



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

"Efecto del Estrés Agudo Inducido por Restricción de Movimiento en Órganos Linfoides Primarios y Secundarios en Ratones Balb-C"

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

BIOL. ELIA MARCELA MARTÍNEZ BECERRIL

DIRECTORES DE TESIS

**DR. ALDO ARTURO RESÉNDIZ ALBOR
DRA. JUDITH DEL CARMEN PACHECO YEPEZ**



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 31 del mes Mayo del año 2011, la que suscribe Martínez Becerril Elia Marcela alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD con número de registro A080518, adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Aldo Arturo Resendiz Albor, Dr. Judith Pacheco Yépez y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto del Estrés Agudo Inducido por Restricción de Movimiento sobre Órganos Linfoides Primarios y Secundarios en Ratones Balb-C”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección marceliamtz68@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Elia Marcela Martínez Becerril

Nombre y firma

INDICE

	PAG
I. INDICE	4
ABREVIATURAS	6
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
II. INTRODUCCIÓN	11
Antecedentes generales	11
Generalidades sobre el sistema inmunitario	11
Órganos linfoides primarios	11
a) Timo	12
b) Médula ósea	13
Órganos linfoides secundarios	13
a) Bazo	13
b) Ganglios linfáticos	14
c) Tejido linfoide asociado a mucosas	15
Definición de estrés	16
Respuesta al estrés	17
Características de los protocolos de estrés	18
a) Estrés físico y estrés psicológico	19
b) Diferencias entre sexos y entre edades	19
Hormonas del estrés	20
Zonas del cerebro que se activan durante el estrés relacionadas con el sistema Inmunitario	21
Alteraciones cerebrales por el estrés	21
Inervación del tejido linfoide	22
Efectos de las hormonas del estrés sobre el sistema inmunitario	22
Otras sustancias que influyen sobre el sistema inmunitario durante el estrés	24
Influencia del estrés sobre el sistema inmunológico y su relación con las Enfermedades	25
Estrés agudo y estrés crónico	26
Diferentes protocolos de estrés	28
Antecedentes directos	29
Estrés por restricción de movimiento	29
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
IV. JUSTIFICACION	35
V. HIPOTESIS	36
VI. OBJETIVO GENERAL	37
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	37
VIII. MATERIALES Y METODOS	38
Animales	38
Protocolo de estrés	38
Obtención de muestras	38
Obtención de suero	38
Determinación de corticosterona	38
Obtención de órganos	39

	PAG.
Inmunotinción celular	39
Citometría de flujo	40
Análisis estadístico	40
IX. RESULTADOS	41
Niveles de corticosterona en suero	41
Poblaciones celulares	42
a) Bazo	43
b) Ganglios cervicales	44
c) Ganglios mesentéricos	44
d) Médula ósea	45
e) Placas de Peyer distales	46
f) Placas de Peyer proximales	46
g) Timo	47
X. DISCUSION	48
XI. CONCLUSION	52
XII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	53
ANEXO 1	75

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adenocorticotrofica
ADN	Acido Desoxirribonucleico
BALT	Tejido linfoide asociado a los bronquios
CAM	Molécula de adhesión celular
CD4+	Estirpe de linfocitos T cooperadores
CD8+	Estirpe de linfocitos T citotóxicos
CORT	Corticosterona
CRF	Factor liberador de catecolaminas
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNFB	2,4,-dinitro-1-fluorobenceno
dp	Región dorsal parvocelular
DTC	Dietilditiocarbamato
DTH	Hipersensibilidad tardía
EIA	Inmunoensayo enzimático
EPI	Epinefrina
GABA	Ácido gama amino butírico
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GTP	Guanosín trifosfato
GUALT	Tejido linfoide asociado al sistema génito-urinario
H-E	Técnica Histológica de Hematoxilina-Eosina
HPA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HSV	Virus del herpes simple
HS	Sistema hipotálamo simpático
IL-X	Interleucina X
IFN-γ	Interferon gama
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LTc	Linfocitos T citotóxicos
LTh	Linfocitos T cooperadores
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mARN	Acido ribonucleico mensajero
mp	Región medial paraventricular
NALT	Tejido linfoide asociado a la nariz
NE	Norepinefrina
NK	Linfocitos asesinos naturales
NKT	Linfocitos T asesinos naturales
PAG	Periacueducto gris
PVN	Núcleo paraventricular
SALT	Tejido linfoide asociado a la piel
sIgA	Inmunoglobulina A secretora
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
vmp	Región ventromedial parvocelular

