, las vías de exposición pueden ser del tipo ocupacional o por el contacto con alimentos envasados, productos fabricados con estos materiales o bien, por el consumo de medicamentos con actividad hormonal.

4.3. *Mecanismo de acción.*

Este tema es controvertido y variado, en cuanto a que la bibliografía buscada para este subtema es por una parte limitada y por otra, es diversa, de manera que al hacer una búsqueda en la base de datos PubMed de NCBI con las palabras: *estrogenic endocrine disruptor mechanism* únicamente se encuentran cuarenta y nueve resultados, aclarando que la búsqueda con estas palabras es la que mayor resultados concentra hasta el día once de febrero de 2012. No obstante, con base en la información recopilada, se puede decir que los CDE pueden actuar a través de tres maneras: por bloqueo hormonal, dada su unión con un receptor que impide la interacción con el ligando natural y obstruyendo así los efectos celulares que lleva a cabo una hormona. También tienen la capacidad de imitar los efectos de las hormonas producidas naturalmente, induciendo reacciones similares en el organismo; o bien, pueden iniciar reacciones anormales que no estarían presentes en la célula cuando son inducidas por la hormona^{5, 27, 34}. Todos estos mecanismos se limitan únicamente a la interacción con receptores intracelulares, otros mecanismos, no son considerados para efectos de este estudio.

A su vez, los mecanismos de acción que implican la interacción con receptores intracelulares son de dos tipos: los que se llevan a cabo por la unión con ER α y ER β y en los que intervienen otros receptores intracelulares, que pueden ser activados por hormonas o por xenobióticos y que intervienen en el metabolismo de éstos, o que activan la transcripción de genes que alteran las funciones normales de las hormonas^{6, 19, 27, 29, 32, 37, 40}. Comenzando con los mecanismos en los que intervienen directamente los receptores a estrógenos, se puede explicar mediante el ejemplo del DES, ya que este modelo se basa en la similitud estructural entre la molécula del estradiol y compuestos estrogénicos exógenos; tal como ocurre con el DES^{35, 40}.

Aunque no es un esteroide, el DES se une al receptor de estrógenos y es tan estrogénico, que ha reportado enlazar al ER más fuertemente que el mismo estradiol⁴⁰, ya que comparte características químicas con éste: el DES contiene dos grupos hidroxilo situados en cada extremo de la molécula y la distancia entre éstos es similar a la que hay entre el 3-OH y el de 17-OH de la molécula de estradiol⁴⁰; además, la molécula de DES asume una configuración tridimensional que es similar a la del núcleo esteroide del estradiol. Así, este disruptor, puede insertarse en el dominio de unión de ER prácticamente de la misma manera que el estradiol, lo que sugiere que ambos ligandos experimentan ajustes y fuerzas de atracción semejantes en la bolsa de unión del ER, lo que explica sus actividades biológicas comparables⁴⁰.

La mayoría de los estrógenos ambientales se unen al ER del mismo modo que el DES, porque que presentan similitudes químicas con el estradiol, ya que poseen un fenol no comprometido que interactúa con el primer punto de contacto en el sitio de la bolsa de unión de ER⁴⁰. Por otro lado, las sustancias que se unen a ER, pero que no tienen al fenol, contienen grupo funcional que se comporta como éste, por ejemplo, el grupo cetona⁴⁰; o bien, pueden ser químicamente transformadas en sustancias fenólicas dentro del organismo⁴⁰. La afinidad relativa de unión de CDE estrogénicos con su receptor es una función de qué tan bien puede ser acomodado en la bolsa de unión del ER el resto de la molécula⁴⁰.

Respecto a los modelos en los que están involucrados los receptores intracelulares que modifican el metabolismo de hormonas esteroides, han sido reportados varios mecanismos^{5, 26, 29, 32, 40}, sin embargo, para propósito de este trabajo solamente van a exponerse cuatro de ellos. El primero respecta a receptores que modulan la transcripción génica para el metabolismo de sustancias exógenas en el organismo; el segundo, atañe a la inhibición de la degradación del complejo hormona-receptor a través del proteosoma y el tercero, al hecho de que el complejo hormona-receptor compite con el complejo hormona-disruptor por coactivadores de la transcripción. El último se fundamenta en la unión de CDE con el receptor a aril hidrocarburos, que activa la transcripción de manera semejante al complejo E2-ER. La figura 10 esquematiza estos mecanismos.

- *Disrupción debida a la alteración del metabolismo de hormonas y CDE.*

El receptor de esteroides y xenobióticos, SXR en humanos y el receptor X de pregnano, PXR, en roedores, así como el receptor constitutivo de androsterona, CAR; son receptores intracelulares que regulan genes involucrados en el metabolismo de esteroides y xenobióticos³⁷. Están altamente expresados en el hígado e intestino donde median la inducción de enzimas del citocromo P450, enzimas de conjugación y transportadores en respuesta a ligandos exógenos y a hormonas esteroides. El SXR activa la transcripción tras la unión con su ligando. En contraste, CAR es constitutivamente activo en la mayoría de las circunstancias y su alta actividad basal, es reprimida por los esteroides relacionados con androstenol. Muchos CDE alteran la actividad de CAR y la expresión de sus genes blanco, por ejemplo, el DDE, un metabolito del DDT, incrementa la actividad transcripcional tanto de CAR como de PXR en rata. Por otro lado, SXR/PXR es activado por un gran número de CDE, entre ellos, el BPA³⁷.

- *Efecto sobre la degradación de receptores mediada por el proteosoma.*

La inhibición de la vía de degradación por la ubiquitina-proteosoma regula a la baja la actividad transcripcional de receptores intracelulares^{29, 37}. El ER α se somete a diferentes grados de degradación en presencia de agonistas, antagonistas y moduladores selectivos de ER, demostrando que la actividad transcripcional puede ser afectada modulando la estabilidad del receptor; en consecuencia, los CDE podrían intervenir en la degradación de receptores intracelulares mediada por el proteosoma afectando la magnitud y duración de las respuestas hormonales^{29, 37}. Por ejemplo, durante la transcripción mediado por el ER en presencia de estradiol, ER α y ER β interactúan de manera directa con el componente del proteosoma, SUG1. En cambio, en presencia de BPA, es activada la transcripción, sin embargo, no intensifica la interacción entre ER β y SUG1, ocasionando una degradación lenta de ER β y potenciando su activación transcripcional²⁹.

- *Modulación de los coactivadores transcripcionales.*

Puede resultar de la competencia entre los receptores esteroides y los receptores de xenobióticos por diversos coactivadores transcripcionales. Por ejemplo, el receptor constitutivo de androstano CAR, puede inhibir la actividad transcripcional mediada por ER sin unirse a un ERE. La sobreexpresión de CAR conduce a una reducción dosis-dependiente de la actividad de ER; mientras que la adición del antagonista androstenol, mitiga este efecto²⁹. Estos resultados indican que los CDE activadores de CAR podrían tener ejercer su efecto disruptor limitando la disponibilidad de sus coactivadores³⁷.

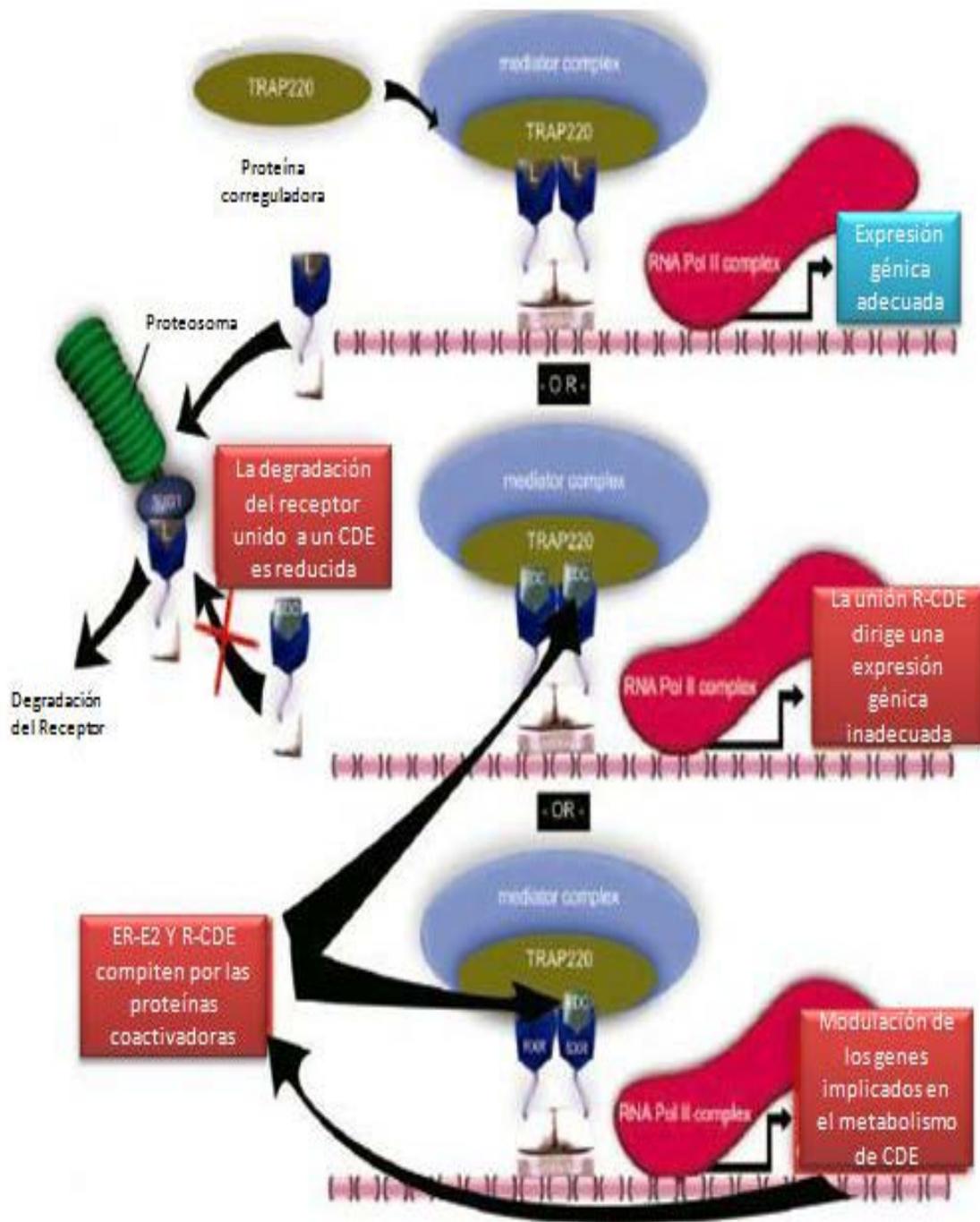
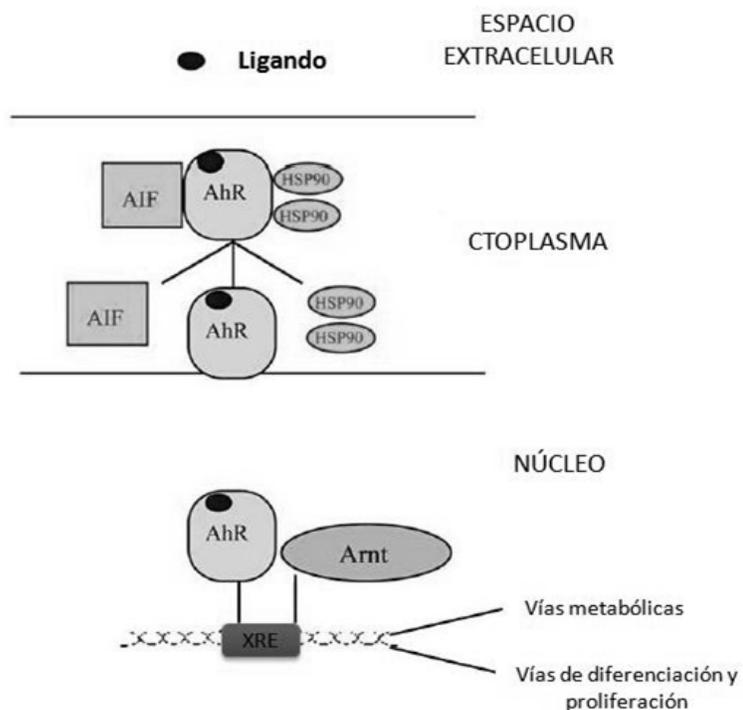


Figura 10. Mecanismos de acción de CDE a través de diversos receptores intracelulares. En la parte superior se muestra el efecto normal de la unión de E2-ER. En la parte intermedia se esquematizan los mecanismos por interferencia con la degradación por la vía del proteosoma, unión CDE-ER, competencia por coactivadores y en la parte inferior por interferencia metabólica. Modificado de *Tabb M. y Blumberg B., Molecular Endocrinology 20(3), 2006.*

- *Disrupción mediada por el receptor a Aril hidrocarburos*

El receptor a aril hidrocarburos, AhR, es un receptor huérfano, que está presente en el citoplasma unido al menos a tres proteínas adicionales, entre éstas, el factor de interacción de AhR (AIF) y dos moléculas de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90)^{5, 32}. Estas proteínas parecen mantener al AhR en un estado sensible a la unión del ligando. Tras la unión, las proteínas reguladoras son desplazadas y AhR se trasloca al núcleo, donde son intercambiadas estas proteínas por la proteína traslocadora nuclear del AhR, o Arnt. El heterodímero Ahr-Arnt formado, es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos sensibles a xenobióticos, o XRE, en la región promotora de los genes, actuando como un activador de la expresión génica en varios tejidos. Generalmente, los productos de estos genes pueden ser enzimas que metabolizan al CDE o proteínas reguladoras del crecimiento^{5, 32}. Este mecanismo es ilustrado en la figura 11.

Figura 11. Mecanismo de acción de CDE mediante la unión al receptor para aril hidrocarburos. Modificada de *Brevini T., et. al. Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders 5(1), 2005.*



4.4. Efectos fisiológicos en humanos.

Debido a que la diferenciación sexual normal humana, el crecimiento y desarrollo en la pubertad dependen de forma decisiva, de las acciones hormonales, particularmente de los esteroides sexuales, entre éstos, el estradiol; la influencia de CDE estrogénicos en el ambiente, juega un papel importante en la patogénesis de estos trastornos originados en la vida fetal y embrionaria^{10, 16, 19, 27, 34, 35} de manera que estos padecimientos son diversos, pues como ya se mencionó, y sus efectos dependen de la dosis y periodo de exposición. A causa de esto, para facilitar su visualización, han sido recabados, englobados y ordenados a manera de tabla los efectos fisiológicos más comunes de los CDE estrogénicos tanto en individuos expuestos directamente como a su descendencia en el cuadro 1^{5, 10, 19, 27, 34, 35}.

Cuadro1. Efectos fisiológicos de los CDE estrogénicos.

