

---

---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**"EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR RESTRICCIÓN DE  
MOVIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE IgA Y EN EL NUMERO  
DE LINFOCITOS T Y B DEL NALT DE RATONES Balb/c"**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA INMUNOLOGÍA  
PRESENTA:**

**M. C. y P. HAYDÉE IRAIS LEÓN CHÁVEZ**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DR. SAÚL ROJAS HERNÁNDEZ  
M. EN C. MARYCARMEN GODÍNEZ VICTORIA**

**MÉXICO, D. F.**

**DICIEMBRE 2009**

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Inmunología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, con apoyo de la CGPI con beca institucional de escolaridad durante el periodo de Enero/2008 a Diciembre/2009.

# **EFFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO EN LA PRODUCCION DE IgA Y EN EL NÚMERO DE LINFOCITOS T Y B DEL NALT DE RATONES BALB/C**

## INDICE

### INTRODUCCION

- SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS
- TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A NARIZ
- ESTRÉS
- RELACIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON EL SISTEMA NEUROENDÓCRINO

### PLANTEAMIENTO PROBLEMA

### JUSTIFICACION

### HIPÓTESIS

### OBJETIVO GENERAL

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### MATERIALES Y MÉTODOS

### RESULTADOS

### DISCUSIÓN

### CONCLUSIONES

### BIBLIOGRAFÍA

## RESÚMEN

Las mucosas representan una parte del sistema inmune más extensa y más importante del organismo, ya que en ellas se lleva a cabo principalmente, la entrada a patógenos y alérgenos. El tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) se subdivide de acuerdo con las regiones anatómicas, distribución y composición de estructuras linfoides que varían en las especies, edad y estado del tejido. El tejido linfoide asociado a nariz (NALT) en roedores, se ha relacionado con estructuras bilaterales que se encuentran dorsalmente en el piso de la cavidad nasal, consta de un encapsulado de células linfoides que contiene un epitelio que semeja la cubierta de las células M en el intestino y es considerado como un sitio inductor y secretor de anticuerpos como la IgA secretora. La IgA juega un importante papel en la repuesta inmune del hospedero como primera línea de defensa, comprende mecanismos de defensa bioquímicos y celulares preparados para responder con rapidez ante organismos patógenos.

El estrés se ha convertido en un problema de salud pública; se trata de un proceso fisicoquímico y emocional inductor de una tensión que favorece la liberación de citocinas, hormonas, neurotransmisores y cortisol, dando como resultado alteraciones conductuales e inmunológicas mediante las que se prepara para hacer frente a las posibles demandas que se generan como consecuencia del agente estresor, que ponen en riesgo la integridad de los individuos y actualmente aunque la interacción psico-neuro-endocrino-inmunológica está bien demostrada, los efectos del estrés agudo sobre la composición celular y la secreción de IgA en el NALT, aún no ha sido descrita.

En el presente estudio se determinó el efecto del estrés agudo inducido por la restricción de movimiento, sobre la producción de IgA en lavados traqueo-nasales (ELISA) y las poblaciones celulares de linfocitos T y B (citometría de flujo) en tejido linfoide asociado a nariz de ratones Balb/C; como control del efecto del estrés a nivel sistémico, se determinaron IgA en suero, poblaciones linfoides en bazo. Se determinó corticoesterona en suero (EIA) para corroborar que se indujo estrés con el modelo de restricción utilizado y para demostrar la asociación del estrés con el sistema inmunológico. También fueron utilizados ratones sanos como control negativo.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los ratones sometidos a la restricción de movimiento aumentaron los niveles de corticoesterona en comparación con los ratones sanos, lo que valida el modelo utilizado. Se encontró un aumento en la producción de IgA en suero ( $p \leq 0.05$ ) y en IgA de lavados traqueonasales ( $p \leq 0.05$ ). En bazo, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4 ( $p \leq 0.05$ ) y una disminución en el porcentaje de linfocitos B ( $p \leq 0.05$ ), lo cual confirma la relación psico-neuro-endocrino-inmunológica, a nivel sistémico. En el NALT, se observó una disminución de linfocitos T CD4 ( $p \leq 0.05$ ) y de células B CD 19+ ( $p \leq 0.05$ ) y B220+/CD19+ ( $p \leq 0.05$ ), lo cual demuestra que el estrés también juega un papel importante en la integridad del sistema inmunológico en las mucosas y también explica su relación con la mayor prevalencia de enfermedades infecciosas en personas sometidas a este tipo de estrés.

# **“EFFECT OF ACUTE STRESS IN MOVEMENT RESTRICTION IN THE PRODUCTION OF IgA AND IN THE NUMBER OF LYMPHOCITES T AND B FROM NALT OF MICE BALB/C”**

## **ABSTRACT**

The mucosa is the largest and most important area of immune system in the body, because in them is carried out mainly entry to pathogens and allergens. The mucosa associated lymphoid tissue (MALT) is subdivided according to anatomical regions, distribution and composition of lymphoid structures that vary in species, age and condition of the tissue. The nose-associated lymphoid tissue (NALT) in rodents has been associated with bilateral structures that are found dorsally in the floor of the nasal cavity, consists of a package of lymphoid cells containing a cover resembling epithelial M cells in the intestine and is considered as a site inducer and secretory IgA antibodies and secretory. IgA plays an important role in host immune response as a first line of defense, including defense mechanisms and cellular biochemical prepared to respond rapidly to pathogens.

Stress has become a public health problem, it is an emotional and physical-chemical process inducing a voltage that favors the release of cytokines, hormones, neurotransmitters and cortisol, resulting in behavioral abnormalities and immunological through preparing for meet the possible demands that are generated as a result of the stressor agent, threatening the integrity of individuals and although the interaction now psycho-neuro-endocrine-immunology is well established, the effects of acute stress on the cellular composition and secretion of IgA in NALT, has not yet been described

In this study, the effect of acute stress induced by the restriction of movement, on the production of IgA nasal washes tracheobronchial (ELISA) and cell populations of T and B lymphocytes (flow cytometry) in associated lymphoid tissue nose Balb/c, as control of the effect of stress at the systemic, IgA were determined in serum, spleen lymphoid populations. Serum corticosterone was determined (EIA) to confirm that stress was induced with the model of restraint used and to demonstrate the association of stress to the immune system. Also healthy mice were used as negative control.

## **RESULTS AND CONCLUSIONS**

The mice subjected to restriction of movement increased corticosterone levels compared with healthy mice, validating the model. We found an increase in the production of serum IgA ( $p < 0.05$ ) and IgA traqueonasales washings ( $p < 0.05$ ) in spleen, there was an increase in the percentage of CD4 T cells ( $p < 0.05$ ) and decreased the percentage of B lymphocytes ( $p < 0.05$ ), confirming the relationship psycho-neuro-endocrine-immune, systemic level. In the NALT, a decrease of CD4 T cells ( $p < 0.05$ ) and CD 19 + B cells ( $p < 0.05$ ) and B220 + / CD19 + ( $p < 0.05$ ), demonstrating that stress plays an important role the integrity of the mucosal immune system and also explains their relationship to the increased prevalence of infectious diseases in person subjected to such stress.

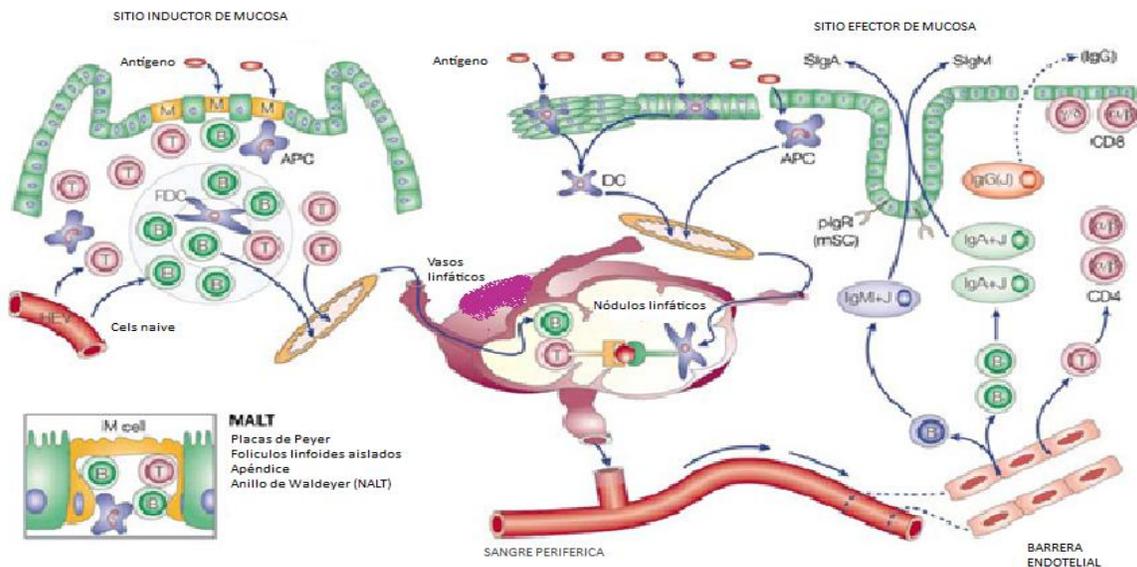
# EFFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE IgA Y EN EL NÚMERO DE LINFOCITOS T Y B DEL NALT DE RATONES BALB/C