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	PAG.
Fig. 1a	Fotografía del timo 12
Fig. 1b	Corte histológico de timo 12
Fig. 2a	Esquema de médula ósea 13
Fig. 2b	Corte histológico de médula ósea 13
Fig. 3a	Fotografía del bazo 14
Fig. 3b	Esquema del bazo 14
Fig. 3c	Corte histológico de bazo 14
Fig. 4a	Esquema de ganglio linfático 15
Fig. 4b	Corte histológico de ganglio linfático teñido con H-E 15
Fig. 4c	Corte histológico de ganglio linfático teñido con impregnación argéntica 15
Fig. 5	Corte histológico de placas de Peyer 15
Fig. 6	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal 20
Fig. 7	Concentración sérica de corticosterona 41
Fig. 8	Poblaciones celulares en bazo 44
Fig. 9	Poblaciones celulares en ganglios cervicales 44
Fig. 10	Poblaciones celulares en ganglios mesentéricos 45
Fig. 11	Poblaciones celulares en médula ósea 45
Fig. 12	Poblaciones celulares en placas de Peyer distales 46
Fig. 13	Poblaciones celulares en placas de Peyer proximales 46
Fig. 14	Poblaciones celulares en timo 47

TABLAS

Tabla 1.	Porcentajes de linfocitos en órganos linfoides primarios 42
Tabla 2.	Porcentajes de linfocitos en órganos linfoides secundarios 42

ANEXO 1

Fig. 15a	Primera toma de temperatura rectal 75
Fig. 15b	Toma de temperatura rectal durante la aplicación del protocolo de estrés 75
Fig. 16	Tubo cónico para restringir el movimiento 75
Fig. 17	Aplicación del protocolo de estrés 75
Fig. 18	Dissección del ejemplar anestesiado 75
Fig. 19	Exsanguinación y sacrificio del animal 75
Fig. 20a	Recuperación de la sangre para la obtención de suero 75
Fig. 20b	Obtención del suero 75
Fig. 21a	Extracción de bazo 76
Fig. 21b	Bazo en PBS 1X y en hielo <i>frappé</i> 76
Fig. 22	Extracción de ganglios cervicales 76
Fig. 23	Extracción de ganglios mesentéricos 76
Fig. 24	Ganglios linfáticos en PBS 1X y en hielo <i>frappé</i> 76
Fig. 25a	Obtención de placas de Peyer 76
Fig. 25b	Placas de Peyer en PBS 1X y en hielo <i>frappé</i> 76
Fig. 26a	Extracción del timo 76
Fig. 26b	Timo en PBS 1X y en hielo <i>frappé</i> 77
Fig. 27	Disgregación de órganos linfoides 77
Fig. 28a	Recuperación del filtrado celular 77
Fig. 28b	Segundo filtrado con organza 77
Fig. 28c	Obtención de la suspensión celular 77
Fig. 29a	Desollamiento de las patas traseras 77

Fig. 29b	Desarticulación de las patas traseras	PAG. 78
Fig. 29c	Obtención de los <i>femura</i>	78
Fig. 29d	Lavado de los <i>femura</i> para obtención de la médula ósea	78