MUJERES		HOMBRES	
Expuestos	Descendencia	Expuestos	Descendencia
<ul style="list-style-type: none"> - Cáncer de mama - Endometriosis - Abortos por muerte embrionaria y fetal 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo peso en el nacimiento - Malformaciones en órganos reproductores - Hiperactividad y problemas de aprendizaje - Pubertad precoz - Mayor incidencia de diversos tipos de cáncer 	<ul style="list-style-type: none"> - Cáncer de testículo. -Cáncer de próstata. -Reducción en cuenta espermática. - disminución de niveles de testosterona - Alteraciones en las concentraciones de hormonas tiroideas 	<ul style="list-style-type: none"> - Criptorquidia - Bajo peso de nacimiento. - Hiperactividad y problemas de aprendizaje - Reducción de la cuenta espermática.

No obstante; conociendo la interacción entre los sistemas endócrino e inmune, existen muy pocos reportes acerca de los efectos de los CDE sobre el sistema inmune y más aún, ante los diversos retos antigénicos que pueden presentarse, como las infecciones por parásitos helmintos.

5. *Trichinella spiralis*.

Trichinella spiralis es un nemátodo filiforme dioico, es decir, que presenta organismos de cada sexo en individuos distintos de la misma especie^{9, 20}. Es propio de zonas geográficas templadas y presenta tres estadios: Las larvas recién nacidas que miden 120 µm de longitud por 7 µm, los parásitos adultos machos y hembras, éstas miden de 3 a 4 mm de longitud por 60 µm de diámetro y los primeros entre 1.4 mm a 1.6 mm de longitud por 40 µm de diámetro; el último estadio respecta a las larvas musculares que representan la etapa infectante del parásito^{9, 20, 45}.

La enfermedad producida por la infección con *T. spiralis*, es conocida como triquinelosis y afecta a mamíferos silvestres y domésticos; pero puede ser transmitida al hombre por ingestión de carne o productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, procedentes de animales infectados. La principal fuente de infección para el hombre es el cerdo^{8, 9, 20, 45}. Para entender cómo ocurre la infección y los estadios del parásito que comprende, primero se va a describir brevemente el ciclo de vida de *T. spiralis*.

5.1. *Ciclo de vida*

El ciclo de vida de *Trichinella spiralis*, consta de dos fases y cada una respecta al sitio anatómico donde ocurre la infección: la fase entérica, principalmente se lleva a cabo a nivel del intestino delgado y la fase sistémica, que ocurre a nivel del músculo esquelético, aunque puede presentarse en otros órganos y tejidos del organismo^{9, 20, 45}.

El ciclo comienza con la fase entérica, cuando el hospedero consume carne cruda o insuficientemente cocida que está contaminada con larvas musculares (LM); posteriormente, los jugos gástricos digieren la carne y las larvas musculares se liberan en el intestino delgado, penetran la mucosa intestinal y tras cuatro mudas de cutícula se convierten y diferencian en hembras y en machos adultos (Ad), después de dos a cuatro días^{8, 9, 20}. La cópula ocurre entre los parásitos

hembras y machos en el lumen intestinal; las hembras fecundadas liberan a las larvas recién nacidas (LRN) y éstas penetran en la lámina propia del intestino y alcanzan a través de los capilares linfáticos y venosos la circulación general, diseminándose por todo el organismo pero enquistándose sólo en el músculo esquelético; sin embargo, pueden infectar otros tejidos y órganos como SNC o corazón^{9, 20, 45}. Las larvas se introducen en el interior de las fibras musculares, destruyéndolas parcialmente e iniciando la formación de la célula nodriza; ésta es una estructura que permite al parásito adquirir nutrientes y exportar desechos a través de una red de vénulas, su formación dura aproximadamente veinte días, después de los cuales, la LM que se ha desarrollado es infectiva y con capacidad de ser transmitida a otro hospedero, reiniciando el ciclo^{8, 9, 20, 45}. Ver figura 12.

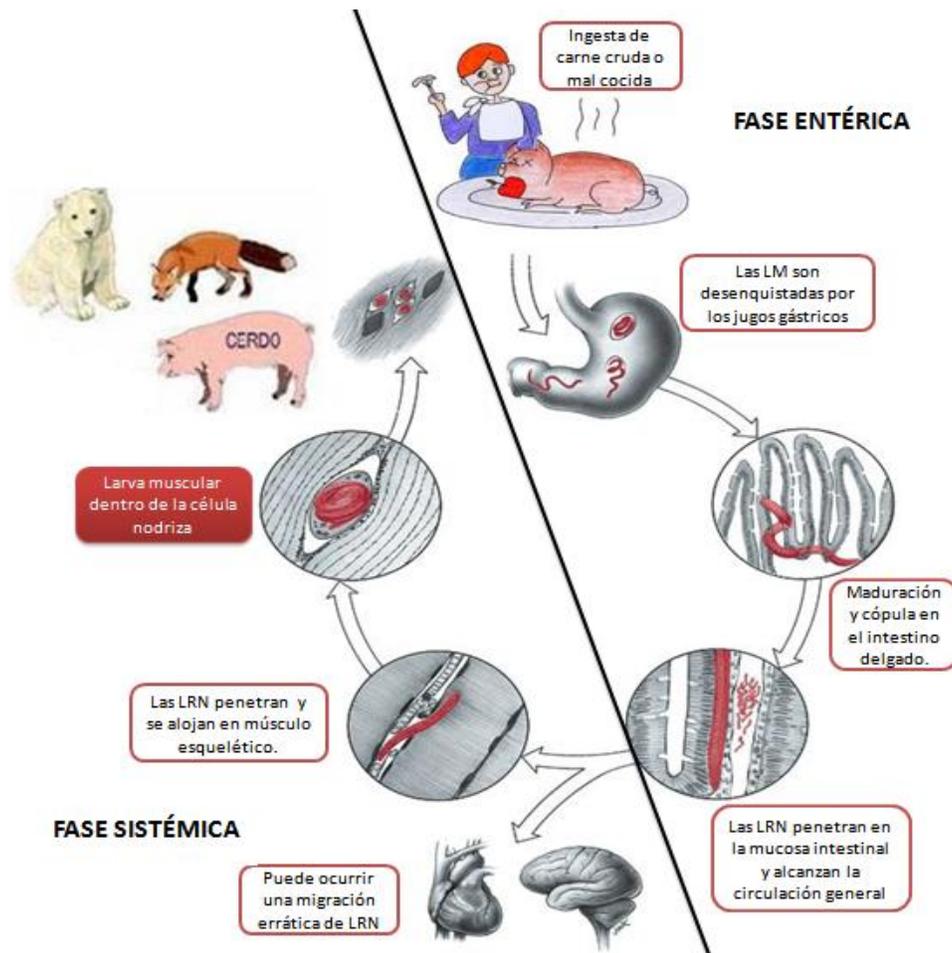


Figura 12. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. El recuadro rojo hace referencia a la fase infectiva del parásito. Modificada de <http://www.trichinella.org>.

5.2. Aspectos clínicos

La severidad de los síntomas de la triquinosis es variable y depende factores como la carga parasitaria o número de larvas ingeridas, edad, estado nutricional, tejido invadido y de forma considerable para este estudio, el sexo y estados hormonal e inmunológico^{8, 9}; pese a esto, se ha estimado que la dosis mínima infectiva que provoca una enfermedad sintomática es de 70 a 150 LM²⁰. Así mismo, los síntomas presentados en cada fase de infección del parásito, así como el diagnóstico y tratamiento pueden diferir; de tal forma que se han sintetizado en el cuadro 2^{8, 9, 20, 45}.

Cuadro 2. Aspectos clínicos de la triquinosis

		Síntomas	Diagnóstico	Tratamiento.
Fase entérica		<ul style="list-style-type: none"> • Diarrea • Dolor abdominal • Anorexia • Náusea • Vómito 	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico diferencial • Examen CPS para presencia de parásitos adultos. • Aspiración duodenal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mebendazol • Albendazol • Tiabendazol
Fase sistémica	Músculo esquelético	<ul style="list-style-type: none"> • Fatiga • Mialgias • Astenia y adinamia • Cefalea • Edema facial, periorbitario y de manos • Fiebre • Eosinofilia 	<ul style="list-style-type: none"> • Eosinofilia del 5-50%, leucocitos de 12-15 mil. • Valores elevados de DHL, CPK. • ELISA, IDR. • Triquinoscopia. 	<p>No existe un tratamiento específico pero pueden utilizarse antipiréticos y analgésicos para mitigar los síntomas.</p>
	En otros tejidos	<ul style="list-style-type: none"> • Neurotriquinosis • Miocarditis • Invasión en diafragma y riñones. 		

5.3. Epidemiología y distribución geográfica.

La triquinelosis es actualmente considerada como una antropozoonosis que se distribuye en todo el mundo y dado que el parásito *Trichinella spiralis* infecta una amplia variedad de especies de animales domésticos y al hombre, se le atribuye una distribución cosmopolita^{8, 9, 20, 45}. La frecuencia varía según las regiones, siendo mayor en las zonas templadas. Se pueden considerar tres ciclos epidemiológicos: el silvestre, el doméstico y semidoméstico. En el primero intervienen los animales silvestres carnívoros, como osos, lobos, zorros, roedores, etc., y algunas aves depredadoras como la lechuza. El ciclo doméstico, afecta, en primer lugar, al cerdo, que se infecta al consumir carne de cerdos infectados por canibalismo o desperdicios de carne de cerdo o de rata contaminada. El ciclo semidoméstico afecta a perros, gatos, ratas, etc., estos animales se infectan al ingerir carne de cerdo infectada⁹. La figura 13 ilustra la distribución geográfica de *Trichinella spiralis* a nivel mundial⁴⁵ y la figura 14 en México⁹.

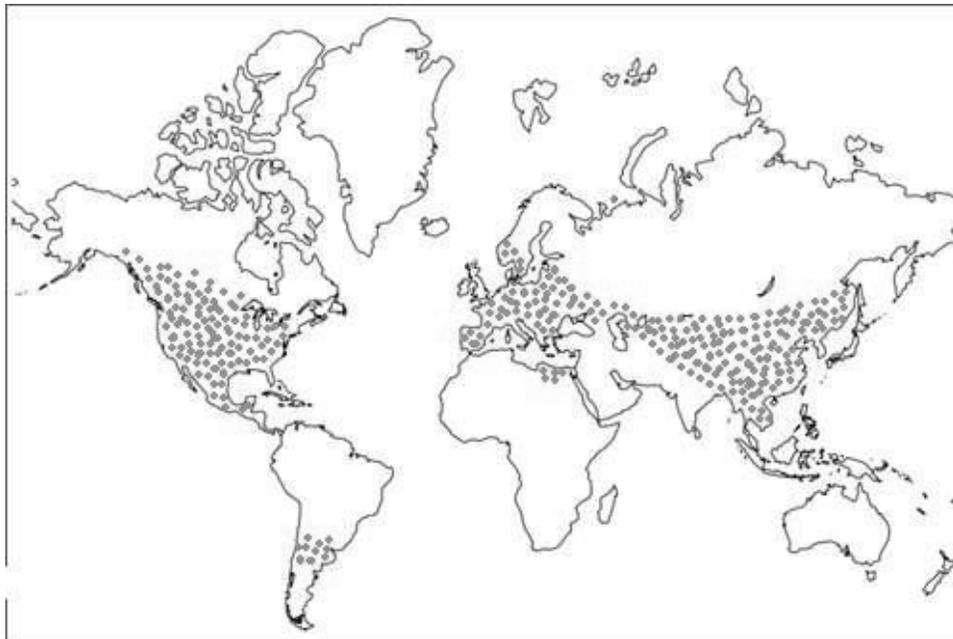


Figura 13. Distribución mundial de *Trichinella spiralis*. Modificada de <http://www.trichinella.org>.



Figura 14. Distribución en México de *Trichinella spiralis*. Modificado de Chávez E. et. al. REDVET, VII(6) Junio/2006.

5.4. Respuesta inmune asociada a la fase entérica.

Un aspecto importante considerado para la elección del modelo de *Trichinella spiralis* como reto antigénico probado en este estudio, es el hecho de que existe mucho literatura disponible en relación a la respuesta inmune contra este parásito. Con base en esta información, se sabe que para su expulsión del intestino, están implicados componentes fisiológicos del sistema gastro-intestinal (GI), principalmente los que respectan a los cambios asociados al músculo liso y a las células caliciformes; ambas, reguladas por el sistema inmune. Así, la infección con *T. spiralis*, conduce a una enteropatía caracterizada por la hiperplasia de células caliciformes y una sobre-regulación de las mucinas Muc2, del tipo secretorio y Muc3, de membrana; además de la expresión del factor de trébol intestinal, ITF y a la hipercontractibilidad del músculo liso^{1, 24, 30}. Ver figura 15.

Las mucinas son los principales componentes macromoleculares del moco, el cual es sintetizado y secretado por las células caliciformes durante la infección por *T. spiralis*²⁴, se ha encontrado una hiperplasia de estas células, ya que las mucinas pueden desalojar los parásitos establecidos o capturarlos en el moco e inhibir su motilidad, expulsándolos del intestino²⁴. Las células caliciformes también producen ITF, un grupo de péptidos pequeños ricos en cisteína, los cuales facilitan el proceso de restitución endotelial después de una lesión²⁴.

En lo que respecta al sistema inmune, las células Th2 son importantes en la inmunidad protectora del hospedero contra la infección por diversos nemátodos, incluyendo a *T. spiralis*; este tipo de células, están caracterizadas por la expresión de citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13^{1, 24, 30}. De éstas, las que han demostrado ser trascendentes en la regulación de todo el mecanismo de protección, son IL-4 e IL-13, las cuales, comparten la cadena alfa del receptor a IL-4 y su unión a éste resulta en la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 6 (Stat6). Esta vía es imprescindible, ya que regula el desarrollo de la hiperplasia de células caliciformes en el intestino y aumenta su proliferación^{1, 24, 30}.

Además de los cambios en la función de células caliciformes y de la producción de mucina, la fase intestinal de la infección por *T. spiralis* es acompañada de un aumento en la contractibilidad intestinal y en la modulación de este proceso, también está implicada la vía Stat6 activada por IL-4 e IL-13^{1, 24}. Por otra parte, se reconoce que la interacción entre CD40L en las células presentadoras de antígeno y CD40 de células T, es un evento importante en el inicio de la generación de la respuesta tipo Th2 y en el desarrollo de la hipercontractibilidad durante la infección^{24, 30}. Aunque es requerida una respuesta inicial tipo Th2 para los cambios neuromusculares asociados a la respuesta protectora durante la infección, ésta no es requerida para el mantenimiento de estos cambios post-infección; sino que la persistencia de este estado es mantenida por mediadores producidos por las células del músculo intestinal como TGF- β , prostaglandinas y estradiol²⁴.