## INTRODUCCION

### SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS

El sistema inmune en tejido mucoso es definido como tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), se encuentra de forma organizada, y se presenta como folículos linfoides aislados o folículos que se agregan para formar unidades más grandes, o en colección difusa de linfocitos y células accesorias; el tejido linfoide asociado a mucosas se encuentra en epitelio, encima de la membrana basal, en la lamina propia o intersticio; incluyen los linfocitos intraepiteliales, sobre todo T, y colecciones organizadas de linfocitos, a menudo ricas en linfocitos B; se ha descrito la presencia de folículos linfoides subepiteliales característicos de superficies epiteliales que cubren glándulas de secreción mucosa. (3) (2)

Los compartimientos del sistema inmune de mucosas están divididos en sitio inductor, donde los antígenos realizan una estimulación en la superficie mucosa a cels T naive y linfocitos B; y sitio efector, donde las células efectoras después de la extravasación, retención y diferenciación realizan su acción, para poder contribuir a la formación de IgA.



Los sitios de inducción están constituidos por MALT, ganglios locales y regionales del drenaje linfático de mucosa, mientras que los sitios efectores consisten en diferentes compartimentos histológicos incluida la lámina propia de diversas mucosas, estroma de las glándulas exocrinas, y epitelios de superficie.

MALT se subdivide de acuerdo con las regiones anatómicas, la distribución y la composición de estructuras linfoides que varían considerablemente en las especies, edad y el estado del tejido (normal o inflamación crónica). Otras estructuras humanas MALT no parecen desarrollarse en etapa prenatal y su existencia y tamaño en general dependen de la inducción por estímulos exógenos. (1)

TABLA 1  
NOMENCLATURA RECOMENDADA PARA COMPARTIMENTOS DE CELULAS  
INMUNES ASOCIADAS A MUCOSA

ABREVIACIONES PREFERIDAS	EXPLICACIONES
LP	Lámina propia Generalmente se refiere a la del tejido de la mucosa intestinal, limita al estroma por encima de la muscularis mucosae (excluyendo así la submucosa), pero también se puede utilizar en relación con otras mucosas
Compartimento IEL	Epitelio de superficie Generalmente se refiere al epitelio del intestino delgado donde se localizan la mayoría de linfocitos intraepiteliales (IELs)
FAE	Epitelio asociado a folículos
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
PP	Placas de Peyer
ILF	Folículo linfoide aislado (solitario) ILF y PP's constituyen la mayor parte de GALT, pero también es incluido apéndice, aunque ha sido poco explorado funcionalmente
NALT	Tejido linfoide asociado a nariz
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios Generalmente no se encuentra en pulmones de humanos adultos
MLN	Nódulos linfáticos mesentéricos
CLN	Nódulos linfáticos cervicales Debe especificarse superficiales o profundos

## NALT

Las vías respiratorias superiores e inferiores están continuamente expuestas a agresiones antigénicas. Esto se refleja en presencia de células especializadas y órganos linfoides en la mucosa nasal bucal y en pulmones; sin embargo la organización de estas estructuras puede variar en diferentes especies.

En la faringe humana, un conjunto de tejidos linfoides rodea las fosas nasales y orales en la faringe, ellos son colectivamente llamados anillo de Waldeyer, incluyendo adenoides (amígdalas nasofaríngeas) y amígdalas palatinas (Perry y White, 1998). Las especies que muestran buen desarrollo en BALT, generalmente no tienen una red compleja de Waldeyer, y presentan agregados linfoides en la entrada del conducto faríngeo en la cavidad nasal, agregados denominados tejido linfoides asociado a nariz NALT (Kuper et al. 1992). Los animales con respiración nasal predominante o exclusiva como roedores han desarrollado NALT y BALT; la organización y estructura del NALT ha sido estudiada más ampliamente en pequeños roedores como ratas y ratones (Koornstra, et al. 1993; Kuper et al. 1992; Spit et al. 1989).

Los roedores carecen de amígdalas, pero han asociado NALT a estructuras bilaterales que se encuentran dorsalmente en el piso de la cavidad nasal en tiras de tejido linfoides justo en la entrada del conducto faríngeo (libro de mucosas) (5). Las regiones más proximales de la cavidad nasal en los roedores están revestidos de epitelio escamoso estratificado; en las cavidades el epitelio pseudo estratificado se encuentra en la superficie ventral de la línea de entrada y en la longitud del conducto nasofaríngeo, además de células ciliadas columnares, éste epitelio respiratorio también contiene numerosas células caliciformes, que están involucrados en la producción de glucocalix. En aquellos sitios donde el epitelio respiratorio cubre el NALT, se caracteriza por la presencia de micropliegues especializados, células M (Karchev y de Kabakchiev 1984). Estas células M se encuentran en todas las mucosas del epitelio de revestimiento de agregados linfoides, tales como las amígdalas, placas de Peyer y BALT. Estos epitelios son algunas veces denominados epitelio asociado a folículos (FAE) (Spit et al. 1989). Además de las células M, que se pueden encontrar en pequeños grupos o aislados, el epitelio que cubre el NALT también contiene algunas células mucosas caliciformes.

Considerando que la mayoría de las células epiteliales recubren la cavidad nasal, están determinadas a guardar antígenos y expulsar microorganismos, están protegidas por una capa de moco y presentan una actividad constante de sus microvellosidades, las células M han desarrollado un mecanismo especial para el transporte de macromoléculas y partículas a través del epitelio. La superficie basolateral de las células M, está profundamente invaginada mediante la cual se forman grandes bolsillos intraepiteliales, que sirven como un sitio de recolección inicial para material de transcitosis. Junto con amplios arreglos de filamentos intermedios, este domo constituye la característica primordial de las células M. Dentro del domo, los linfocitos, así como macrófagos se pueden encontrar, en estrecha asociación con la membrana de la célula M, sugiriendo algún tipo de interacción.

Además, las células M forman largos procesos basales que se ubican para extenderse en la profundidad del tejido linfóide, tejido debajo del epitelio, donde pueden asociarse con otras células, como células presentadoras de antígeno. La mayoría de los conocimientos que se tienen sobre las células M se basan en observaciones hechas en epitelio linfóide que recubre el domo de las placas de Peyer. Sin embargo, basado en las similitudes de la estructura, es probable que la mayoría de las características encontradas para las placas de Peyer son atribuibles en las células M en NALT (Fujimura 2000), con leves diferencias regionales. Las células M parecen estar especializadas en transcitosis (Kraehenbuhl Neutra y 2000 ; Neutra et al. 2001). Sin embargo parece que existe una interacción activa entre las células M y los linfocitos subyacentes por que después de una disminución de una disminución de linfocitos por irradiación de los bolsillos intraepiteliales de las células M hay pérdida en las placas de Peyer (Ermak et al. 1989). La actividad de células en NALT está influenciado por estímulo antigénico realizando la comparación en ratas libres de patógenos (Jeong et al, 2000). Primero , el número de células M disminuye y se mantiene baja en ratas SPF, pero las células también mostraron una morfología más uniforme. En animales convencionales, el número de células M aumenta con la edad, y su morfología está alterada, dando lugar a citoplasma amplio y grandes espacios intercelulares llenos de material amorfo. Datos sobre el fenotipo de los linfocitos que residen en los bolsillos de las células M en NALT están limitados (Hameleers et al. 1989) pero en las placas de Peyer la mayoría de las células que se localizan en el domo de las células M son células T CD4+. Que tienen características de células T naive, pero también se encuentran marcadores de activación como CD 69 y CD45 RO. También fueron encontrados en el domo células B naive, con expresión de CD 45 RA, describiendo mayor activación de células (Farstad et al. 1994). La presencia de células B han llevado a la especulación de que estas células están involucradas en la presentación de antígenos a células T en estos sitios del epitelio. La composición global del NALT en ratones con respecto a la distribución de linfocitos ha sido descrita con mayor detalle (Asanuma et al. 1997; Heritage et al. 1997). El número de linfocitos B en NALT ha igualado aproximadamente el número de células T, o se han encontrado el doble, probablemente debido a las condiciones de vida de los animales. Cuando se comparo la proporción de las células T CD4+ y CD8+, se encontró una mayoría de células T CD4, que refleja la distribución normal de este tipo de células en el tejido linfóide del ratón (Kraal et al. 1983).