RESUMEN

El estrés se considera como un padecimiento de nuestro tiempo y que afecta a un buen número de personas cotidianamente, en general las personas no entienden al estrés como algo que afecta su salud. Los estudios sobre el efecto del estrés específicamente sobre el sistema inmunitario realizados en modelos animales han demostrado que el efecto varía dependiendo de la tipo de estrés, de la duración del mismo y si se aplica de forma aguda o crónica. Los cambios en los porcentajes celulares de las diferente poblaciones de linfocitos producidas por la aplicación del protocolo de estrés por restricción de movimiento de forma aguda se ha estudiado como referencia y de manera paralela a otros parámetros como el efecto de las hormonas, pero no se ha puesto suficiente atención a dichos cambios. El objetivo del presente trabajo es establecer los cambios en los porcentajes de las poblaciones de LB B220/CD19, LB CD19, LT CD4 y LT CD8 en órganos linfoides secundarios, específicamente el bazo, los ganglios cervicales, los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer tanto proximales como distales durante el estado de estrés agudo inducido por restricción de movimiento y durante el posterior estado de recuperación de 2 h. Como referencia se determinaron los cambios poblacionales en órganos linfoides primarios y se midieron los niveles de corticosterona en suero. Las poblaciones fueron estudiadas por citometría de flujo y la corticosterona fue medida por ensayo inmunoenzimático (EIA). Efectivamente se observaron cambios en las poblaciones linfocitarias, aunque para conocer la naturaleza de los mismos se hace necesario para trabajos futuros estudiar el grado de apoptosis así como la expresión de integrinas.

ABSTRACT

Stress is considered a disease of our time, affecting a number of people every day, people usually do not understand the stress as something that affects your health. Studies on the effect of stress on the immune system specifically in animal models have shown that the effect varies depending on the type of stress, its duration and if applied acutely or chronically. Changes in cell percentages of different cell populations produced by the application of restraint stress protocol for acute motion has been studied as a reference and in parallel to other parameters such as the effect of hormones, but has not paid sufficient attention to these changes. The aim of this work is to establish changes in the percentages of the populations of LB B220/CD19, LB CD19, LT CD4 and LT CD8 in secondary lymphoid organs, specifically the spleen, cervical lymph nodes, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches proximal and distal both during the state of acute stress-induced restriction of movement and during the subsequent recovery status of 2 h. Reference population changes were determined in primary lymphoid organs and measured serum corticosterone levels. populations were studied by flow cytometry and corticosterone was measured by enzyme immunoassay (EIA). actual changes were observed in lymphocyte populations, but to know the nature of these is necessary for future work studying the degree of apoptosis and the expression of integrins.

INTRODUCCION

ANTECEDENTES GENERALES

Generalidades sobre el sistema inmunitario

El sistema inmunitario se compone de los órganos linfoides primarios y secundarios, todos los cúmulos de tejido linfoide en órganos no linfoides, los linfocitos de la sangre y la linfa y todos los linfocitos dispersos en el tejido conectivo y tejidos epiteliales del organismo. Las células del sistema inmunitario incluyen a los linfocitos y células madre linfocitarias, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, leucocitos granulares y mastocitos (Geneser, 2000). La función fisiológica del sistema inmunitario consiste en la defensa contra los microorganismos infecciosos, sustancias inorgánicas o ciertas circunstancias ajenas que si bien no tienen carácter infeccioso, puede despertar una respuesta inmunitaria (Abbas, 2008).

La respuesta inmune se divide en dos: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. La inmunidad innata, también llamada inmunidad natural o espontánea, aporta la primera línea de defensa y está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados y preparados para responder con rapidez a una infección. Los principales componentes de este tipo de inmunidad son: a) barrera físicas y químicas, b) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), c) linfocitos citolíticos naturales (NK), d) proteínas sanguíneas y e) citoquinas. La inmunidad adquirida, también llamada adaptativa o específica, posee como características definitorias una exquisita especificidad frente a diversas moléculas y la capacidad de reconocer futuras exposiciones al mismo agente para responder con mayor energía, éste tipo de inmunidad reconoce una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y conserva la capacidad de reaccionar al tener contacto con ellas. Los principales componentes de la inmunidad adquirida son los linfocitos T (cooperadores y citotóxicos) responsables de la inmunidad celular y los anticuerpos producidos por los linfocitos B diferenciados a células plasmáticas, responsables de la inmunidad humoral. Las sustancias ante las cuales reaccionan reciben el nombre de antígenos (Abbas, 2008).