Al igual que las células T, otras células como las cebadas, las intestinales de Cajal (ICC) y las enteroendócrinas (EE) en la mucosa intestinal tienen importancia en el desarrollo de la hipercontractibilidad²⁴. Por una parte, las ICC regulan la actividad mioeléctrica de ondas lentas y es importante en el control de la actividad motora propulsiva en el intestino delgado; por otra parte, las EE son células especializadas que liberan varios compuestos activos en respuesta a estímulos químicos y mecánicos en el epitelio intestinal. Las EE mejor caracterizadas son las células enterocromafines, EC, o de Kulchitsky, las cuales sintetizan y liberan serotonina, que es una molécula importante en la señalización de los procesos fisiológicos motores y de secreción en el intestino. Las células EC están localizadas en la proximidad cercana a las terminaciones nerviosas sensoriales y a las neuronas sinápticas inhibitorias y excitatorias. Un incremento en el número de células EC ha sido observado en las infecciones por nemátodos, particularmente por *T. spiralis*²⁴.

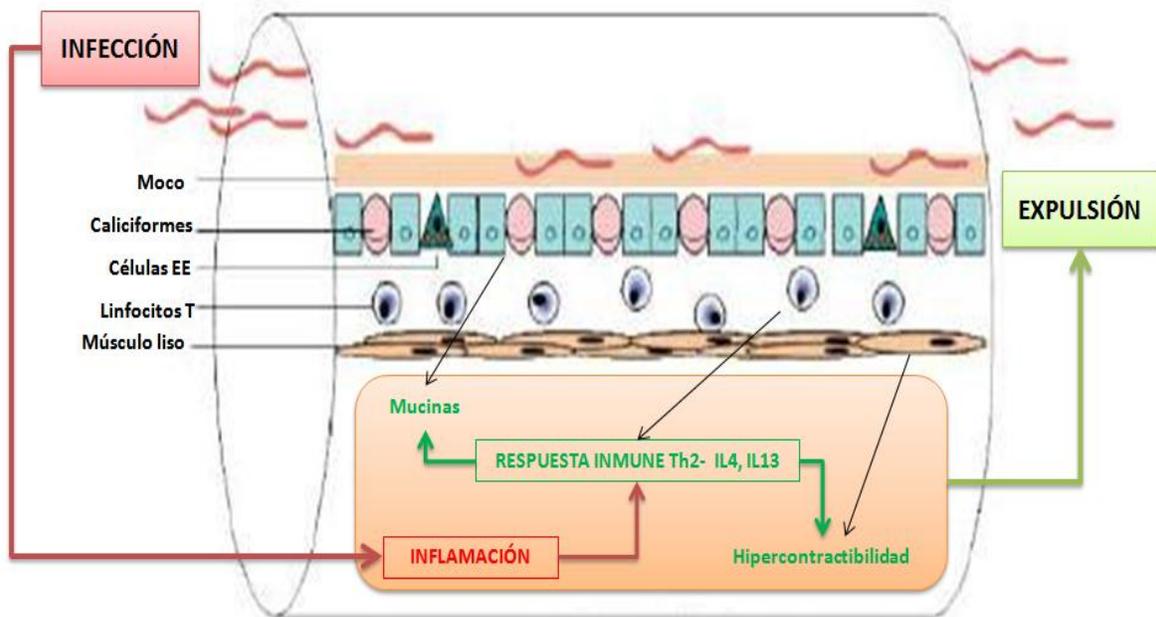


Figura 15. Respuesta inmune protectora contra *Trichinella spiralis*. En verde se representan los procesos que son estimulados debido a la infección por el nematodo, en rojo, son remarcados los procesos que causan estos cambios. Modificada de Khan W. y Collins S. *Parasite Immunology* 26, 2004.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la creciente incidencia de enfermedades metabólicas, obesidad y cáncer en tejidos relacionados directamente con la actividad endócrina tanto en hombres como en mujeres y partiendo del hecho de que la exposición a diversos factores ambientales durante periodos críticos de desarrollo puede alterar irreversiblemente la diferenciación celular, modificando la función de los sistemas fisiológicos en desarrollo; así como de que el sistema inmune es susceptible a la acción de los estrógenos, la exposición a CDE del tipo estrogénico podría representar alteraciones en la activación de la respuesta inmune.

Hasta ahora, el estudio de las alteraciones ocasionadas por los CDE sobre la respuesta inmune no se ha documentado ampliamente. No obstante, nuestro grupo ha observado que ratones tratados con una sola dosis de 17β -estradiol en el periodo neonatal, muestran resistencia a la cisticercosis con *Taenia crassiceps*, Esta resistencia está asociada con un incremento en la respuesta inmune celular en hembras, caracterizada por altos niveles de IFN- γ en suero, mientras que en los machos es la IL-4 la que se asocia a la protección. Estos resultados indican que el sistema inmune es susceptible al ambiente endócrino desde el periodo neonatal; por lo tanto, la exposición a diferentes hormonas, particularmente a los estrógenos, podría establecer las diferencias en la respuesta inmune activada ante un reto antigénico.

JUSTIFICACIÓN

Se han estudiado ampliamente los efectos de los CDE sobre el sistema reproductor y su implicación en el desarrollo de enfermedades en las que intervienen los ejes neuroendócrinos. Así, diversos estudios reportan que los CDE tienen la capacidad de modificar la diferenciación celular de los sistemas en desarrollo, originando cambios en la función de órganos y sistemas, programando a los individuos expuestos hacia la susceptibilidad de diversas enfermedades. Pese a lo anterior, muy poco se ha investigado acerca de los efectos que pudiera tener la exposición a CDE sobre el sistema inmune y dado que éste es imprescindible para mantener la salud de los organismos y debido a su interacción y co-dependencia con el sistema neuroendócrino, es necesario el estudio de la posible influencia de la exposición a CDE durante el desarrollo neonatal. El 17β -estradiol puede actuar como CDE estrogénico cuando es administrado durante un periodo crítico de desarrollo y a una dosis mayor a la producida de manera endógena.

HIPÓTESIS

La administración de 17β -estradiol a ratones neonatos va a influir sobre la respuesta inmune que presentan los individuos adultos durante la infección entérica con *Trichinella spiralis*, modificando su susceptibilidad.

OBJETIVOS

1. *Objetivo general.*

- Identificar si la administración neonatal de 17β -estradiol influye sobre la respuesta inmune durante la infección entérica con *Trichinella spiralis* en ratones hembras y machos adultos.

2. *Objetivos particulares.*

- Observar si existe un efecto en la susceptibilidad a la infección entérica con *T. spiralis* debido a la exposición neonatal con 17β -estradiol mediante la cuenta del número de parásitos intestinales obtenidos de los grupos experimentales tanto en hembras como en machos.
- Analizar por citometría de flujo las diferencias porcentuales en las poblaciones celulares CD3+, CD4+ y CD8+ en timo.
- Determinar, por citometría de flujo las diferencias en los porcentajes de las células CD3+, CD4+, CD8+, NKs y Macrófagos en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de entre los grupos tratados y controles.
- Examinar mediante la tinción con hematoxilina-eosina las diferencias tisulares en cuanto a integridad, morfología e infiltrado inflamatorio en intestino entre los grupos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Obtención de grupos de animales experimentales.*

Los diferentes grupos de animales en experimentación se obtuvieron a partir de una a dos hembras preñadas con quince a dieciocho días de gestación, las cuales fueron expedidas por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, sede del circuito escolar, bajo la aprobación de un protocolo de que cumple con el manejo ético de animales en experimentación. Se utilizaron ratones exogámicos de la cepa CD-1, para visualizar ampliamente la gama de posibles efectos de la exposición a 17β -estradiol en individuos con diferente fondo genético. Las hembras gestantes se mantuvieron en el mismo bioterio y se sometieron a observación hasta conocer la fecha exacta del nacimiento de las crías.

2. *Administración de 17β -estradiol.*

Al cumplir cuatro días de nacimiento, a los animales de cada camada se les determinó el sexo y fueron separados de acuerdo a éste y por grupos tratados o sin tratamiento con diferentes progenitoras. Posteriormente, se les administró una única dosis de 5 μ g de 17β -estradiol o su vehículo, aceite de maíz, en 50 μ L por vía subcutánea utilizando una jeringa de 1 mL y aguja de calibre 24 – 27G (0.6 mm), en el lomo de cada animal.

3. *Mantenimiento del ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.*

Los parásitos de *Trichinella spiralis* de la cepa CHN se mantuvieron en ratones BALB/c mediante infecciones sucesivas. Para ello, la carcasa de los ratones previamente infectados con larvas musculares (LM), durante al menos un mes, se digirió artificialmente. Se recuperaron las larvas, se cuantificaron y se infectaron los animales por vía intragástrica para mantener el ciclo.

4. *Obtención de larvas musculares de Trichinella spiralis.*

Los animales *Stock* que mantuvieron el ciclo del parásito, fueron sacrificados en la cámara de CO₂, se descartó piel y vísceras y únicamente la carne triturada se sometió a la digestión artificial empleando una disolución de pepsina y ácido clorhídrico, ambos al 1% con una relación de 100 mL de disolución por cada 10 g de carne durante tres horas a 37° C y agitación constante de 190 RPM. La solución de digestión se filtró para sedimentar las LM, se lavan con PBS 1X hasta eliminar cualquier residuo de la solución de digestión, se recuperaron las LM y se cuantificaron en un volumen de 50 µL al microscopio estereoscópico, repitiendo al menos, seis veces con resultados reproducibles hasta conocer la cantidad de LM en el volumen total de solución.

5. *Infección.*

Los ratones se infectaron vía intragástrica con 300 LM en PBS haciendo uso de una cánula de plástico estéril y una jeringa de 1 mL. La solución que contuvo a las LM fue agitada para evitar su sedimentación y posteriormente se tomó el volumen necesario que contiene la cantidad de larvas requeridas. Los animales fueron anestesiados por inhalación de *Sevorane* (dosis hasta efecto) previo a la infección.

6. *Sacrificio y obtención de tejidos*

El sacrificio de los animales se realizó por medio de la cámara de CO₂. Posteriormente, se obtuvieron los siguientes tejidos: timo, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e intestino. Los cuales, fueron inmediatamente puestos a 4° C en placas de cultivo de 24 pozos estériles con una solución de PBS 1x estéril y amortiguado a pH 7.4. Todo el procedimiento fue realizado bajo condiciones de asepsia. Al final de esta sección se presenta un diagrama que resume la estrategia experimental seguida para el desarrollo del estudio.

7. Cuenta de parásitos en intestino.

Después de tomar una muestra proximal de intestino delgado, éste fue lavado con PBS 1x a 37° C desechando la mayor parte de residuos de heces y después fue cortado en trozos pequeños y colocado en una coladera de plástico sobre un recipiente con PBS 1x hasta cubrir el tejido, se introdujo cada recipiente con el intestino de cada individuo en la estufa a 37°C para facilitar el movimiento y desprendimiento de los parásitos adultos. Después de tres horas, se llevaron a temperatura ambiente, se permitió sedimentar a los parásitos y luego fueron recuperados, lavados y cuantificados del mismo modo como se explicó en el número 4 de esta sección.

8. Procesamiento de duodeno para tinción con Hematoxilina-Eosina.

Una porción proximal del intestino delgado de aproximadamente 2 cm fue lavada con PBS 1x, posteriormente fue perfundida con PFA 4% en PBS 1x y amortiguado a pH 7.4, después se dividió en dos porciones, una de las cuales fue cortada longitudinalmente para exponer la mucosa y ambas porciones fueron guardadas en rejillas para histología y sumergidos en PFA 4% / PBS durante 24 horas. Después de esto, los tejidos se deshidrataron en un tren de alcoholes al 30%, 50%, 70% y alcohol absoluto, fueron aclarados en Xilol y se mantuvieron en parafina durante al menos 24 horas antes de ser colocarlos en el anillo de inclusión y parafina.

Los cortes histológicos se realizaron con navajas de bajo perfil en el micrótopo a 4 micras, se montaron en laminillas previamente tratadas con alcohol-ácido y una solución de poli lisina 1:10. Se desparafinaron en la estufa a 60° C y se procesaron en un tren con los reactivos para la tinción con hematoxilina-eosina: xilol, alcohol absoluto, alcohol al 70%, 50%, 30%, agua destilada, hematoxilina, agua corriente, hidróxido de amonio 0.5%, agua corriente, eosina, alcohol al 30%, 50%, 70%, alcohol absoluto y xilol, se fijaron con resina. Se observaron al microscopio a un aumento 10X, 20X y 40X.

9. Citometría de flujo.

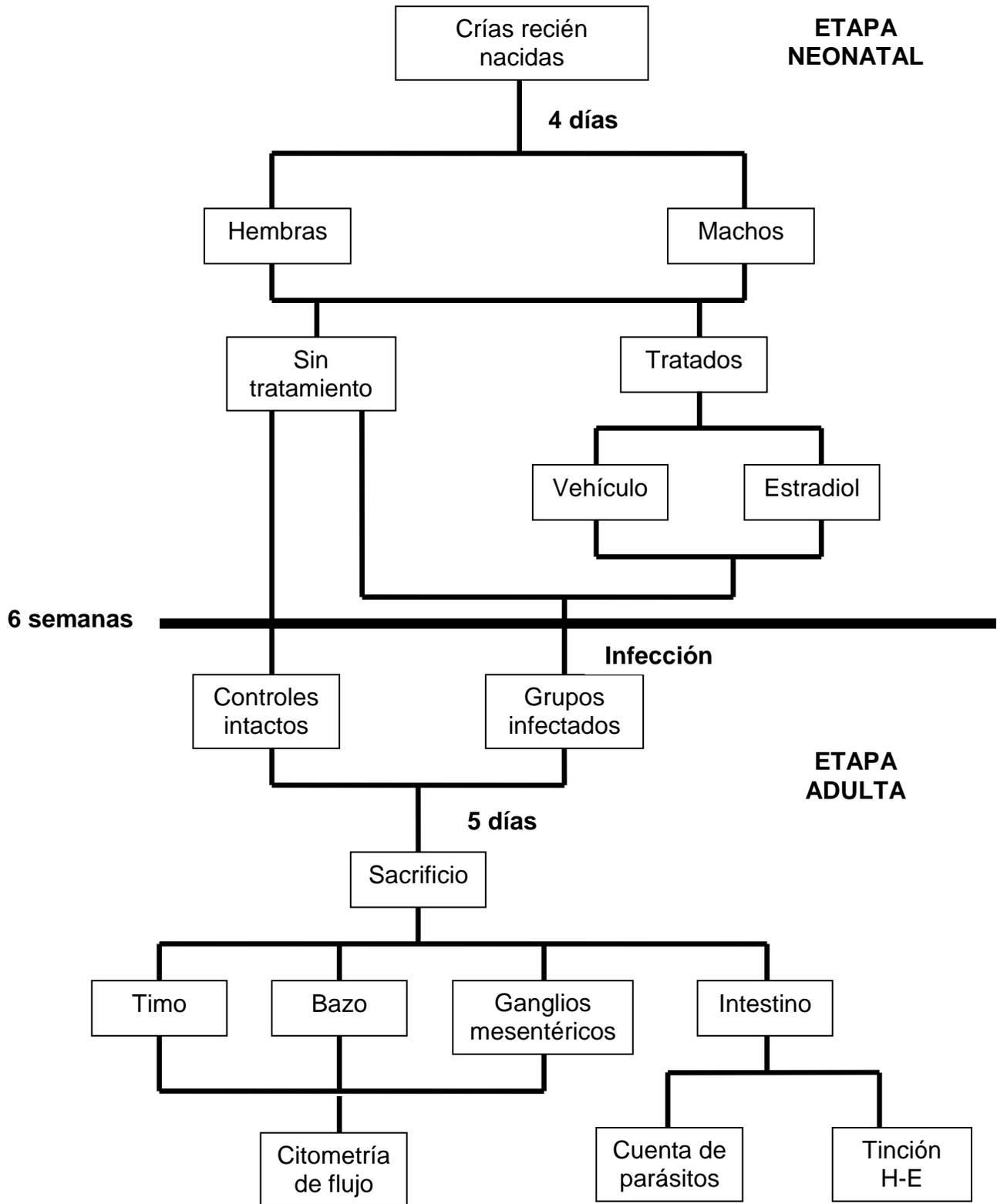
Los timos, bazos y ganglios linfáticos mesentéricos obtenidos se disgregaron con una malla de Nylon de 70 μm estéril y un émbolo de jeringa en PBS 1x amortiguado a pH 7.4 a 4° C. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 2000 RPM durante 5 minutos, se decantaron y agregaron 500 μL de solución de ACK para lisar los eritrocitos (sólo bazo y timo) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, después se les agregó 600 μL de buffer de FACS y se centrifugaron nuevamente a 2000 rpm durante 5 min. Se decantaron y resuspendieron en 500 μL de buffer de FACS para finalmente tomar 25 μL de cada muestra para la tinción.