Hace menos de 2 décadas fue descrito por primera vez, y la aparente semejanza con la estructura con placas de Peyer del intestino delgado ( Kuper et al. 1989). Ambos órganos se sitúan directamente por debajo de la capa epitelial y se caracterizan por la ausencia de vasos linfáticos aferentes. Ambos están compuestos por folículos de células B alternando los compartimentos de linfocitos T.

En las áreas de las células T, pueden observarse discretamente vénulas endoteliales altas donde se lleva a cabo la migración de linfocitos. En el caso de NALT el drenaje linfático eferente drena en nódulos linfáticos cervicales de la región superior del tórax, mientras en las placas de Peyer drena en nódulos linfáticos mesentéricos. Estudios sobre el tránsito de linfocitos puso de manifiesto diferencias interesantes entre NALT y las placas de Peyer (Csencsits et al. 1999).

Cuando la expresión de adreínas vascular fue estudiada en lo alto del endotelio vénulas (HEV) en NALT de ratones, un perfil de expresión única de se encontró con una expresión predominante de la periferia addressin nodo (PNAD), y menos VHE expresar la MAdCAM addressin mucosa-1. En las placas de Peyer, todos VHE expresar tanto adreínas. Esto se refleja en la unión la capacidad de los linfocitos en el tejido NALT que era principalmente mediada por la interacción de la PNAD selectina L (Csencsits et al.1999). Además, se constató que en NALT VHE también se encuentra en la áreas de células B, a diferencia de placas de Peyer donde VHE son más restringidas al compartimiento T interfolicular. Estos resultados apuntan a claras diferencias en la organización entre NALT y placas de Peyer, y se refleja también en el desarrollo ontogenético de los dos órganos.

## FUNCIONES

Su papel inmune en la mucosa como sitio inductor se ha descuidado, hasta hace poco se considera NALT como un sitio de inducción de la mucosa y una fuente de anticuerpos IgA secretora.(4)

## ESTRÉS

Desde 1935, Hans Selye, (considerado padre del estrés) introdujo el concepto de estrés como síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo, a diferentes agentes nocivos del ambiente, de naturaleza física o química.

El estrés es una reacción normal de la vida en cualquier edad, producido por el instinto del organismo de protegerse de las presiones físicas o emocionales o, en situaciones extremas, del peligro, alternativamente para precisar conceptos, se utiliza el término "respuesta de estrés" al referirse a la respuesta inespecífica del organismo a cualquier demanda, y el término de "estresor" o "situación estresante" referida al estímulo o situación que provoca una respuesta de estrés.

Es un proceso fisicoquímico y emocional inductor de una tensión, que favorece la liberación de citocinas, hormonas neurotransmisores y cortisol, que inducen en su conjunto, la aparición de alteraciones conductuales, la respuesta de estrés es una respuesta automática del organismo a cualquier cambio ambiental, externo o interno, mediante la cual se prepara para hacer frente a las posibles demandas que se generan como consecuencia de la nueva situación, (Labrador, 1992). Por tanto, ello no es algo "malo" en sí mismo, al contrario; facilita el disponer de recursos para enfrentarse a situaciones que se suponen excepcionales.

### Tipos de estrés

- Estrés agudo.
- Estrés agudo episódico
- Estrés crónico.

## Estrés Agudo

El estrés agudo es la forma de estrés más común. Proviene de las demandas y las presiones del pasado inmediato y se anticipa a las demandas y presiones del próximo futuro. Los estímulos estresantes agudos tienen efectos que pueden considerarse como veniales. Un elevado nivel de estrés agudo puede producir molestias psicológicas.

El estrés agudo puede aparecer en cualquier momento de la vida de todo el mundo.

Es breve, no tiene tiempo suficiente para producir las grandes lesiones

- Desequilibrio emocional: una combinación de ira o irritabilidad, ansiedad y depresión.
- Problemas musculares entre los que se encuentra el dolor, tensiones musculares, contracturas y lesiones en tendones y ligamento.
- Problemas digestivos en estómago o en intestino, acidez, flatulencia, diarrea, estreñimiento y síndrome del intestino irritable.
- Manifestaciones generales transitorias como elevación de la presión arterial, taquicardia, sudoración, palpitaciones cardíacas, mareos, migrañas, hipotermia, dificultad respiratoria y dolor torácico.

## Estrés Agudo Episódico

Existen individuos que padecen de estrés agudo con frecuencia, están inmersos en la crisis y en el caos.

Con frecuencia, los que padecen estrés agudo reaccionan de forma descontrolada, muy emocional, están irritables, ansiosos y tensos. A menudo se describen a sí mismos como personas que tienen "mucho energía nerviosa". Siempre tienen prisa, tienden a ser bruscos y a veces su irritabilidad se convierte en hostilidad. Las relaciones interpersonales se deterioran rápidamente cuando los demás reaccionan con hostilidad real.

## Estrés crónico

Es el estrés agotador destruye al cuerpo, la mente. Hace estragos mediante el desgaste a largo plazo, por exigencias y presiones implacables.

## FISIOPATOLÓGIA DEL ESTRÉS

Se identifican las siguientes fases en el modo de producción del estrés:

### 1) Reacción de Alarma:

El organismo, amenazado por las circunstancias se altera fisiológicamente por la activación de una serie de glándulas, especialmente en el hipotálamo y la hipófisis, y por las glándulas suprarrenales.

Se estimula al hipotálamo quien produce "factores liberadores" que constituyen sustancias específicas que actúan como mensajeros. Una de estas sustancias es la hormona denominada A.C.T.H. (Adrenal Cortico Tropic Hormone) que viaja por el torrente sanguíneo hasta la corteza de la glándula suprarrenal, quien bajo el influjo de tal mensaje produce la cortisona u otras hormonas llamadas corticoides.

A su vez otro mensaje que viaja por la vía nerviosa desde el hipotálamo hasta la médula suprarrenal, activa la secreción de adrenalina. Estas hormonas son las responsables de las reacciones orgánicas en toda la economía corporal.

## 2) Estado de Resistencia:

Cuando se es sometido en forma prolongada a la amenaza de agentes lesivos físicos, químicos, biológicos o sociales el organismo prosigue su adaptación a dichas demandas de manera progresiva, pero puede ocurrir que disminuyan sus capacidades de respuesta debido a la fatiga que se produce en las glándulas del estrés. Durante esta fase suele ocurrir un equilibrio dinámico u homeostasis entre el medio ambiente interno y externo del individuo.

Así, si el organismo tiene la capacidad para resistir mucho tiempo, no hay problema alguno, en caso contrario sin duda avanzará a la fase siguiente.

## 3) Fase de Agotamiento:

La disminución progresiva del organismo frente a una situación de estrés prolongado conduce a un estado de gran deterioro con pérdida importante de las capacidades fisiológicas, en la cual el sujeto suele sucumbir ante las demandas pues se reducen al mínimo sus capacidades de adaptación e interrelación con el medio.

## RELACION DEL SISTEMA INMUNE

A fines de 1950 y principios de 1960, experimentos con animales concluyeron que el estrés podría afectar inmunidad humoral y celular. Rasmussen, Marsh y Brill encontraron que ratones expuestos a estrés fueron más susceptibles a contraer infección por el virus del Herpes Simple. Wistar y Haldemann encontraron que el estrés prolongó la retención de autoinjertos. La primera evidencia experimental directa de los efectos de estrés en la inmunidad fue que a una reducción de anticuerpo responde un antígeno como resultado de la tensión, en roedores, por Vessey y por Solomon (1960).