La tinción se llevó a cabo con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD19 acoplados a ficoeritrina (PE), anti-CD8 y anti-CD3 acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) para timo, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, así como anti-Mac-3 (CD107b) para macrófagos acoplado a FITC y anti-CD244.2 para células NK acoplado a PE para bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. Después de realizar la tinción, las muestras se incubaron durante 30 min a 4° C en oscuridad, posteriormente se añadieron 150 μL de buffer de FACS, se centrifugaron a 2000 RPM durante 3 min, se decantaron, se resuspendieron en 100 μL de buffer de FACS y se les añadieron 100 μL de PFA 4% / PBS 1x pH 7.4. Las muestras se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta que se analizaron en el citómetro de flujo FACS Calibur con 10 000 eventos cada muestra.

10. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se muestran en gráficas de columnas de puntos señalando la media y el error estándar de la media y se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor (*one-way ANOVA*) y una comparación múltiple *a posteriori* de *Tukey* entre todos los grupos con un valor de $P < 0.05$ significativo; se utilizó el programa *GraphPad Prism* versión 5.0.

Diagrama que resume la estrategia experimental utilizada.



RESULTADOS

1. Carga parasitaria.

Efecto en la susceptibilidad a la infección entérica con *T. spiralis* debido a la exposición neonatal con 17β -estradiol mediante la cuenta del número de parásitos intestinales.

Los animales del grupo tratado con estradiol neonatalmente, tuvieron una disminución en el número de parásitos en intestino comparados con los grupos control de infección y vehículo. Además, no se encontró diferencia entre la carga parasitaria entre hembras y machos control. Así, los animales tratados con estradiol en la etapa neonatal son menos susceptibles a la infección entérica con *Trichinella spiralis* y la susceptibilidad a la infección asociada al sexo no se observa durante la fase entérica, es decir, tanto hembras como machos son igualmente susceptibles a la infección entérica con *T. spiralis*.

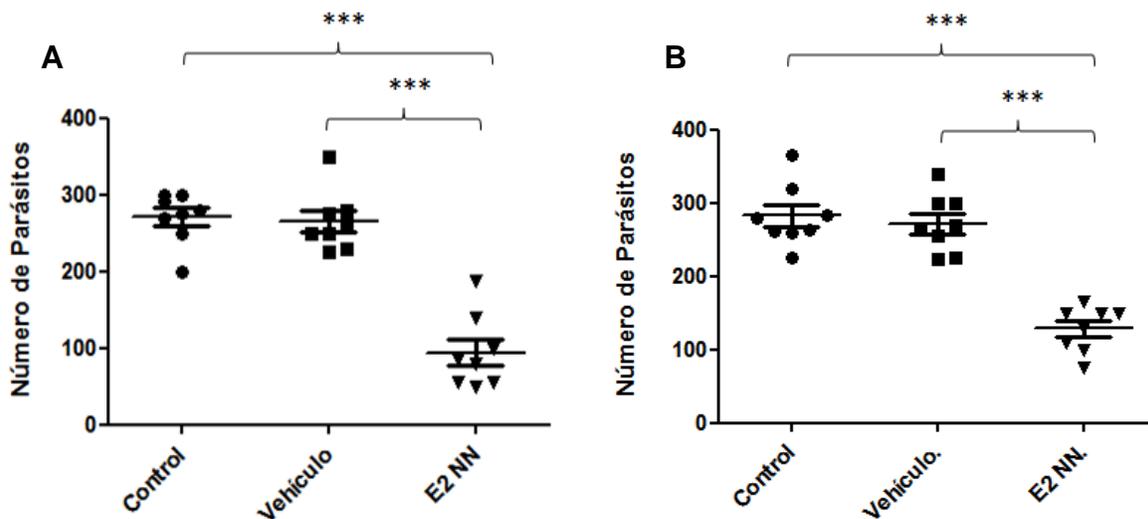


Figura 18. Cuenta del número de parásitos adultos de *Trichinella spiralis* en intestino. A. Carga parasitaria en hembras, B. Carga parasitaria en machos. Se observa un decremento en el número de parásitos en el intestino de los animales tratados con estradiol neonatalmente.

2. Citometría de Flujo.

Diferencias porcentuales en las poblaciones celulares CD3+, CD4+ y CD8+ en timo; en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de CD3+, CD4+, CD8+, NKs y Macrófagos.

POBLACIONES CELULARES EN TIMO

La población CD3⁺ tanto en hembras como en machos de los grupos tratados con estradiol, mostró un aumento en el porcentaje celular respecto al grupo control de infección y al grupo intacto. No hubo diferencia entre el grupo intacto y el control de infección; pero se observa un efecto por la administración del vehículo.

La población CD4⁺ no mostró diferencias significativas provocadas por el tratamiento o por la infección.

La población CD8⁺ está incrementada en los grupos tratados respecto al grupo de animales intactos y controles de infección. Se observa un efecto por la administración del vehículo.

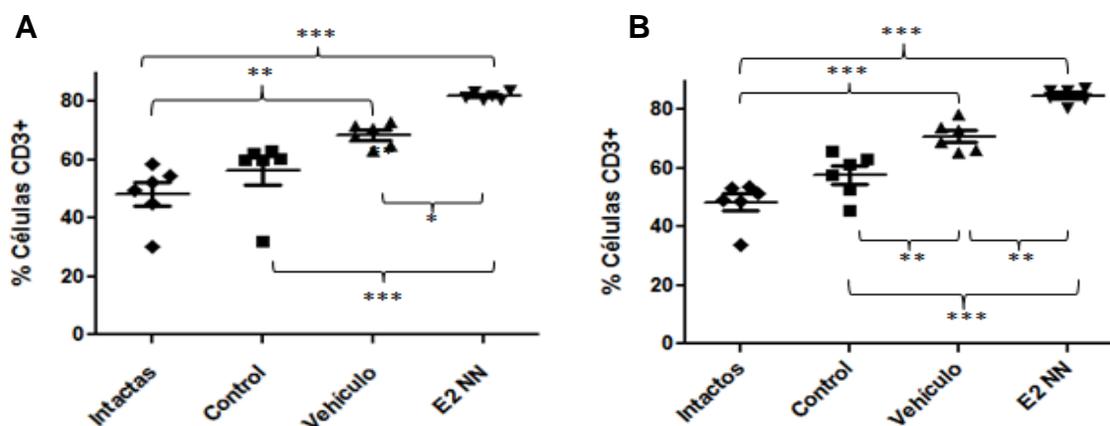


Figura 19. Porcentaje de células CD3⁺. A. Hembras, hay un aumento en los grupos tratados respecto a los intactos, así como entre animales estrogenizados respecto al control de infección. B. Machos, se observan las mismas diferencias que con las hembras, además presentan un aumento en el grupo administrado con el vehículo.

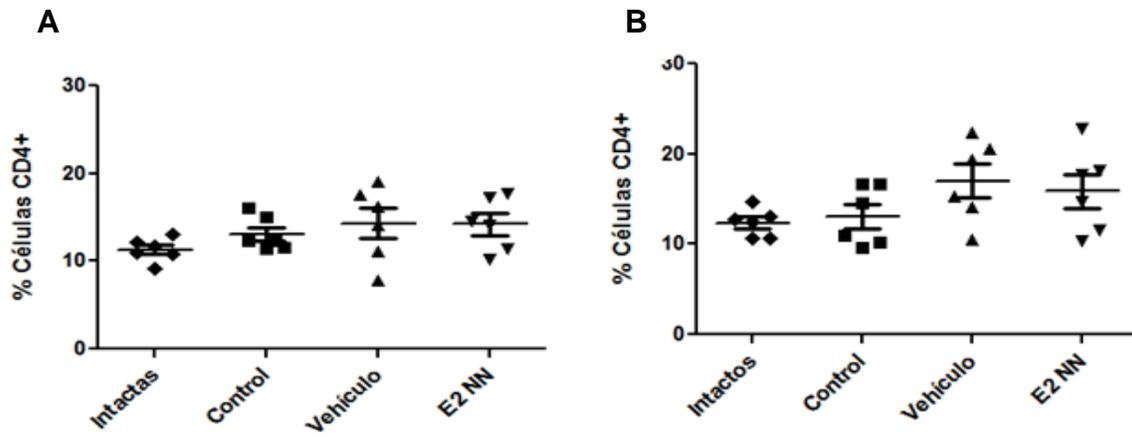


Figura 20. Porcentaje de células CD4⁺. A. Hembras. B. Machos. No hay diferencias significativas.

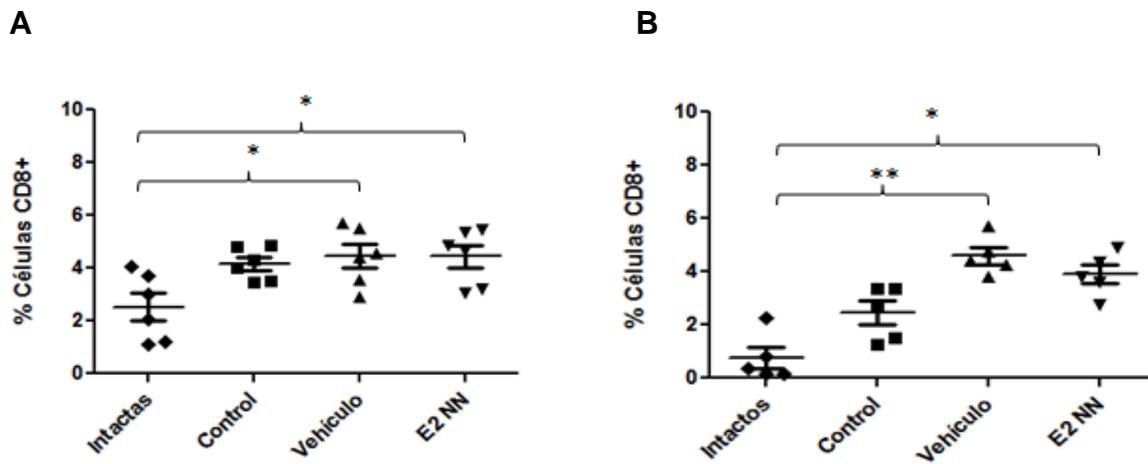


Figura 21. Porcentaje de células CD8⁺. Hubo un incremento de células en el grupo estrogenizado y tratado con vehículo respecto al grupo de intactos. Se observa un aumento no estadístico de células en todos los grupos de hembras y machos infectados respecto a los intactos. A. Hembras. B. Machos.

POBLACIONES CELULARES EN BAZO

La población CD3⁺ presenta un incremento porcentual en el grupo tratado con estradiol en hembras respecto al grupo intacto, no se observan diferencias entre el resto de los grupos en machos y hembras. Las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ no presentan diferencias significativas tanto en machos como en hembras para ningún grupo.

La población CD19⁺ está aumentada en todos los grupos infectados de machos y solamente en el grupo control de infección de hembras. No hay diferencias significativas en los grupos administrados con estradiol o su vehículo respecto al grupo intacto en hembras.

La población de células Mac3⁺ muestra un aumento en el porcentaje celular en todos los grupos infectados de hembras y machos, en éstos se observa un efecto por la administración de estradiol neonatal.

La población de NKs está incrementada en todos los grupos infectados de machos y hembras. No hay diferencias respecto al tratamiento con estradiol neonatal.

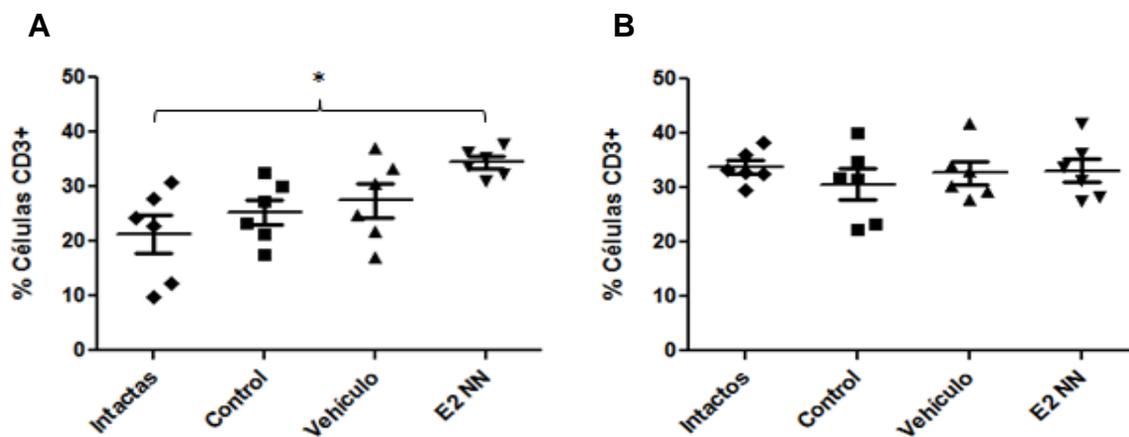


Figura 22. Porcentaje de células CD3⁺. A. Hembras, se observa un aumento en el grupo estrogenizado respecto al grupo de intactas. B. Machos, no hay diferencias significativas.