Aproximadamente por el mismo tiempo, Solomon, Levine, y Kraft demostraron que las experiencias en los primeros años de vida podrían afectar la respuesta mediada por anticuerpos en la vida adulta. El área más extensa de anomalías inmunológicas que ocurren junto con las enfermedades mentales empezó con el trabajo de Solomon y Fessel sobre los niveles anormales de inmunoglobulinas y los anticuerpos reacción-cerebro en algunos pacientes con esquizofrenia. Investigaciones en el occidente, de Korneva y Khai, en Leningrado, en 1963, informaron que lesiones electrolíticas destructivas en el hipotálamo dorsal de conejos, llevaban a la supresión del desarrollo de la fijación del complemento anticuerpo y la retención prolongada de antígenos en la sangre. Así, demostraban que el cerebro estaba envuelto en inmunoregulación, un tema sobre el que se especulaba en el trabajo de Solomon y Moos de 1964. Se publicaron varios trabajos en los años 1960 y 1970 por el inmunólogo yugoslavo B. D. Jankovic; él señaló, por ejemplo, las similitudes del antígeno entre cerebro y proteínas inmunológicas. El trabajo más crítico para establecer la credibilidad e importancia de la comunicación cerebro-inmunidad, sin embargo, fue el de Robert Ader y Nicholas Cohen en 1975 sobre el sabor aversivo que condicionó la inmunosupresión.

Si un estímulo condicionado (la sacarina) podía producir la inmunosupresión de un estímulo no condicionado (la droga ciclofosfamida), entonces cerebro y aprendizaje debían relacionar las respuestas inmunológicas.

Como consecuencia, Ader y Cohen descubrieron pertinentemente ambos detalles clínicamente y con respecto a la naturaleza de la respuesta del placebo, la habilidad de utilizar este tipo de condiciones para prolongar la vida de ratones con una enfermedad autoinmune, el lupus, por el tratamiento con sacarina principalmente (6) Desde hace aproximadamente 20 años existen evidencias experimentales y clínicas que han demostrado la existencia de una comunicación constante y bidireccional entre el sistema neuroendócrino y la respuesta inmunológica (interacciones neuroendocrinoinmunológicas), que nos permiten mantener la homeostasis ante los estímulos estresantes, de tipo sistémico-lesiones tisulares, infecciones- como de tipo psicológico, secundarios a la percepción y procesamiento del estímulo por cada individuo.

### PSICONEUROINMUNOMODULACION

En la actualidad es claro que los sistemas inmune y neuroendocrino comparten muchos receptores, citocinas, hormonas peptídicas y neurotransmisores, por lo tanto las interacciones entre los sistemas inmune y neuroendocrino son bidireccionales, esto por inervación directa de compartimientos linfoides (paracrina) por liberación de mediadores por nervios situados en la cercanía a las cels del sistema inmune (o viceversa) de forma endocrina por acción de hormonas y citocinas.

Se ha atribuido al sistema inmune la función de defensa frente a la lesión por agentes extraños (infecciosos, físicos, químicos, e incluso células propias que han sufrido transformación). Sin embargo, erróneamente suele no considerarse al sistema neuroendocrino como protagonista de los mecanismos de defensa. El estudio de la inmunología requiere pues, considerar la función del sistema inmune dentro del amplio contexto de la fisiología humana, fundamentalmente de la neuroendocrinología.

Tras una lesión tisular, el organismo lleva a cabo una serie de reacciones complejas (Inflamación) :

1. Aislamiento e inactivación de agentes causales
2. Prevención del daño tisular
3. Activación de los mecanismos de reparación necesarios para retomar la normalidad

Las reacciones inmediatas que se llevan a cabo después de la lesión, constituyen la respuesta de fase aguda, que es una reacción sistémica con 5 componentes relacionados:

- A. Neurológico
- B. Endócrino
- C. Metabólico
- D. Cardiovascular
- E. Conductual

La respuesta de fase aguda se considera como una reacción neuroinmunoendocrina, gran parte de los efectos conductuales y cardiovasculares son resultado de cambios neuroendócrinos por citocinas producidas en el foco inflamatorio.

### **Sistema de estrés.**

Constituido por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el sistema simpático sistémico, cada uno tiene componentes centrales de regulación, localizados en el hipotálamo y el tronco encefálico, respectivamente. Los componentes del sistema de estrés son:

- 1) Las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular secretoras de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y argininasopresina (AVP), que ejercen sus acciones a través de la hipófisis anterior y la corteza suprarrenal.
- 2) Las neuronas adrenérgicas centrales localizadas en el locus ceruleus, que actúan a través del sistema simpático sistémico y la médula suprarrenal.

Las neuronas parvocelulares productoras de CRH y las neuronas noradrenérgicas centrales están conectadas entre sí. Así, las neuronas productoras de CRH estimulan la secreción de noradrenalina por las neuronas noradrenérgicas centrales, y a su vez, la estimulación adrenérgica de las neuronas parvocelulares estimula la secreción de CRH; además, la CRH y la norepinefrina inhiben su propia producción, estableciéndose un mecanismo de retroalimentación negativa. De este modo, si bien las neuronas adrenérgicas centrales y las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular tienen sus propias "ramas" periféricas, el sistema de estrés es uno solo, más aún si se considera que estas "ramas periféricas" están interconectadas entre sí.

El sistema de estrés está controlado por señales límbicas, circadianas, neurosensoriales y hormonales (incluyendo citoquinas como el TNF, IL-1 e IL-6). Las situaciones de estrés, tales como la hipoglicemia, la cirugía, los problemas psíquicos y la inflamación estimulan este sistema.

### **Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.**

El llamado eje HHA se establece gracias a las conexiones entre las neuronas hipotalámicas del núcleo paraventricular, las células corticotropas de la hipófisis y las células secretoras de cortisol de la corteza suprarrenal. Debe recordarse además que la hipófisis anterior tiene un rol menos importante sobre las células corticosuprarrenales secretoras de mineralocorticoides.

### **Neuronas parvocelulares hipotalámicas**

En cada núcleo paraventricular existen tres divisiones de neuronas parvocelulares: una lateral, una intermedia, y una medial. Tanto las neuronas del grupo lateral como medial producen principalmente CRH; la diferencia está en que las neuronas del grupo medial secretan la hormona en el sistema portal hipotálamo-hipofisiario, en tanto que las del grupo lateral se encargan de estimular las neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico. Finalmente, las neuronas del grupo intermedio producen AVP y la secretan en el sistema porta hipotálamo-hipofisiario.

La argininasopresina es, el mismo mediador químico que la hormona antidiurética (ADH). Sin embargo, estrictamente es correcto aplicar este nombre para designar a la AVP producida por las neuronas magnocelulares del hipotálamo anterior y liberada en la hipófisis posterior, y no para designar a la AVP producida por las neuronas parvocelulares hipotalámicas y liberada en la eminencia media, ya que obviamente, los efectos del mediador son muy distintos cada uno de estos y otros casos. En resumen, la AVP liberada en pequeñas cantidades en el sistema porta hipotálamo-hipofisiario está encargada, al igual que la CRH, de estimular la secreción de ACTH; por otro lado, la AVP liberada en grandes cantidades por la hipófisis posterior está encargada de regular los mecanismos renales de conservación de agua. Esto ayudará a comprender por qué durante la respuesta de fase aguda disminuye la conservación renal de agua, a pesar de estimularse la liberación de AVP por las neuronas parvocelulares.

### **Células corticotropas de la hipófisis anterior**

La ACTH es producida por las células basófilas corticotropas de la hipófisis anterior, localizadas en la porción central de la glándula. La secreción hipofisiaria de ACTH está gobernada por las hormonas hipotalámicas CRH y AVP. Sin duda, el principal estimulante de la secreción de ACTH es la CRH, aunque la AVP potencia notablemente su efecto. La ACTH estimula la síntesis de cortisol, y éste inhibe la liberación de ACTH, tanto directamente como disminuyendo la liberación de CRH y AVP.

El ciclo sueño-vigilia influye también sobre la secreción de ACTH: ésta es máxima en las primeras horas de la mañana (4 am) y mínima al final de la tarde siempre que se mantenga un patrón normal de sueño.

### **Células secretoras de cortisol en la corteza suprarrenal**

El cortisol es producido por las células de las capas fascicular y reticular de la corteza suprarrenal bajo el control de diversos mediadores. El principal estímulo para la producción de cortisol es la ACTH (que también estimula levemente la producción de aldosterona).

### **Acción del sistema de estrés sobre el sistema inmune**

Tanto la activación del eje HHA como la del sistema simpático influyen sobre el proceso inflamatorio que se esté llevando a cabo. Las neuronas simpáticas postganglionares y las neuronas sensitivas aferentes secretan sustancias moduladoras de la inflamación, tales como la sustancia P y la somatostatina. No obstante, la importancia de estos mecanismos es pequeña en comparación a los profundos efectos que los productos del eje HHA (principalmente el cortisol) ejercen sobre el sistema inmune. De hecho, los glucocorticoides son ampliamente utilizados en clínica como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. A continuación se mencionan los principales efectos de los productos del eje HHA sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria.

## **Glucocorticoides**

Los glucocorticoides ejercen efectos sobre prácticamente todas las células del sistema inmune. El cortisol es el principal glucocorticoide involucrado en la inmunomodulación fisiológicamente. Esta hormona actúa uniéndose a receptores citoplasmáticos, formando complejos hormona-receptor que entran al núcleo y regulan la transcripción genética en diversos tipos celulares. Gran parte de los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los glucocorticoides (independientemente del tipo celular) resulta de uno de los siguientes mecanismos: 1) Inhibición de la síntesis de citoquinas (IL-1, TNF, IL-2, entre otras) o sus receptores; 2) Inducción de la producción de lipocortina-1, que inhibe la síntesis de eicosanoides; 3) Inhibición de la síntesis de moléculas MHC de clase II y moléculas de adhesión intercelular, involucradas en la interacción directa entre las diversas células del sistema inmune.

### **Efecto sobre Linfocitos**

Los glucocorticoides suprimen potentemente la función de los linfocitos Th1 (que favorecen la inmunidad celular), sin un efecto directo inhibitorio notable sobre los linfocitos Th2 (que favorecen la inmunidad humoral y las reacciones de hipersensibilidad inmediata). Sin embargo, esta solo es parte de su acción sobre el sistema inmune, de modo que los glucocorticoides inhiben las reacciones alérgicas por sus efectos sobre otras células, como los eosinófilos, basófilos, mastocitos y células endoteliales. Finalmente, los glucocorticoides inhiben la activación de los linfocitos B, aunque una vez activados, son resistentes a estos efectos; por ello, su diferenciación a células plasmáticas no se afecta notablemente.

### **CRH, AVP y ACTH**

La CRH suprime la actividad NK, y estimula la adenilciclase de los linfocitos T, evento que parece relacionarse a la inhibición del subtipo Th1, pero no del Th2; en concordancia con ello, esta hormona ha mostrado inhibir la síntesis de IL-2 (producto Th1). Es necesario señalar que, casi con seguridad, las pequeñas cantidades de CRH y AVP hipotalámicas son incapaces de afectar la reacción inflamatoria local; en cambio, la CRH y AVP producidas en el foco inflamatorio parecen ser reguladores fisiológicos de la inflamación.

La ACTH inhibe la producción de IFN y el número de células plasmáticas, estimulando en cambio la actividad de las células NK. Se desconoce si las formas circulantes tienen algún efecto sobre el foco inflamatorio, y parece más probable que la producción local (en el foco inflamatorio) de este mediador sea mucho más importante, tal como sucede con la CRH y la AVP.

## **Neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico y sus ramas periféricas**

Durante la respuesta de fase aguda se dan una serie de eventos autonómicos especiales, resultantes en gran parte de la activación del sistema simpático, rama periférica de las neuronas noradrenérgicas centrales:

- 1) Una redistribución del flujo cutáneo hacia zonas profundas, para minimizar la pérdida de calor por la piel y contribuir a la respuesta febril.
- 2) Sudoración disminuida.
- 3) Un incremento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial.

## Otros eventos endocrinos

Además de la elevación de CRH, ACTH y glucocorticoides, la respuesta de fase aguda se acompaña de otros cambios endocrinos:

- 1) Una elevación de la secreción de hormona del crecimiento.
  
- 2) Un incremento de la secreción de aldosterona.
  
- 3) Una disminución de la secreción de argininasopresina por la hipófisis posterior, a fin de reducir el volumen de fluidos corporales que deben ser calentados, contribuyendo así a la fiebre. Como vemos, las interacciones entre los elementos reguladores de la osmolaridad de los líquidos corporales establecen un juego muy especial durante la respuesta de fase aguda, que conduce a un incremento de la osmolaridad del LEC. Paradójicamente, algunos pacientes con enfermedades infecciosas o inflamatorias pueden presentar el síndrome de secreción inapropiada de ADH. Es probable que la IL-6 juegue algún rol en estos casos, ya que a grandes dosis, la IL-6 causa una elevación de la concentración de ADH (lo que indica que esta citoquina puede también activar las neuronas magnocelulares del hipotálamo).
- 4) Inhibición de la función tiroidea, que resulta del efecto inhibitorio de la síntesis hipotalámica de TRH por parte de las citoquinas IL-1 y TNF. Además, el cortisol inhibe la respuesta hipofisiaria a la TRH, contribuyendo a la inhibición tiroidea.
- 5) Inhibición de la función sexual: nuevamente, este efecto se debe principalmente a la acción de citoquinas sobre el hipotálamo. La IL-1 inhibe la liberación hipotalámica de GnRH (LHRH), y la IL-2 inhibe la liberación de FSH y LH actuando directamente sobre la hipófisis. Se especula que estos fenómenos existen para evitar que individuos enfermos se reproduzcan.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Determinar los efectos del estrés agudo por restricción de movimiento en la producción de IgA y en el número de linfocitos T y B en el NALT de ratones Balb/c

## **JUSTIFICACION**

Tomando en cuenta que el estrés es un problema de salud pública, y que trae como consecuencia alteraciones conductuales e inmunológicas y aunque actualmente la interacción psico-neuro-endocrino-inmunológica está bien demostrada, aún no se han descrito los efectos del estrés agudo sobre la composición celular y la secreción de IgA en el NALT.

## **HIPOTESIS**

El estrés agudo por restricción de movimiento modifica los niveles de IgA y el número de linfocitos T y B en NALT de ratones Balb/c

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el estrés agudo por restricción de movimiento modifica la producción de IgA y las poblaciones celulares de linfocitos T y B en tejido linfoide asociado a nariz de ratones Balb/C

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Determinar por EIA los niveles de corticoesterona en ratones control y sometidos a estrés agudo por restricción de movimiento.

Determinar por ELISA los niveles de IgA en lavado nasal de ratones Balb/C control y sometidos a estrés agudo por restricción de movimiento

Determinar por Citometria de flujo el número de linfocitos T y B en NALT de ratones Balb/C control y sometidos a estrés por restricción de movimiento

## MATERIALES Y METODOS

### SUJETOS

Ratones machos Balb/C obtenidos en el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN de 8 a 12 semanas de edad de 18 a 20 g de peso, alojados en jaulas de plástico en grupos de cinco, libres de patógenos, se excluirán los ratones que tengan menos de 8 semanas y/o aquellos que presenten infecciones o variaciones durante el desarrollo de la investigación. Cada grupo con una n=10

### Grupos muestrales

**Grupo I (Control):** Los ratones se mantendrán en condiciones normales dentro del medio en el cual habitualmente viven los animales de experimentación. Este grupo someterá a ayuno con restricción de agua durante 4 horas continuas y se tomara como grupo control. **Grupo II (Restricción de movimiento):** Los ratones recibirán un tratamiento de estrés agudo, por restricción de movimiento, por 4 horas continuas.

### REACTIVOS

- ❖ Alcohol del 96°
- ❖ RPMI 1X. Médium 1640                      162.0G - 10,000ML
- Se adiciona NAHCO3                      2.0G - 1000ML

Mezclado agregar antibiótico y suero fetal bovino y se afora a los 300ml y revisar pH a 7.3 se coloca en hielo.

- ❖ PBS1X Estéril

Se pesan los siguientes reactivos.

-NACL            8.0G

-NAK            0.2 G

-NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>    2.9 G

-KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>    0.2 G

- ❖ H<sub>2</sub>O Bidestilada

- ❖ PBS Tween

- ❖ Anticuerpo anti –Ratón IgA (α cadena específica) peroxidado, (desarrollado en chivo, aislada de anticuerpo específico de antígeno [SIGMA] *Life Science* A4789-1ML

- ❖ Buffer de carbonatos

-Carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> P.M. 105.9g                      0.79g  
-Bicarbonato de sodio NaHCO<sub>3</sub>                                      1.46g

Diluidos en 50 ml de agua bidestilada pH 9.6

❖ SOLUCIÓN DE SUSTRATO

-Acido cítrico 0.1M

3.125ml

❖ LECHE SVELTY 6%

## **PROGRAMA DE RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO**

Los ratones se colocan cada uno dentro de un tubo cónico de plástico de 9 cm de ancho, 3 cm de altura y 3,5 cm de diámetro con pequeños orificios de ventilación en las paredes para evitar la hipertermia, los animales podían realizar movimiento de sus extremidades y girar pero no presentaban movimiento longitudinal.