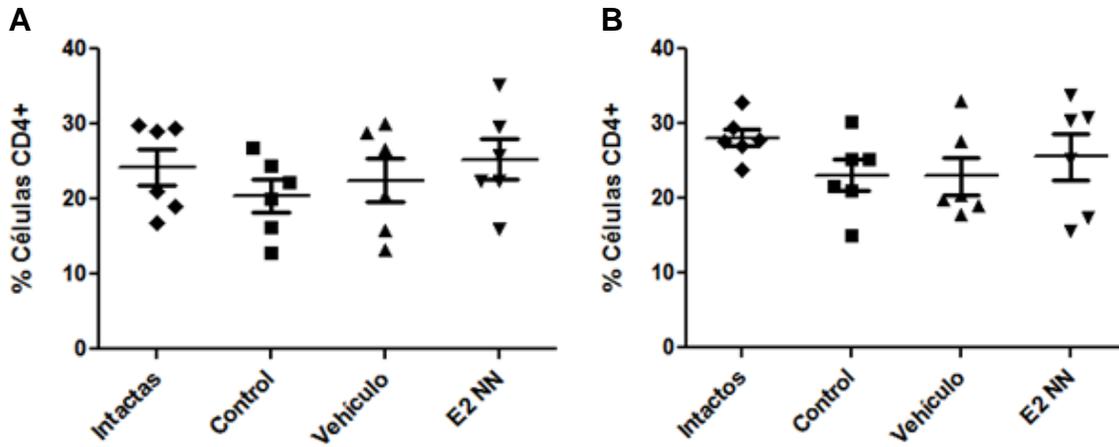


Figura 23. Porcentaje de células CD4⁺. A. Hembras. B. Machos. No hay diferencias significativas

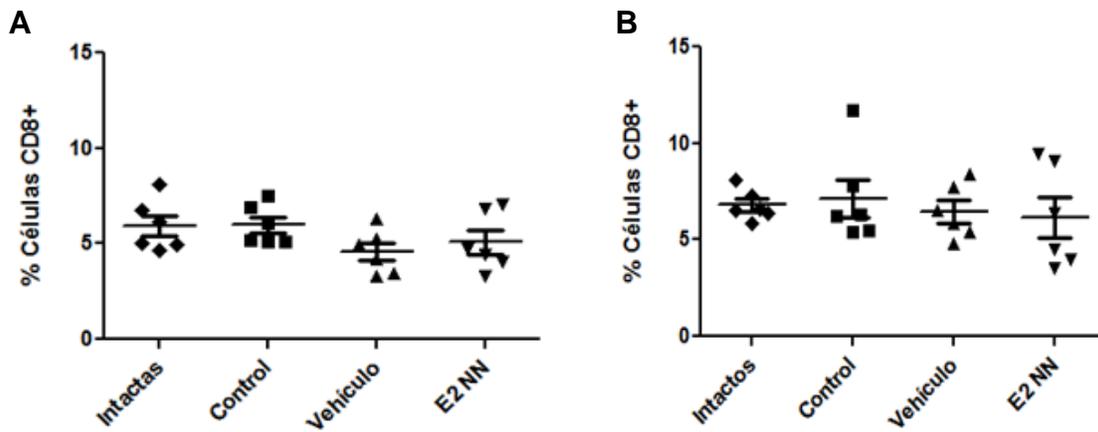


Figura 24. Porcentaje de células CD8⁺. A. Hembras. B. Machos. No hay diferencias significativas.

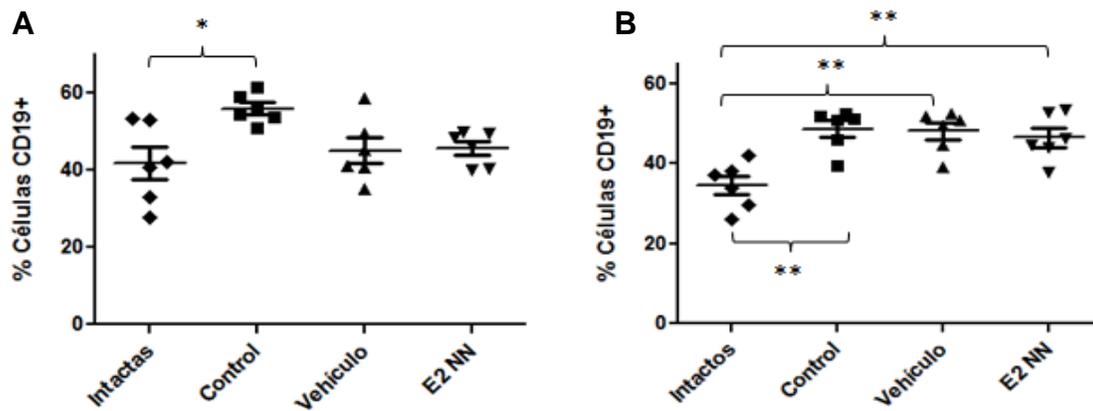


Figura 25. Porcentaje de células CD19⁺. A. Hembras, hay un aumento significativo en el grupo de animales control de infección. B. Machos, se evidencia un aumento de células en todos los grupos infectados.

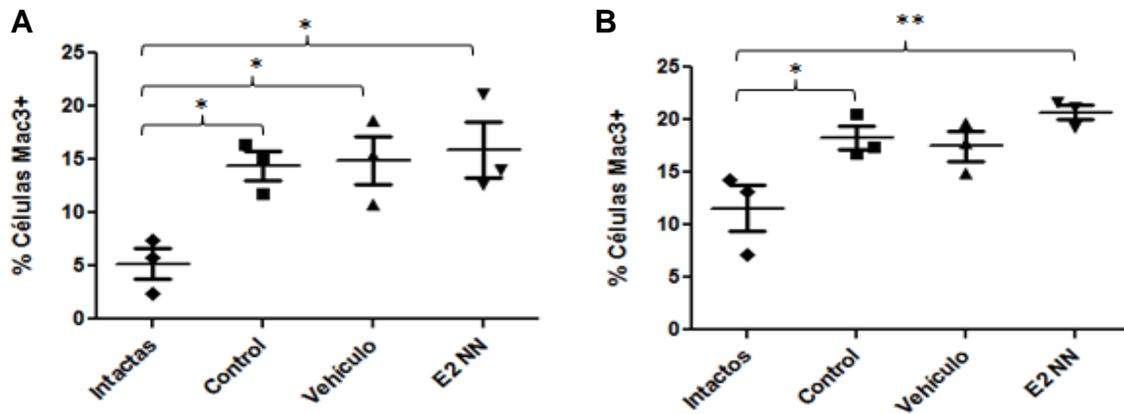


Figura 26. Porcentaje de células Mac3⁺. A. Hembras. B. Machos. Se presenta un aumento en el porcentaje de células en los grupos de animales hembras y machos infectados.

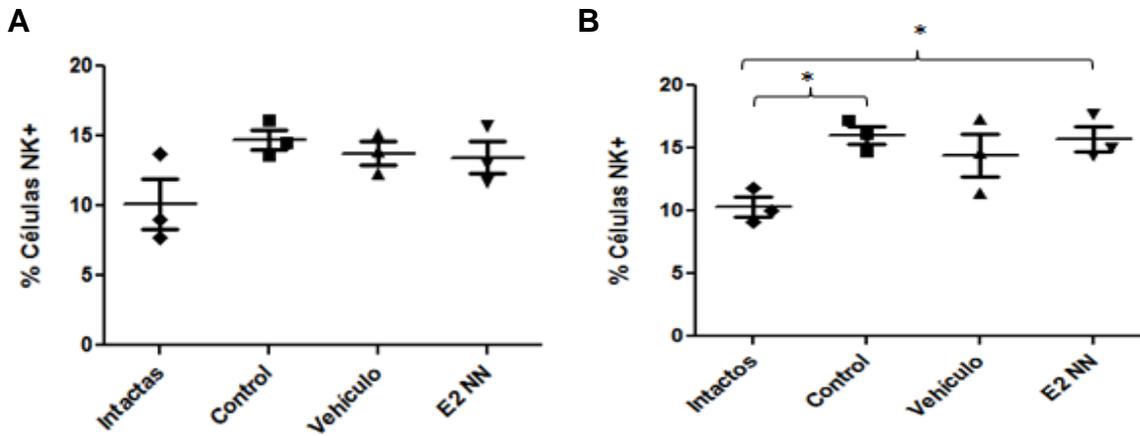


Figura 27. Porcentaje de células NK. A. Hembras, no hay diferencias significativas B. Machos. Se observa un aumento en el porcentaje de células en animales tratados con estradiol y control de infección.

POBLACIONES CELULARES EN GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.

La población CD3+ no tiene diferencia significativa entre los grupos experimentales en hembras y machos. La población CD4+ se observa aumentada en los grupos infectados de hembras, sin embargo, el aumento solo es significativo para el grupo administrado con el vehículo. No hay diferencias en los grupos de machos.

La población CD8+ se observa aumentada en los grupos infectados de machos, sin embargo, el aumento es solo significativo para el grupo tratado con estradiol neonatalmente. No hay diferencias en los grupos de hembras.

La población CD19+ no muestra diferencias estadísticas; sin embargo, se puede observar un incremento no significativo en la población CD19+ en el grupo control de infección respecto al intacto, entre éste y los grupos tratados neonatalmente con estradiol o su vehículo no hay diferencias observables.

La población Mac3+ está incrementada en el grupo tratado con estradiol de hembras respecto a los demás controles, en machos se observa un incremento no significativo en todos los grupos infectados. No hay diferencias entre el control de infección, vehículo y control intacto de hembras.

La población de NKs está incrementada en el grupo control de infección tanto de hembras como de machos. No hay diferencias entre los grupos tratados y el control intacto de machos y está disminuida en los grupos tratados con estradiol o su vehículo para el caso de las hembras.

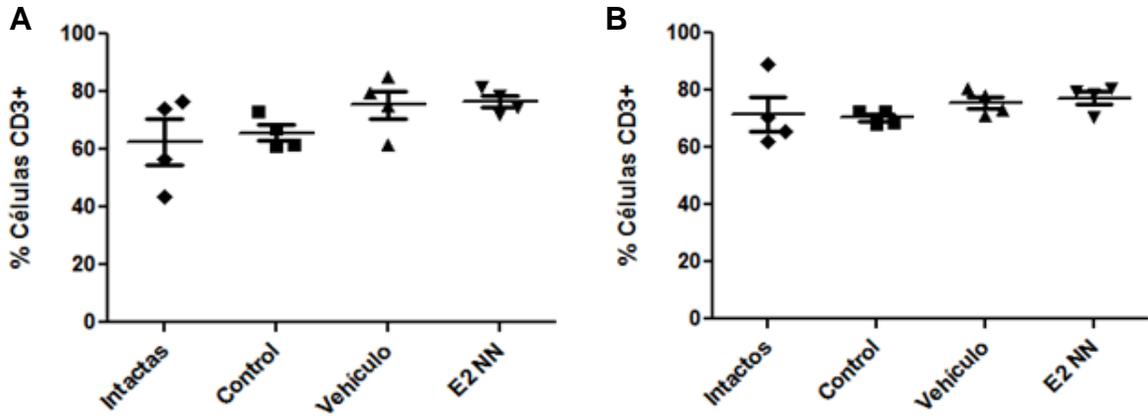


Figura 28. Porcentaje de células CD3⁺. A. Hembras. B. Machos. No hay diferencias significativas.

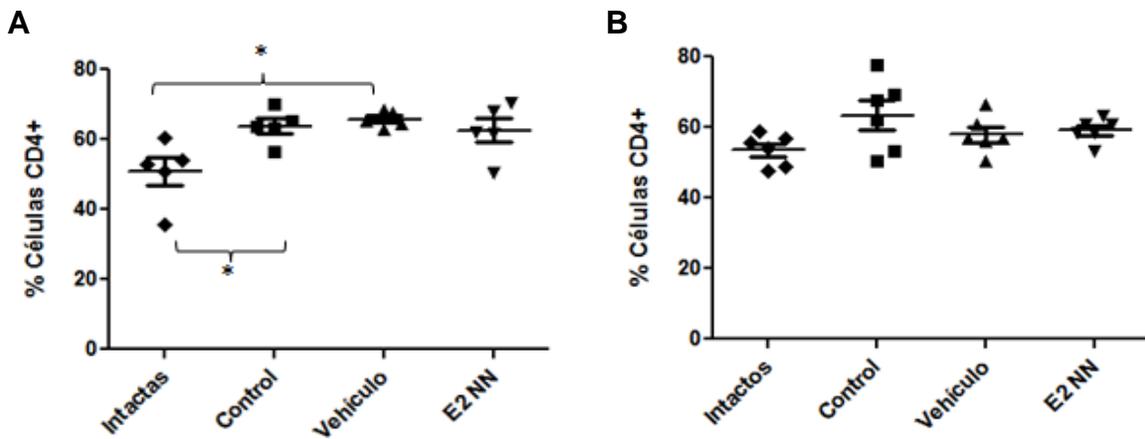


Figura 29. Porcentaje de células CD4⁺, hay un aumento en las células de los grupos control de infección y vehículo. A. Hembras. B. Machos, no hay diferencias significativas.

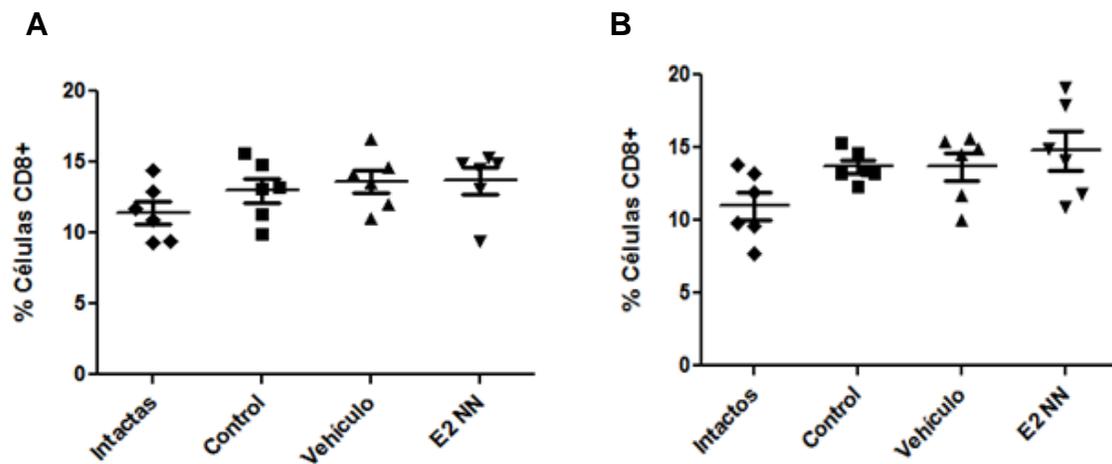


Figura 30. Porcentaje de células CD8⁺. A. Hembras. B. Machos, no hay diferencias significativas.