## **OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Después del ciclo de 4 horas en ambos grupos los ratones fueron anestesiados con éter dietílico, y luego sacrificados por dislocación cervical, colocándolos en una base de hielo, fueron obtenidas muestras de sangre para suero para cuantificar IgA por ELISA.

Posterior a la dislocación cervical, se abre cavidad torácica se localiza y disecciona tráquea, se corta la cabeza con la parte proximal de la tráquea y por la tráquea se realiza lavado nasal, para cuantificar anticuerpos IgA por ELISA; se disecciona el NALT y se abre cavidad abdominal, se localiza y extrae Bazo, ambos se analizarán por citometría de flujo.

### Suero

Por punción cardiaca, se extrae la sangre de ventrículo izquierdo con jeringa de insulina, se retira la aguja y se vierte la sangre deslizando por la pared del tubo para que se deposite en tubos ependorff previamente rotulados, y centrifugar a 5000 rpm durante 5 min, recuperar el suero y verterlo nuevamente en tubos ependorff, almacenando el suero a -78 °C

### Lavado nasal

Identificar tráquea, introducir cánula por tráquea, colocar la cabeza en posición vertical con la nariz hacia abajo, se realiza lavado traqueo-nasal colocando y se hacen pasar 1.5 ml de RPMI, se recaptura el lavado y se realizan otros dos lavados de la misma forma, se recaptura el lavado, filtrar con organza y realizar alícuotas de 1ml y almacenar en tubos ependorff, centrifugar 1500RPM/10 MIN/4°C, recuperar la suspensión en tubos ependorff limpios y almacenar en refrigeración a -78°C

### Tejido linfóide nasal asociado a nariz (NALT)

Diseccionar NALT, colocar en caja Petri ( 10 NALT) con 1.5 ml de RPMI y se disgrega al microscopio con un portaobjetos se recupera en un tubo cónico y se lleva a un volumen de 10 ml se filtra con organza y se pasa a otro tubo cónico, en tubos ependorff previa filtración con organza y el tubo se centrifuga, 1200RPM/5MIN/4°C. decantar el sobrenadante y se deja el Pellet, al cual se agregan 500 µL de RPMI 1X y se homogeniza la suspensión con una micropipeta, colocar en hielo, y cuantificar las células en microscopio con cámara de Neubauer, se realiza purificación de células y se colectan en esterilidad, para obtener la suspensión celular de células de tejido linfóide nasal

## Bazo

Disecar Bazo, y colocar en caja Petri (5 bazos) con RPMI y disgregar cada Bazo sobre una malla con un embolo, disgregar con 5 ml de RPMI en la malla por donde pasa toda la suspensión celular, recapturar la suspensión y filtrarla por organza, se coloca la suspensión en tubos cónicos de 15 ml y aforar a 10 ml, se coloca el tubo recto en hielo 10 minutos para obtener eritrocitos y retirarlos, pasando el sobrenadante a otro tubo y centrifugar 5 min. 4°C a 1200 rpm, decantar y se obtiene pellet y colocar 3 ml de PBS 1X, para obtener la suspensión celular de Bazo

### CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS IgA POR ELISA

Se determinó la concentración de anticuerpos IgA en lavado nasal de ratones Balb/C del grupo I y grupo II mediante ELISA. Se emplea una placa de ELISA de 96 pozos de poliestireno(Costar) Diluir el anticuerpo específico antígeno (conejo  $\alpha$ IgA mieloma ratón M 62, en buffer de carbonatos a una dilución de 1:100 en concentración de 1 $\mu$ g/pozo.

Emplear una pipeta multicanal, y se recubre la placa con 100 $\mu$ l de la solución de anticuerpo en cada pozo, cubriendo los pozos con el anticuerpo específico, cubrir la placa e incubar 24 hrs. 4°C,continuar con lavado de placa 3 veces con PBS-Tween, dejando la placa 1 min. con PBS-Tween entre cada lavado ; y 1 vez con PBS 1X, se continua con el bloqueo de la placa, se bloquea con leche Svelty al 6% colocando 100 $\mu$ L por pozo y se deja a 37°C por 2 horas continuar con lavado de placa 3 veces con PBS-Tween, dejando la placa 1 min. con PBS-Tween entre cada lavado ; y 1 vez con PBS 1X; agregar las muestras de lavado nasal y suero obtenidos previamente por triplicado, diluir el suero 1:200 y el lavado nasal 1:2 ambos con PBS-Tween; se deja una fila vacía por que van a ser los blancos e incubar 24 hrs. 4°C; posteriormente lavar la placa 3 veces con PBS-Tween, dejando la placa 1 min. con PBS-Tween entre cada lavado; agregar el anticuerpo Anti-IgA ratón peroxidado diluido 1:2000 con PBS-Tween e incubar 24 hrs.4°C lavar la placa 3 veces con PBS-Tween, dejando la placa 1 min. Con PBS-Tween entre cada lavado; añadir la solución de sustratos, cubrir la placa, e incubar 20 min a temperatura ambiente en oscuridad y detener la reacción con 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , leer la reacción en el lector de ELISA a 492nm.

### CITOMETRIA DE FLUJO

Se detecta la presencia de marcadores de superficie en linfocitos T y B, se emplean las suspensiones celulares obtenidas de Bazo y NALT

Se agregan 10  $\mu$ l de cada muestra en tubos endendorff para ver viabilidad y se agregan 90 $\mu$ l de azul tripano, se mezclan y se colocan las muestras en la cámara si no se ve nada centrifugar 1 min a 3000 rpm (ó de 800 a 1200 rpm 5 min), contabilizar células.

Tomar los tubos de la suspensión celular de Bazo y tejido linfoide nasal, se retira el sobrenadante y se deja el pellet de cada tubo, se decanta del lado contrario a donde se formo la pastilla, y se seca el tubo ya secos se mezcla ligeramente con lo que quedo, se preparan 3 tubos, uno con tinción negativa y los otros dos con anticuerpo se colocan en cada tubo la cantidad de microlitros para un millón de células más 500 $\mu$ l de paraformaldehído para el tubo de tinción negativa, se llevan a 4°C en oscuridad y la cantidad de microlitros para un millón de células más 10 $\mu$ l del anticuerpo para los tubos 2 y 3; se ponen 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, lavar con 1ml de PBS1X centrifugando 1200rpm 1 minuto, decantar

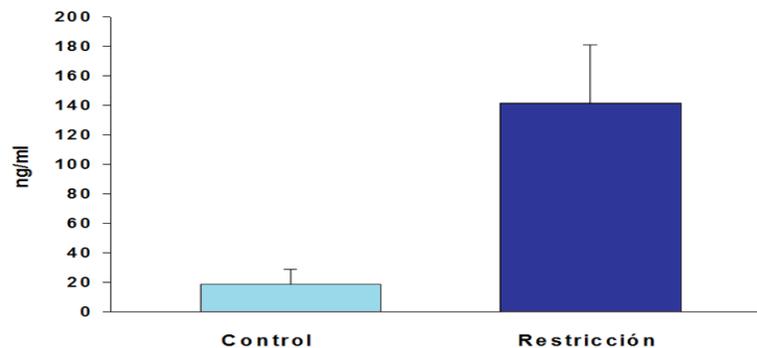
resuspender el pellet y volver a lavar con PBS1X, después de 2 lavados decantar, resuspender y agregar 500µl de paraformaldehído y guardar a 4°C para realizar la lectura en el citometro

## RESULTADOS

### Efecto del estrés agudo por restricción de movimiento en los niveles de corticosterona en suero

De acuerdo a los resultados obtenidos en suero de ratones estresados y control, por EIA para la cuantificación de los niveles de corticosterona, se presentó un aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con los ratones control.

#### CORTICOSTERONA



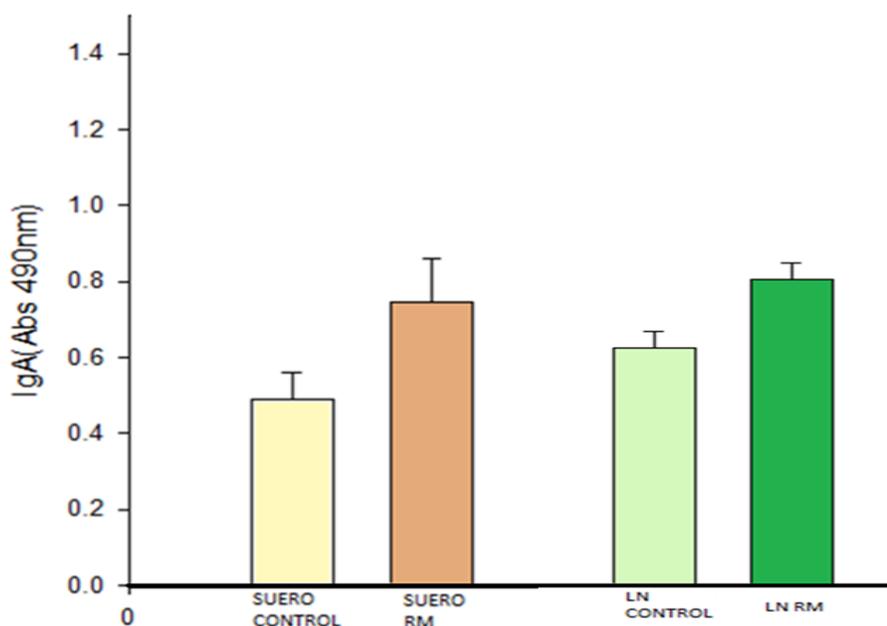
### Efecto del estrés agudo por restricción de movimiento en los niveles de IgA en suero

La restricción de movimiento incrementa los niveles de IgA en suero, los cuales incrementaron de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) en los ratones sometidos a restricción de movimiento por 4 horas

### Efecto del estrés agudo por restricción de movimiento en los niveles de IgA en lavado nasal

La restricción de movimiento incrementa los niveles de IgA en lavados nasales, los cuales incrementaron de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) en los ratones sometidos a restricción de movimiento por 4 horas

## CUANTIFICACION DE IgA



**Determinación del efecto del estrés agudo causado por la restricción de movimiento sobre las diferentes sub-poblaciones en Bazo y NALT de ratones Balb/c**

Los porcentajes de linfocitos fueron determinados por citometría de flujo. En el histograma de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC) se seleccionó la región de linfocitos y se adquirieron 10,000 eventos de dicha región.

**1) BAZO**

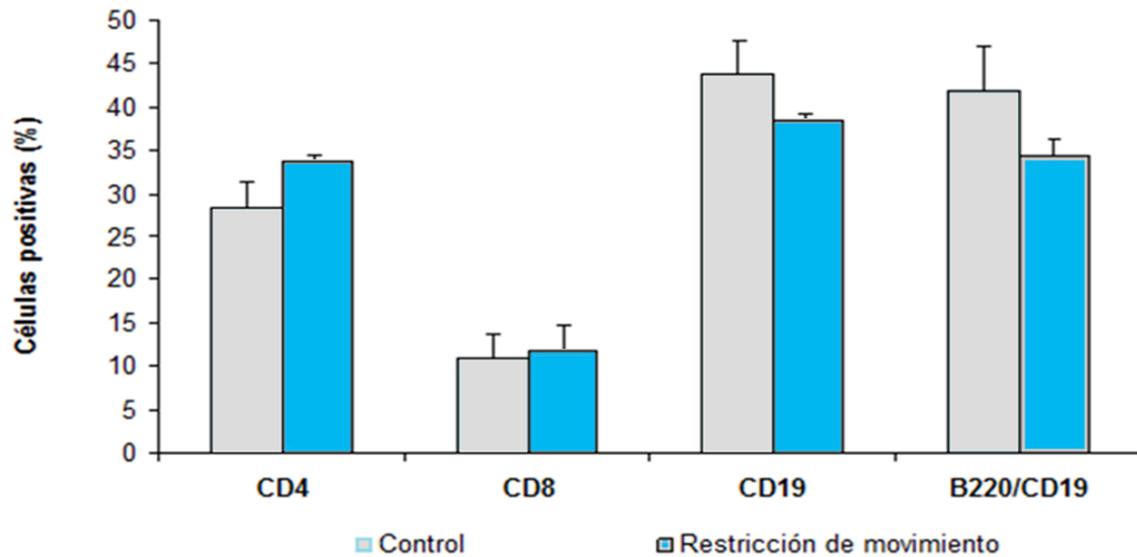
En bazo, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4 ( $p \leq 0.05$ ) y una disminución en el porcentaje de linfocitos B ( $p \leq 0.05$ ). Los linfocitos citotóxicos no mostraron ningún cambio significativo. (Cuadro 1, Figura 3).

**Cuadro 1. Efecto del estrés causado por la restricción de movimiento sobre las diferentes poblaciones linfoides de bazo.**

Grupo	CD4	CD8	CD19	B220/CD19
<b>1. Control</b>	28,44 ± 2.88	10,99 ± 2.74	43,73 ± 3.83	41,81 ± 5.25
<b>2. Restricción de movimiento</b>	33,73 ± 0.09*	11,75 ± 0.08	38,38 ± 0.13*	34,39 ± 1.87*

Los resultados representan la media ± D.S. de al menos 3 experimentos independientes entre si. \* $p \leq 0.05$

**BAZO**



**Figura 1.** Efecto del estrés causado por la restricción de movimiento sobre las diferentes poblaciones linfoides de bazo. Las barras representan la media  $\pm$  D.S. de al menos tres experimentos independientes entre si.

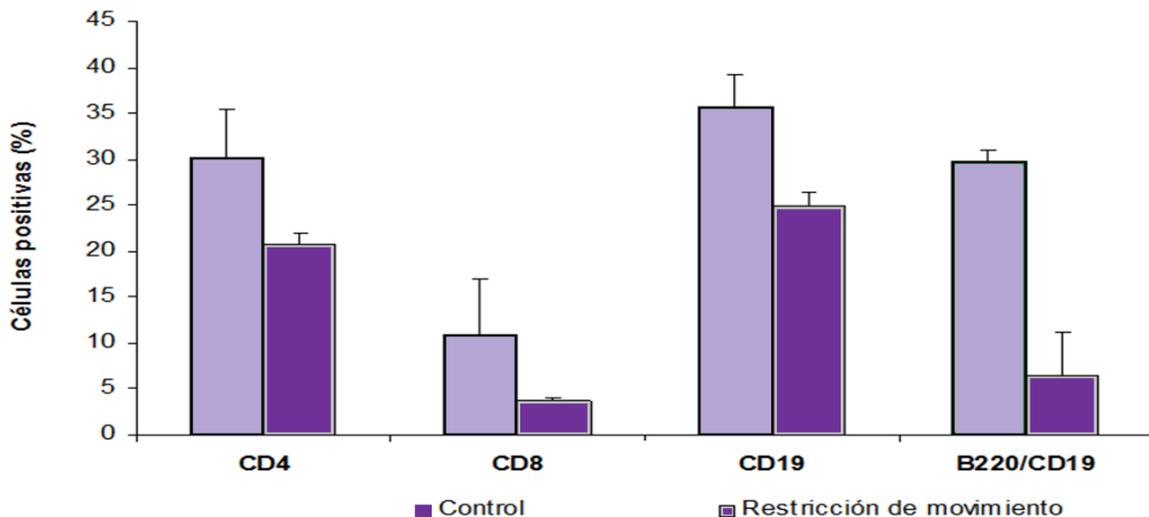
## 2) TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSA NASAL (NALT)

En tejido linfoides asociado a mucosa nasal NALT se observó una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T CD4+ ( $p \leq 0.05$ ) y de células B CD19+ ( $p \leq 0.05$ ) y B220+/CD19+ ( $p \leq 0.05$ ) en los ratones sometidos a estrés (Cuadro 2 y Figura 4).

**Cuadro 2.** Efecto del estrés causado por la restricción de movimiento sobre las diferentes poblaciones linfoides de NALT

Grupo	CD4	CD8	CD19	B220/CD19
1. Control	30,13 $\pm$ 5,22	10,90 $\pm$ 6,05	35,64 $\pm$ 3,54	29,81 $\pm$ 1,11
2. Restricción de movimiento	20,69 $\pm$ 1,19	3,69 $\pm$ 0,33	24,93 $\pm$ 1,58	6,42 $\pm$ 4,84

NALT



### ANALISIS DE DATOS

El análisis estadístico, se presenta con la media y con desviación estándar. Se realiza la comparación de dos grupos, para el análisis se utilizó el programa estadístico Sigma Plot 11

### DISCUSION

#### **El estrés causó un aumento significativo en los niveles de corticosterona séricos.**

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente trabajo, en primer lugar se determinó la medición de corticosterona a nivel sérico tanto en ratones estresados por nado y control para validar nuestro modelo de estrés.