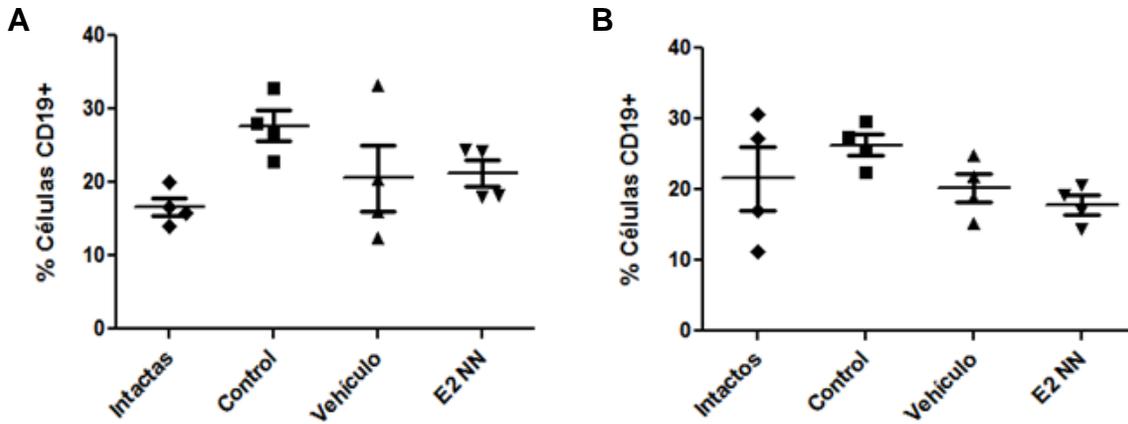


Figura 31. Porcentaje de células CD19⁺. A. Hembras. B. Machos. No hay diferencias significativas.

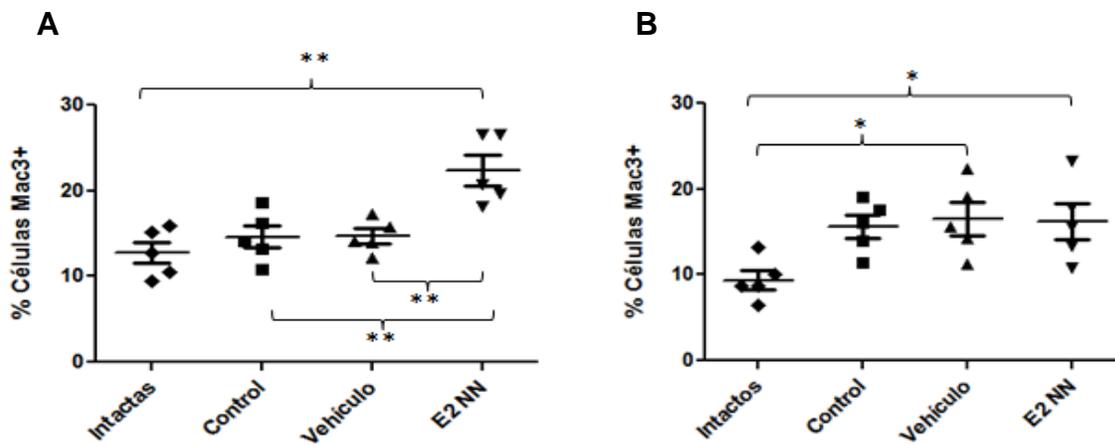


Figura 32. Porcentaje de células Mac3⁺. A. Hembras, se observa un aumento en el porcentaje de las células del grupo tratado con estradiol respecto al resto de los grupos. B. Machos, se observa un incremento en los grupos administrados con estradiol o su vehículo respecto al grupo intacto.

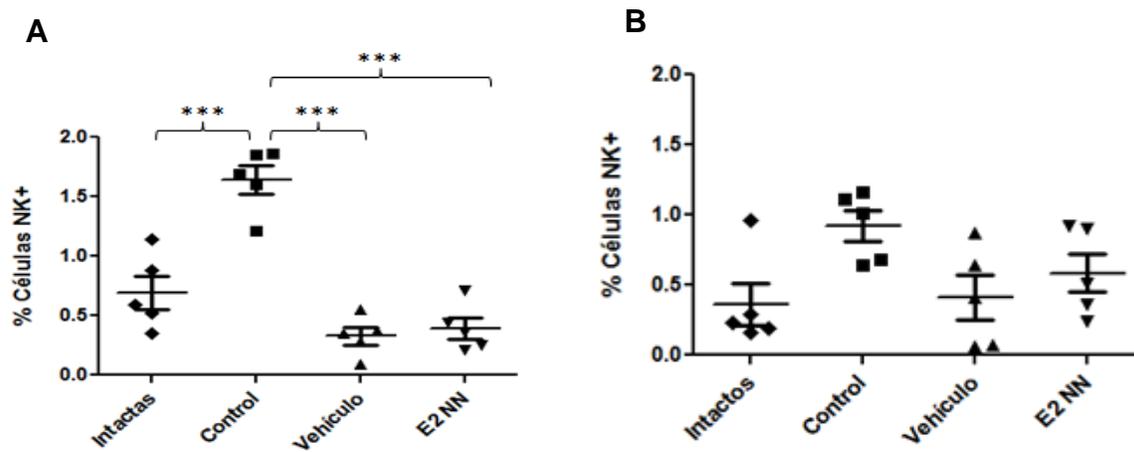
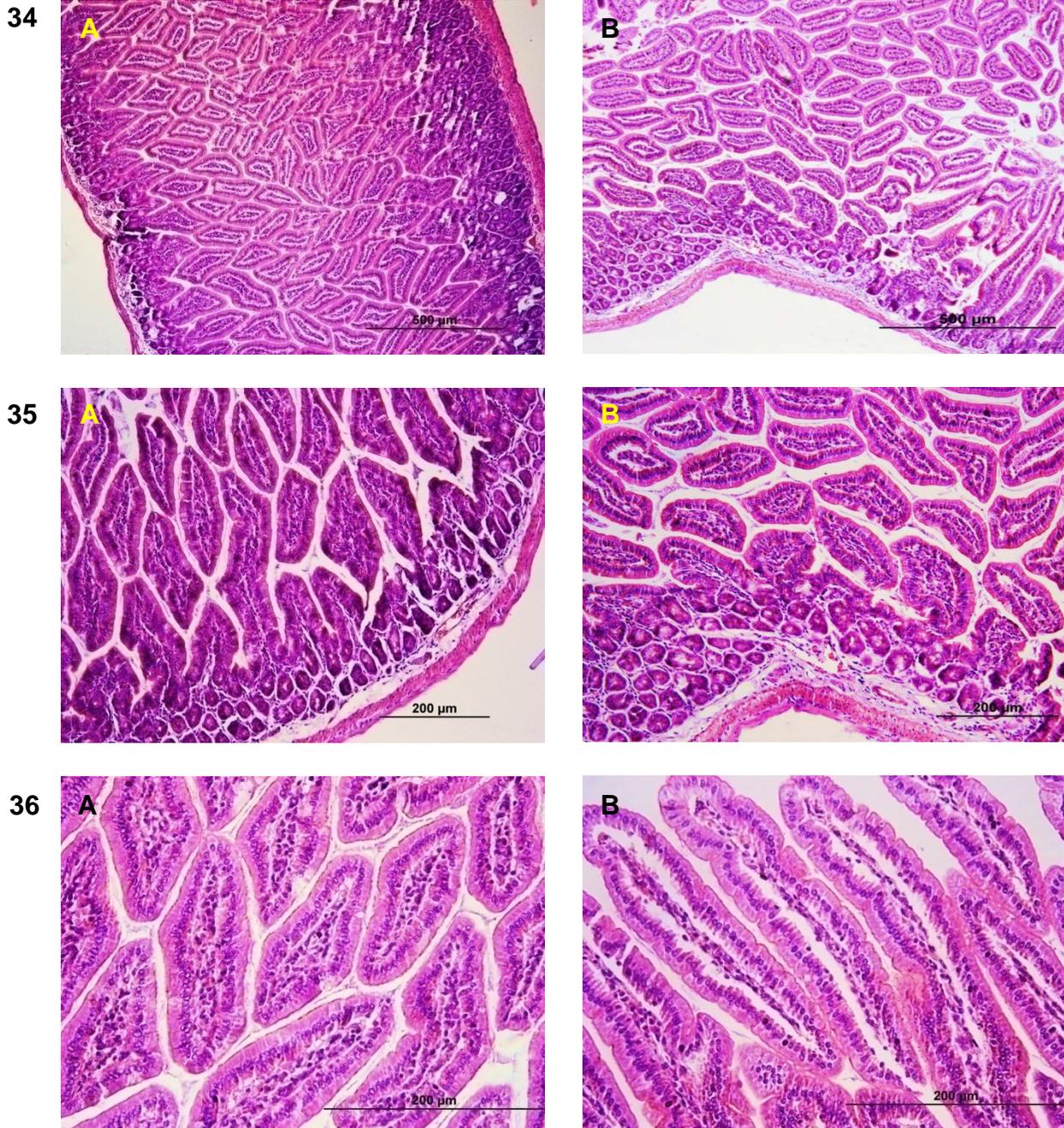


Figura 33. Porcentaje de células NK. A. Hembras, se presenta un aumento de células en el grupo control de infección B. Machos, no hay diferencias significativas.

3. Tinción con Hematoxilina-Eosina.

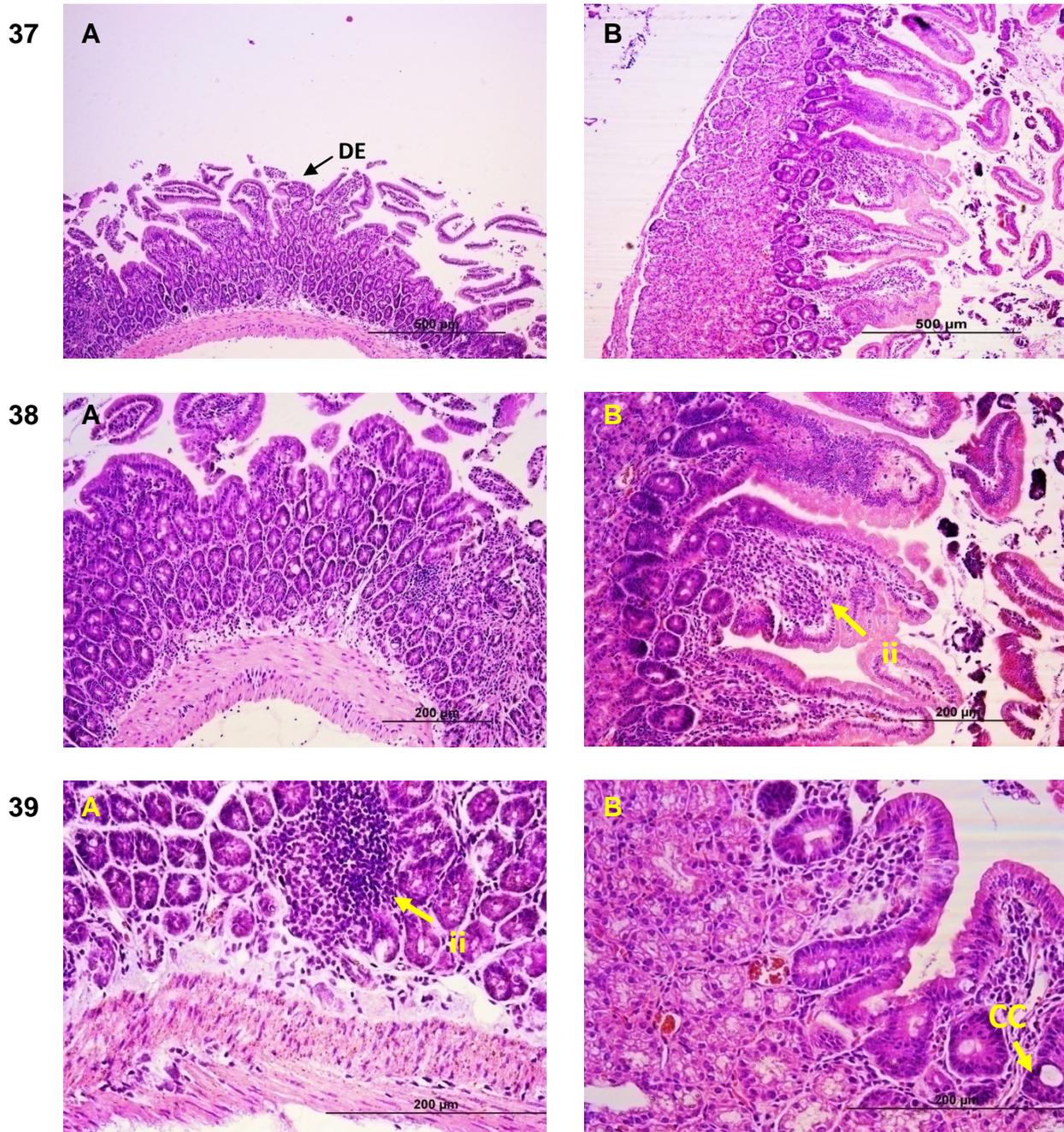
Exanimación de las diferencias tisulares en cuanto a integridad, morfología e infiltrado inflamatorio en intestino entre los grupos experimentales.

ANIMALES INTACTOS.



Figuras 34-36. Duodeno, corte longitudinal. A. Hembras B. Machos. 33 10x, 34 20x, 35 40x. El tejido está íntegro. Se presentan pocas células caliciformes y la lámina propia presenta escaso infiltrado inflamatorio.

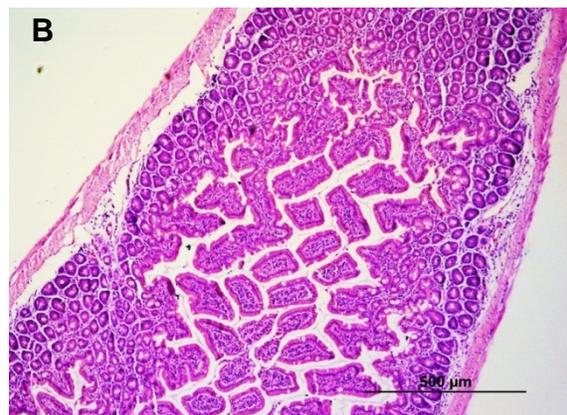
ANIMALES CONTROLES DE INFECCIÓN.



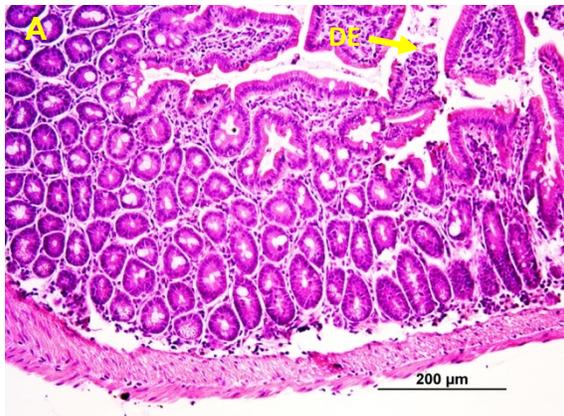
Figuras 37-39. Duodeno, corte transversal. A. Hembras B. Machos. 32 observada a 10x, 33 a 20x, 34 a 40x. Se observa una hipertrofia y desprendimiento del epitelio de las vellosidades, gran cantidad de infiltrado inflamatorio en la lámina propia y las células caliciformes de las criptas de Liberkühn presentan una hipertrofia. Las flechas señalan el infiltrado inflamatorio (ii), las células caliciformes (CC) y el desprendimiento del epitelio (DE).

ANIMALES ADMINISTRADOS CON EL VEHÍCULO.

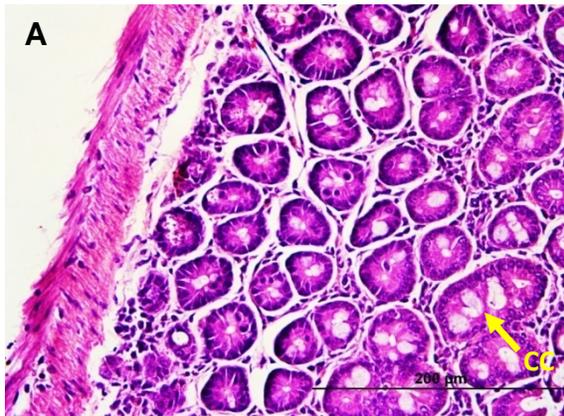
40



41



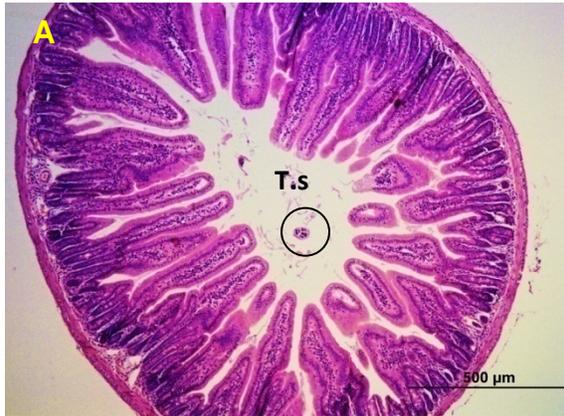
42



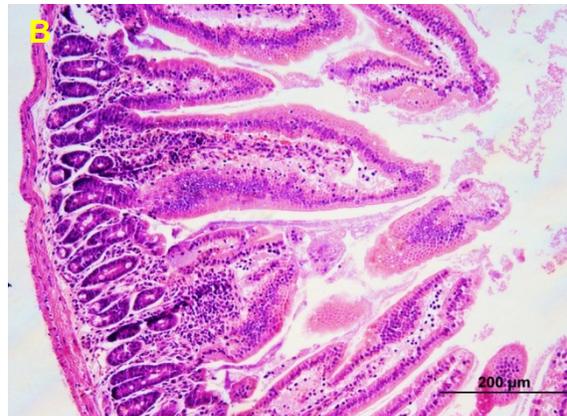
Figuras 40-42. Duodeno, corte longitudinal. A. Hembras B. Machos. 35 observada a 10x, 30 a 20x, 31 a 40x. El tejido presenta una hipertrofia de células caliciformes tanto en las criptas como en las vellosidades, así como mayor infiltrado inflamatorio, comparado con los controles intactos. Las flechas señalan a las células caliciformes (CC) tanto de crestas como de criptas; así como el desprendimiento del epitelio (DE).

ANIMALES TRADOS CON ESTRADIOL.

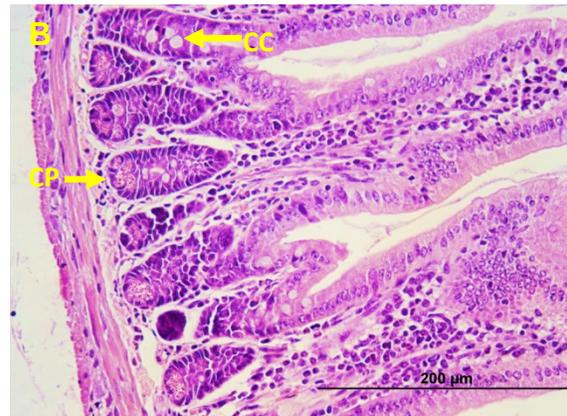
43



44



45



Figuras 43-45. Duodeno, corte transversal. A. Hembras B. Machos. 38 observado a 10x, 39 a 20x, 40 a 40x. Se observan cambios asociados a la infección: infiltrado inflamatorio en la lámina propia, hipertrofia de células calciformes (CC) tanto en las vellosidades como en las criptas. Hay un menor desprendimiento del epitelio y se observa un parásito de *Trichinella spiralis* (T.s) en el lumen intestinal. Este grupo presentó mayor afinidad a la eosina en los gránulos de las células de Paneth (CP), éstos se observan más densos, voluminosos y en mayor número que en el resto de los grupos.

DISCUSIÓN

Bajo condiciones de experimentación, diferentes estudios han demostrado que el estradiol ejerce efectos sobre el sistema inmune. También se conoce que diversas células del sistema inmune presentan receptores a estrógenos y por lo tanto, responden al microambiente estrogénico. Aunado a esto, se sabe que existen periodos en los que las células de los sistemas orgánicos son más susceptibles a los cambios en el microambiente, pues ocurre la diferenciación celular que dará origen a un fenotipo especializado, conformando así los diferentes tejidos en un organismo. Con base en ello, se planteó la hipótesis de que la administración de una sola dosis de estradiol a animales neonatos influiría sobre la respuesta inmune activada en los animales adultos ante un reto antigénico, éste fue la infección con el nemátodo *Trichinella spiralis* en la fase entérica.

Los resultados presentados demuestran que, efectivamente, el tratamiento neonatal con estradiol modifica la respuesta inmune en los animales adultos, dando lugar a una menor susceptibilidad a la infección, lo cual se hace evidente con la disminución en el número de parásitos recuperados del intestino de los animales tratados. Así mismo, que el sistema inmune en desarrollo, es susceptible a la exposición a un ambiente estrogénico, induciendo cambios irreversibles y prevalecientes en el fenotipo de sus células y con ello, también al tipo de respuesta que se activará ante la triquinelosis. Desde este punto de vista, los resultados pueden analizarse a través de dos vertientes: una endocrinológica y de la biología del desarrollo que explica los cambios inducidos por el estradiol en los animales; la segunda, desde un punto de vista inmunológico que de razón al hecho de que estos cambios promuevan una menor susceptibilidad a la infección.

Adicionalmente, la información aquí reportada hace patente una diferencia en el efecto producido por el tratamiento con estradiol en machos y hembras, en cuanto al análisis cuantitativo de las poblaciones celulares en timo, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, de modo que estos resultados no son indiferentes entre

sexos. El efecto por el tratamiento con estradiol no se observa en el análisis histológico del intestino, puesto que tanto en machos como en hembras se observan los mismos cambios, como son: infiltrado inflamatorio en la lámina propia de las vellosidades, hipertrofia de células caliciformes y de manera particular, para este grupo, un mayor número, tamaño y afinidad al colorante de los gránulos de las células de Paneth; además de observarse mucho más conservado el revestimiento del epitelio de las vellosidades.

Abordando el análisis de los resultados desde la endocrinología del desarrollo, que explica los cambios fenotípicos observados, es claro que la interacción del estradiol con sus receptores ocasiona estos cambios y aunque existe poca información disponible al respecto, se ha reportado que los receptores a estrógenos son expresados en células precursoras linfoides de manera diferencial y dependiente a la edad en ratones, de manera que en etapas perinatales, los efectos por esteroides sexuales son mínimos^{21, 22}; sin embargo, no se encontraron reportes acerca de la expresión de receptores a estrógenos en animales neonatos; entre ambas etapas existen marcadas diferencias, pues podría parecer que en la etapa prenatal los animales son protegidos por la placenta y presentan diversos mecanismos que los hacen insensibles al efecto de hormonas esteroides sexuales²².

De acuerdo con lo anterior, aún, si la expresión de los receptores fuera mínima, el hecho de que un grupo celular se encuentre en una etapa de diferenciación, lo hace muy sensible a los factores ambientales, así, el efecto del estradiol es más pronunciado que en las células ya desarrolladas de animales adultos o en las células de los animales *in utero*, protegidas por la barrera placentaria. No obstante, existen reportes en los que se ha probado el efecto de la exposición neonatal o prenatal a CDE estrogénicos, como el bisfenol A sobre la respuesta inmune ante diversos retos antigénicos^{2, 17, 41 42}. Interesantemente, los resultados demuestran que puede ocurrir una exacerbación de la respuesta tipo Th2, o de la tipo Th1 y en algunos casos, de ambas; esto se torna aún más complejo considerando que cada reporte examinado para este trabajo, utiliza diferentes

retos antigénicos; lo cual podría relacionar diferentes tipos de respuesta inmune promovidas por un mismo compuesto con actividad hormonal, para diferentes retos antigénicos.

Lo anterior, puede ser sustentado en el hecho, de que los efectos de los CDE o cualquier otro factor ambiental al que se expone un organismo durante un periodo crítico de desarrollo, no necesariamente ocurre de manera inmediata y que tampoco podría presentarse a menos que sea activado o inducido por un segundo estímulo o señal ambiental en la madurez; es decir, que se requerirían de dos señales ambientales para desencadenar determinado fenotipo en un individuo. Entonces, en este caso, la primera señal es la exposición neonatal a un ambiente estrogénico, que induce un cambio en la programación de las células del sistema inmune; la segunda señal, es la infección con *Trichinella spiralis per se*, o bien, alguna señal inducida en el sistema debido a la infección, pues es claro que la relación hospedero-parásito es bidireccional, por lo que el propio parásito también es capaz de inducir cambios en su hospedero para mejorar su invasividad¹³.

De manera global, los resultados hacen evidente que independientemente de la expresión de los receptores a estrógenos, un ambiente predominantemente estrogénico, induce cambios en la diferenciación, desarrollo y fenotipo de diversas células del sistema inmune, pero también en células responsables de la inmunidad innata, en las que este cambio fenotípico podría atribuirse más a modificaciones epigenéticas inducidas por la exposición, pues las células de la inmunidad innata tienen una secuencia genética altamente conservada.

Por otra parte, es menester tomar en cuenta dos cosas: que los cambios observados pueden deberse o al tratamiento por sí solo, o a la infección, o bien, ocurrir por una interacción entre ambos, como ya se ha explicado. Lo segundo, que el mecanismo por el cual el estradiol ejerce estos efectos, permanece desconocido, es decir, se sabe que interacciona con sus receptores en las células en desarrollo; no obstante, se desconoce qué mecanismos genómicos o no genómicos está llevando a cabo esta interacción y si estos cambios son

inmediatos o si permanecen inadvertidos hasta la madurez, siendo inducidos por una segunda señal externa, de acuerdo a lo que se expuso en los antecedentes.

Pese a estas limitaciones, con los resultados que se tienen, se puede realizar un análisis desde el punto de vista inmunológico para explicar cómo es que los cambios inducidos promueven una respuesta inmune protectora contra la infección, pues el resultado final sería el aumento o disminución de diversas células en los órganos del sistema inmune, pero también, como se encontró en este estudio, en otros tejidos que en apariencia, también podrían ser sensibles a los estrógenos, como lo es el intestino delgado, siendo que mostró diferencias en las célula de Paneth, también consideradas células del sistema inmune innato en la mucosa intestinal. Esto podría deberse a que en ratones y en ratas, las criptas se forman después del nacimiento⁴, lo cual hace más sensible a este tejido en desarrollo al ambiente.

Respecto a las diferencias cuantitativas en las poblaciones celulares analizadas, se tiene que únicamente por efecto de la infección, es decir, sin mostrar cambios en atribuidos al tratamiento, tanto en bazo como en ganglios linfáticos mesentéricos se presentaron aumentos en las poblaciones celulares de ganglios mesentéricos en hembras de linfocitos CD4 y en machos de macrófagos. En bazo, las poblaciones de macrófagos, células NK en ambos sexos y de linfocitos B (CD19) solamente en machos. Estos resultados muestran que la respuesta inmune contra *T. spiralis* en la fase entérica, ocurre de manera dimórfica, es decir, es diferente es diferente en hembras y machos, aunque la susceptibilidad a la infección no presente este dimorfismo, lo cual hace pensar, que a pesar de que la respuesta inmune se lleva a cabo por vías diferentes en hembras y machos, es igualmente eficiente en la expulsión y defensa contra el parásito.

Las diferencias anteriormente reportadas, dan cuenta que durante la infección, los macrófagos juegan un papel predominante, principalmente en machos, esto se debe al papel que juegan los macrófagos en la activación de la respuesta inmune adaptativa, pues después de ser activados por antígenos solubles del parásito, deben migrar a diversos órganos linfoides para llevar a cabo la presentación de

antígeno. Por otro lado, los resultados muestran que las células NK están aumentadas en bazo y en ganglios linfáticos mesentéricos en los controles de infección en ambos sexos; estas células son importantes en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, del mismo modo que los eosinófilos y neutrófilos, los cuales han demostrado llevar a cabo in vitro, la destrucción mediada por células de helmintos²⁵. Por otro lado, las hembras muestran un mayor porcentaje de linfocitos CD4 en ganglios linfáticos mesentéricos, mientras que los machos aumentan el número de macrófagos, lo cual podría dar cuenta que mientras que las hembras llevan a cabo de manera más rápida y efectiva la presentación antigénica y pronta participación de células Th, los machos parecen presentar una respuesta inmune adaptativa más lenta, dado que en bazo se encuentran aumentados tanto los macrófagos, como los linfocitos B; dos tipos de células presentadoras de antígeno.

En cuanto a las poblaciones celulares que presentaron un efecto numérico debido al tratamiento; obtuvimos, de manera interesante, que en algunas poblaciones, la administración del vehículo también ejercía efecto; esto puede ser posible debido al grado de sensibilidad con el que responden diferentes células durante determinado estado de desarrollo. Esto ocurrió en las células CD3 de timo para ambos sexos, las cuales aumentaban con la infección y con el tratamiento; sin embargo en cuanto a células CD4 no hubo modificación alguna, pero sí hubo un aumento en el porcentaje de células CD8. Esto indica que el tratamiento, tuvo algún efecto principalmente sobre la diferenciación de células tímicas, pues aunque están aumentadas las células T, podrían deberse únicamente al aumento de células dobles positivas que a las ya diferenciadas en Th o Tc. Así mismo, el aumento observado en las CD8, puede relacionarse con el aumento en la susceptibilidad a presentar enfermedades autoinmunes en hembras^{11, 25, 33}, pues simplemente los controles intactos muestran un aumento de casi el doble en hembras respecto a los machos; lo cual hace patente, que al menos en este tipo celular, la modulación por el estradiol es fundamental.

El análisis de poblaciones celulares que demostró un efecto principalmente por la administración de estradiol, arrojó la información de que las hembras fueron más sensibles al tratamiento, de manera que en bazo, el porcentaje de células T está aumentado respecto a todos los grupos, los cuales, además, no muestran diferencias por la infección; mientras que en los machos, no hubo diferencias entre los grupos. Por otro lado, hay un aumento en los macrófagos de ganglios linfáticos mesentéricos de hembras, pero en los machos solamente se observa un aumento asociado a la infección. Además, hubo poblaciones que estaban disminuidas por el tratamiento con estradiol y por la administración del vehículo, entre ellas los linfocitos B de bazo de hembras y en ganglios linfáticos mesentéricos de ambos sexos, lo mismo para las células NK en éstos. Anteriormente, se había descrito que la formación de linfocitos B estaba reducida en la médula espinal de ratones adultos con estradiol; así como que las células estromales y hematopoyéticas de la médula expresan receptores a estrógenos y que ER α expresado por los precursores linfocitarios, es particularmente importante para la supresión de la linfopoyesis mediada por hormonas²²; los resultados presentados, apoyan estos estudios, puesto que las células CD19 resultaron ser suprimidas por el estradiol, particularmente en hembras.