Esta tendencia al aumento de esta hormona, relacionada con el estrés, debido a su incremento durante periodos de estrés de este tipo, pues se ha reportado que este aumenta la secreción de glucocorticoides a nivel de la glándula suprarrenal para mantener un efecto sistémico así como a nivel celular incluyendo células del sistema inmunitario como son los linfocitos T mediante los receptores tipo 2 para glucocorticoides, los cuales al ser de baja afinidad y solo verse involucrados en situaciones de estrés median una respuesta importante sobre estas células.

#### **El estrés modificó la cantidad de IgA tanto a nivel sérico como en los lavados nasales.**

Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de IgA con el estrés de 4 hrs en ratones adaptados al nado a comparación del grupo control. Estos cambios pueden relacionarse con los cambios tempranos que ocurren durante el estrés agudo (período de adaptación o modulación inmunológica) ya que el agotamiento ocurrido en un estrés crónico provocaría por efectos de inmunosupresión un decremento en el número de células. (Paca K K y Palkovits M 2001). En la literatura no se encontraron reportes del efecto del estrés o de sus hormonas sobre la secreción de IgA a nivel nasal aunque algunos estudios realizados en atletas de elite sugieren alguna relación entre el estrés, la inmunidad y la susceptibilidad a infecciones del tracto respiratorio superior. (Cohen S y cols 2001, 2002)

Llama la atención que a pesar del aumento de los niveles de IgA tanto a nivel sérico como de lavados nasales no se observaron cambios significativos en las poblaciones celulares de LT B, pudiendo deberse dicho aumento al Hominng o a los cambios vasculares induciendo una mayor permeabilidad a nivel de los vasos sanguíneos.

### **El estrés modificó la cantidad de los linfocitos T CD4+ en el NALT**

Los resultados de la cuantificación por citometría de flujo, mostró que los CD4+ son susceptibles a los efectos del estrés por nado.

En los animales estresados por nado el número de linfocitos T CD4+ aumento significativamente tanto a nivel del NALT como en nuestro control sistémico

(BAZO), mientras que el número de linfocitos T CD8+ y B no mostró cambios significativos.

Comparando los resultados del presente estudio con la literatura, el predominio de células CD4+ concuerda con varios estudios que reportan que la cantidad de linfocitos t cd4+ en el NALT murino, es aproximadamente cuatro veces mayor que los linfocitos T CD8+ (Asanuma H y cols 1997, Bienenstock J y Mcdermontt MR 2005).

Se sabe que el timo posee 4 poblaciones de timocitos, definidos como positivos simples CD4+ o CD8+, doble negativos o doble positivos (Smith L 1987) y que algunas de estas células inmaduras, son exportadas desde el timo hacia otros órganos linfoides secundarios como el bazo y nódulos linfoides (Antonica A y cols 1996) por lo que es posible que el NALT también sea un órgano de llegada de estas poblaciones celulares.

Esta reportado que en pacientes asmáticos, a los que se les aplicaron glucocorticoides sistémicos, presentaron a las 3 horas una disminución en el número de linfocitos circulantes CD3+CD4+ , mientras que los CD3+CD8+ no sufrieron modificaciones ( Karagiannidis C y cols 205). Pero además, se encontró que sujetos sometidos a entrenamiento físico moderado por 4 semanas , presentaron un aumento de los linfocitos CD4+ circulantes, así como un aumento en la excreción renal de cortisol y de la tasa adrenalina / noradrenalina urinaria (Makras P y cols 2005) y que la adrenalina a dosis fisiológicas , ocasiona una disminución de la relación CD4+/CD8+ , en sangre periférica a los 60 minutos de aplicado el fármaco (Cray B y cols 1983. Por lo que, tanto los glucocorticoides como las catecolaminas secretadas durante el estrés pudieron ocasionar que las células linfoides fueran probablemente movilizadas desde el NALT hacia la sangre.

Estos cambios dependerían de modificaciones en la expresión de moléculas de adhesión y/o de sus ligandos que permiten el alojamiento y la organización de los linfocitos en los órganos linfoides, entre ellos el NALT. (Csencsits K y cols 1999 , Xu B y cols 2003).

Otra posible causa de los cambios celulares sería la apoptosis ocasionada por el aumento de los glucocorticoides durante el estrés.

Al contrario de los CD4+, la cantidad de CD8+ permaneció prácticamente sin modificaciones en los dos grupos en estudio , lo que puede indicar que esta población en el NALT es más resistente a los efectos del estrés o sus hormonas, aunque un trabajo realizado en humanos menciona que el aumento de los glucocorticoides y catecolaminas posterior a un estrés agudo, provoca una leucocitosis moderada, la cual se debe en parte a un incremento en la cantidad de linfocitos T CD8+ en sangre periférica (Hening y cols 2000).

## **CONCLUSIONES**

- 1.- El esquema de estrés utilizado no provocó cambios significativos en los niveles de CD8+ y LT B.
- 2.- Las poblaciones celulares que aumentaron con el estrés por nado fueron los LT CD4+, así como la secreción de IgA en el fluido nasal y a nivel sérico, probablemente a una adaptación.
- 3.- Se sugiere que los efectos del estrés por nado sobre las poblaciones celulares del NALT, se ejercen a través de la influencia de las hormonas glucocorticoides por mecanismos como apoptosis o a su redistribución en la expresión de moléculas de adhesión.

## **PERSPECTIVAS**

- 1.- Analizar la expresión del componente secretor en células epiteliales del NALT.
- 2.- Analizar las células productoras de IgA en sitios inductores y efectores nivel de la mucosa respiratoria.
- 3.- Analizar la expresión de TGF-  $\beta$  e IL-5.
- 4.- Analizar los niveles de catecolaminas ( Adrenalina, noradrenalina).
- 5.- Analizar la expresión de moléculas de adhesión a nivel del NALT.
- 6.- Comprobar si durante el estrés ocurren procesos de apoptosis en el NALT.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Asanuma H, Hodson AT, Iwasaki T, Sato Y, Inaba Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S. Isolation and characterization of mouse nasal associated lymphoid tissue . J Immunol methods 1997; 202:123-131.
- 2.- Butcher EC, Scollary RG, Weissman IL, Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ – specific determinants on high endothelial venules. Eur J Immunol 1980; 10:556-561.
- 3.- Crary B, Hauser SL, Borysenko M, Kutz I, Hoban C, Ault KA , Wgeiner HL, Benson H. Epinephrine- induced changes in the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood of humans. J Immunol. 1983; 131: 119:57-60.
- 4.- Cohen JJ, Glucocorticoid – induced apoptosis in the thymus. Semin. Immunol 1992;4:363-369.
- 5.- Cohen S, Miller GE, Stress, Immunity, and susceptibility to upper respiratory infection. Psychoneuroimmunology. 2001;2:7-18.
- 6.- Csencsits KL, Jutila MA, Pascual DW, Nasal associated lymphoid tissue: phenotypic and function evidence for the primary role of peripheral node addressin in naïve lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site . J Immunol.1999; 163: 1382-1389.
- 7.- Dhabar FS, Miller AH Stein M, Mcewen BS, Spencer RL. Diurnal and acute stress-induced changes in the distribution of peripheral blood leukocytes subpoblations. Brain Behav Immun 1994; 8:66-79.
- 8.- Hening J, Netter P, Voight KH. Cortisol mediates redistribution of CD8+ but not of CD56+ cells after the psychological stress of pubic speaking. Psychoneuroendocrinology. 2001; 26:673-687.
- 9.- Makras P, Koukoulis GN, Bourikas G, Papatheodorou G, Bevedis K, Menounos P, Pappas D, Kartalis G. Effect of 4 weeks of basic military training on peripheral blood leucocytes and urinary excretion of catecholamines and cortisol. J Sports Sci. 2005;23:825-834.
- 10.- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. New England Journal Med 1998;338;171-179.
- 11.- Mebius RE, Organogenesis of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol.2003;3;292-303.

- 12.- Paca KK and Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* . 2001;4;502-548.
- 13.- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends immunol*. 2003;24:444-448.
- 14.- Tamura S, Iwasaki , Thompson AH, Asanuma H, Chen Z, Susuki Y, Aisawa C, Kurata T. Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J Gen Virol*.1998;79;291-299.
- 15.- Tristram GP, Stites dp, Terr Al. Imboden JB. *Inmunología Básica y clínica* 10ª eed. México: Manual Moderno; 2001.
- 16.- Wu HY, Rusell NM. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res*. 1997;16:187-201.