Así, tomando en cuenta la elevación porcentual de poblaciones celulares debida únicamente por la infección y las que se vieron afectadas por la administración de estradiol, encontramos un aumento de macrófagos en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos en hembras y machos, un aumento de células NK en bazo y de manera diferencial, un aumento de CD3 en hembras y de CD19 en machos debido al tratamiento. Esta información muestra el efecto dimórfico por el tratamiento con estradiol, lo cual se puede analizar de manera que aunque la exposición neonatal a un ambiente estrogénico produce cambios fenotípicos celulares, estos cambios pueden ser modulados por el patrón hormonal secretado por los animales adultos, respaldando la teoría de que para que se obtenga un efecto final debido a la disrupción endócrina durante periodos críticos de desarrollo, es necesaria una segunda señal ambiental que dirija hacia determinado fenotipo y éste puede ser

diferencial de acuerdo a la señal recibida en la madurez que lo induzca. Finalmente, los cambios aquí reportados, muestran un aumento en células presentadoras de antígeno y células T, las cuales pueden tomar parte en la disminución a la susceptibilidad a la infección por *T. spiralis*.

Respecto al análisis de los cortes histológicos, encontramos los cambios comúnmente reportados en la literatura que atañen a la defensa contra la infección entérica por este nemátodo, pero también encontramos una heterogeneidad en la respuesta inmune en los controles de infección, pues en algunos observamos una mayor integridad de tejido, en otros, un mayor infiltrado inflamatorio, la hipertrofia de células caliciformes localizadas en vellosidades o en criptas, así como células de Paneth que presentaban gránulos y otros que no los presentaban. Esto es de esperarse, puesto que se utilizó la cepa de ratones CD-1, exogámicos, lo cual puede correlacionarse mejor con lo que ocurre en humanos: a un mismo reto antigénico con individuos diferentes, se tienen respuestas diferentes. De manera especial, esta heterogeneidad no ocurrió en los grupos tratados, aun entre hembras y machos, aunque la integridad epitelial es evidentemente mejor, el mecanismo por el cual ocurre esta protección puede ocurrir mediante la producción de moco por las células caliciformes, las cuales, aunque no mostraban cambios muy pronunciados en las vellosidades, sí lo hacen en las criptas, esto se puede relacionar con los cambios en la granularidad de las células de Paneth, pues tanto éstas, como muchas células del sistema inmune innato se encuentran localizadas en criptas, por lo que necesitan de algún mecanismo para que sus componentes anti-microbianos puedan alcanzar la luz intestinal, éste podría ser por la solubilidad en moco producido en criptas y que alcanza en lumen.

En concordancia con lo anterior, podrían existir diversos mecanismos que respectan tanto a la respuesta inmune innata, como a los cambios fisiológicos en el intestino que son fundamentales en la respuesta inmune ante *T. spiralis* y que no han sido del todo dilucidados, como lo podrían ser las células de Paneth, consideradas principalmente como células con propiedades bactericidas; sin embargo, estas células secretan principalmente defensinas, las cuales tienen

efectos sobre la membrana plasmática de los agentes patógenos; de forma que también pueden estar afectando el establecimiento de diversos macroparásitos.

Finalmente, tomando en cuenta todo lo anteriormente descrito, es claro que el tratamiento neonatal induce diversos efectos sobre las células en desarrollo, los cuales, permanecen hasta la etapa adulta, durante ésta los cambios ocasionados pueden ser modulados por la secreción endógena de hormonas esteroides sexuales, produciendo cambios fenotípicos diferenciales entre sexos, es decir, manteniendo efectos dimórficos, específicamente, sobre las células del sistema inmune; pero también puede influir sobre el desarrollo de otros tejidos, que aparentemente no son susceptibles a la acción hormonal, como lo es la mucosa intestinal, así como las células de la inmunidad innata que se consideran sumamente conservadas. En el caso de la infección entérica por *T. spiralis*, el efecto final resultó en una respuesta inmune más eficiente, probablemente, por una mayor activación de linfocitos T y presentación de antígeno; mejorando la expulsión del parásito y disminuyendo la susceptibilidad a la infección.

Cabe señalar que el mecanismo total, por el cual ocurre la mejora en la respuesta inmune contra el parásito, no es completamente esclarecida a través de este trabajo, pues queda fuera de su alcance; el único propósito de éste, fue demostrar si había o no un efecto en la respuesta inmune debido a la estrogenización neonatal. No obstante, la información obtenida arroja información que anteriormente no se tenía respecto a la disrupción endócrina por estrógenos, así como a las diferencias en las poblaciones celulares entre sexos y al tipo de respuesta inmune protectora contra *Trichinella spiralis*. Pese a la escasa información bibliográfica con la que se contó para apoyar los resultados, su análisis es válido; de manera que se acepta la hipótesis planteada como verdadera y se cumple con el objetivo general.

CONCLUSIONES

1. Conclusión general

- La administración neonatal de 17β -estradiol influye sobre la respuesta inmune durante la infección entérica con *Trichinella spiralis* en ratones hembras y machos adultos.

2. Conclusiones particulares.

- La exposición neonatal a 17β -estradiol disminuye la susceptibilidad a la infección entérica con *T. spiralis* en ratones de ambos sexos.
- Las poblaciones celulares analizadas que presentaron un incremento atribuido al tratamiento neonatal con estradiol son, las células CD3 en bazo de hembras, así como en timo tanto de hembras como de machos y los macrófagos en ganglios linfáticos mesentéricos de hembras.
- El tejido intestinal muestra cambios asociados a la infección como abundante infiltrado inflamatorio en lámina propia, hipertrofia de células caliciformes y desprendimiento de las células del epitelio en todos los grupos infectados; los animales tratados con estradiol mostraron además, los gránulos de las células de Paneth más densos, voluminosos y en mayor número que en el resto de los grupos.

PERSPECTIVAS

En este estudio, se demostró que la administración de una sola dosis de estradiol durante el periodo neonatal, es capaz de modificar la respuesta inmune hasta la madurez durante la infección entérica con *Trichinella spiralis*, disminuyendo la susceptibilidad a la infección. Así mismo, se observó una diferencia en el efecto resultante entre animales machos y hembras; además, la tinción por hematoxilina-eosina revela una heterogeneidad de la respuesta inmune entre individuos con diferente fondo genético en los animales controles de infección.

Ahora bien, a partir de estos resultados se puede profundizar en el estudio de las alteraciones fenotípicas ocasionadas por los factores ambientales durante periodos críticos de desarrollo, ya sea utilizando el mismo estradiol mediante un análisis más preciso del proceso que induce la resistencia a la infección, como lo es el patrón de las citocinas implicadas a nivel local y tinciones específicas en el intestino para conocer los componentes involucrados a nivel celular. Por otro lado, este estudio puede realizarse con CDE exógenos con actividad estrogénica, como lo es el bisfenol A, el cual, es ampliamente utilizado en la elaboración de plásticos.

Finalmente, es necesario resaltar que la principal aportación de este estudio está en el hecho de que hace patente la necesidad de conocer los factores ambientales a los que estamos expuestos, principalmente mujeres embarazadas y neonatos, pues esta exposición puede tener efectos irreversibles en el organismo, lamentablemente, la mayoría de ellos aún son desconocidos, sobre todo respecto al sistema inmune.

REFERENCIAS

1. AKIHO, H., BLENNERHASSETT, P. A., DENG, Y. AND COLLINS, S. M. *Role of IL-4, IL-13 and Stat6 in inflammation induced hypercontractility of murine smooth muscle cells*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2002, 282.
2. ALIZADEH M, OTA F, et. al. *Altered allergic cytokine and antibody response in mice treated with Bisphenol A*. J Med Invest. 2006 Feb;53(1-2):70-80.
3. AMADO J. A. Y FLÓREZ J., *Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales*.
4. BEVINS CL, SALZMAN NH. *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol. 2011 May;9(5):356-68. Epub 2011 Mar 22.
5. BREVINI T., ZANETTO S., CILLO F., *Effects of Endocrine Disruptors on Developmental and Reproductive Functions*, Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders, 2005, 5, 1-10.
6. BULZOMI P, MARINO M. *Environmental endocrine disruptors: does a sex-related susceptibility exist?* Front Biosci. 2011 Jun 1;17:2478-98.
7. CAMACHO-ARROYO I., MORALES-MONTOR J., VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA J., *Efectos no reproductivos de hormonas esteroides*, primera edición, Universidad Autónoma Metropolitana, Sociedad mexicana de Neuroinmunoendocrinología, México, 2011.
8. CAPÓ V., DESPOMMIER DD. *Clinical aspects of infection with Trichinella spp*. Clin Microbiol Rev. 1996 Jan;9(1):47-54.
9. CHÁVEZ E., SALDIVAR S., MUÑOZ J., MORENO M., *Trichinellosis, una zoonosis vigente*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET, Vol. VII, Núm. 06, Junio/2006.
10. CREWS D., McLACHLAN J., *Epigenetics, Evolution, Endocrine disruption, Health and Disease*, Endocrinology, 147(6), S4-S10, 2006.

11. DE LEÓN-NAVA M., MORALES-MONTOR J., *Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2?* Revista de Investigación Clínica. Vol. 58, Núm. 2. Marzo-Abril 2006, pp 161-169.
12. DEROO B., KORACH K., *Estrogen receptors and human disease*. The Journal of Clinical Investigation, Vol.116, Núm. 3, Marzo 2006.
13. ESCOBEDO G., LÓPEZ-GRIEGO L., MORALES-MONTOR J. *Neuroimmunoendocrine modulation in the host by helminth parasites: a novel form of host-parasite coevolution?* Neuroimmunomodulation. 2009;16(2):78-87. epub 2009 feb 11.
14. GANONG W., *Fisiología Médica*, 20ª edición en español, el manual moderno S.A. de C.V., 2005.
15. GREENSPAN, F.S., GARDENER, D.G., et. al. *Endocrinología básica y clínica*, 8va edición, 2005, Editorial El Manual Moderno.
16. GLUCKMAN P., HANSON A., *Living with the past: evolution, development and patterns of disease*. Science, 305, 2004 1733-1736.
17. GUO H, LIU T, UEMURA Y, et. al. *Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity*. Cell Mol Immunol. 2010 May;7(3):227-34. Epub 2010 Apr 12.
18. GUZMÁN C., CAMACHO-ARROYO I., Et. Al., *Neonatal exposure to estradiol induces resistance to helminth infection and changes in the expression of sex steroid hormone receptor in the brain and spleen in adult mice of both sexes*. Brain, Behavior and Immunity, 2009 Jul; 23(5):709-15
19. GUZMÁN C., ZAMBRANO E., *Compuestos disruptores endócrinos y su participación en la programación del eje reproductivo.*, Revista de Investigación Clínica. Vol. 59, Núm. 5. Enero-Febrero 2007. pp. 73-81.
20. HERNÁNDEZ BELLO R., *Identificación y caracterización de caveolina-1, una proteína estadio- y sexo-específica que participa en la ovogénesis y embriogénesis en Trichinella spiralis*. Tesis de doctorado, CINVESTAV, IPN, México, 2008.
21. HOLLADAY SD, BLAYLOCK BL, et.al. *Selective prothymocyte targeting by prenatal diethylstilbesterol exposure*. Cell Immunol. 1993 Nov;152(1):131-42.

22. IGARASHI H, et.al., *Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15131-6.
23. KARPUZOGLU E., AHMED A., *Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases and apoptosis*. Nitric Oxide, 15, 2006, 177–186.
24. KHAN, W.I., *Physiological changes in gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-Trichinella spiralis model*, Parasitology, 2008, 135, 671-682.
25. KINDRT T., GOLDSBY R., OSBORNE B., *Inmunología de Kuby*, sexta edición, McGraw-Hill, Corea 2007.
26. KRONENBERG, H.M., et. al., *Williams Tratado de endocrinología*, 11va edición, Elsevier, Madrid, España, 2009.
27. LATINI G., KNIPP G., MANTOVANI A., MARCOVECCHIO, Et. .Al. *Endocrine disruptors and Human Health*, Minireviews in Medicinal Chemistry, 10, 846-855, 2010.
28. MÁRQUEZ D., *Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina*.
29. MASUYAMA H., HIRAMATSU Y. *Involvement of suppressor for Gal 1 in the Ubiquitin/Proteasome-mediated Degradation of Estrogen Receptors*. The Journal of biological Chemistry, Vol. 279, No. 13, colección de Marzo 26, pp. 12020-12026, 2004.
30. MICHELS C., SCALES H., SAUNDERS, K., et. al., *Neither interleukin-4 receptor α , expression on CD4 T cells or macrophages and neutrophils is required for protective immunity to Trichinella spiralis*. Immunology, 128, e385–e394, 2008.
31. MOORE, K.L., *Embriología clínica: el desarrollo del ser humano*, 7^{ma} edición, Elsevier, Madrid, España, 2004.
32. PETERSEN S., KRISHNAN S., HUDGEENS. *The Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway and Sexual Differentiation of Neuroendocrine Functions*. Endocrinology 147 (6) Supplement S33-S42, 2006.
33. SAKAZAKI F, UENO H, NAKAMURO K. *17beta-Estradiol increases the number of effector memory CD8+ lymphocytes in mice with contact hypersensitivity and*

- among cultured splenocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010 Jun;32(2):246-50.
34. SCHUG T., JANESICK A., BLUMBERG B., HEINDEL J., *Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility.* *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127 (2011), 204-215.
 35. SOLOMON G., SCHETTLER T., *Environment and Health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications.* *Journal of Canadian Medical Association*, Nov. 28, 2000, 163 (11).
 36. STRAUB R., *The Complex Role of Estrogens in Inflammation,* *Endocrine Reviews* 2007, 28(5) 521-574.
 37. TABB M., BLUMBERG B., *New models of action for endocrine-disrupting chemicals,* *Molecular endocrinology*, 20(3), 475-482, 2006.
 38. TAUB D., *Neuroendocrine Interactions in the immune System,* *Cellular Immunology*, 2008; 252(1-2): 1–6.
 39. VARGAS VILLAVICENCIO J. *Interacciones inmuno-endócrinas durante la cisticercosis murina: el papel de la progesterona y la dehidroepiandrosterona,* Tesis de doctorado, UNAM, México, 2008.
 40. WITORSCH R., *Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks be Predicted?* *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36, 118-130, 2002.
 41. YAN H, TAKAMOTO M, SUGANE K. *Exposure to Bisphenol A prenatally or in adulthood promotes T(H)2 cytokine production associated with reduction of CD4CD25 regulatory T cells.* *Environ Health Perspect.* 2008 Apr;116 (4):514-9.
 42. YOSHINO S, YAMAKI K, YANAGISAWA R, et. al. *Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice.* *Br J Pharmacol.* 2003 Apr; 138(7):1271-1276.
 43. http://www.epigenetica.org/?page_id=150
 44. <http://www.bisphenol-a-europe.org>
 45. <http://www.trichinella.org>