Órganos linfoides primarios

El timo y la médula ósea constituyen los órganos linfoides primarios o centrales. En estos órganos se lleva a cabo la maduración de los linfocitos para transformarse en linfocitos B y linfocitos T respectivamente. Tal maduración implica que el linfocito adquiera especificidad hacia su antígeno determinado genéticamente. Una vez que el linfocito es capaz de generar una respuesta inmunológica entonces se denomina inmunocompetente. Todos los linfocitos se

generan en la médula ósea, una población de linfocitos se traslada al timo donde maduran transformándose en linfocitos T, la otra población se queda en la médula ósea donde maduran y se convierten en linfocitos B.

a) Timo

Es un órgano plano bilobulado situado arriba del corazón, detrás del esternón. Este órgano está rodeado por una cápsula y dividido en lóbulos separados por trabéculas de tejido conectivo. El compartimento más interno del órgano se denomina *medulla* donde se localizan de manera dispersa los timocitos (linfocitos T inmaduros) y por el compartimento externo llamado *cortex* y que presenta timocitos en cantidades mayores. Los timocitos crecen y maduran interactuando con macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. La función del timo es generar y seleccionar un repertorio de linfocitos T para proteger al cuerpo de las infecciones. Mientras los timocitos se desarrollan una enorme cantidad de receptores son generados por re-arreglos genéticos. Algunos de estos receptores son capaces de reconocer los complejos antígeno-MHC (complejo principal de histocompatibilidad), pero otros no. Más del 95% de los timocitos mueren por apoptosis en el timo sin haber llegado a la madurez, los timocitos que no reconozcan el complejo antígeno-MHC o los que reaccionen con el complejo autoantígeno-MHC y que puedan generar enfermedades autoinmunes, son eliminados de la población, la función del timo declina con la edad, alcanzando su tamaño máximo en la pubertad, atrofiándose después al presentarse una disminución importante en las células medulares y corticales, así como un incremento de tejido adiposo. El peso promedio del timo es de 30 g en niños y va decreciendo con la edad, a los 35 años la generación de nuevos linfocitos T se ha reducido al 20% comparado con el de un recién nacido y a los 65 años cae hasta un 2% (**Fig. 1a y b**).

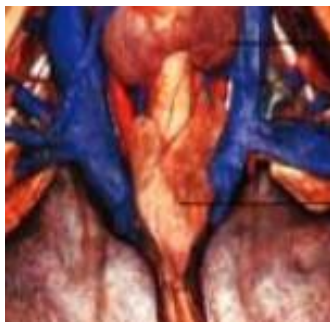


Fig. 1a. El órgano timo. Fotografía tomada de Yokochi *et al.*

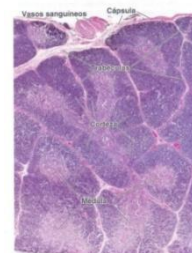


Fig. 1b. Corte histológico de un timo humano de lactante teñido con H-E, 25X. Fotografía tomada de Ross y Pawlina.

b) Médula ósea

Es un tejido complejo donde ocurre la hematopoyesis y es un depósito importante de lípidos que con el tiempo llegan a ocupar más del 50% del espacio de la médula ósea, se localiza en el interior de los huesos. En humanos y ratones los linfocitos B se originan y maduran en la médula ósea. Los linfocitos B inmaduros proliferan y se diferencian en la médula ósea debido al efecto de las citoquinas producidas por las células que forman parte del estroma. Los linfocitos B de la médula ósea son la fuente del 90% de inmunoglobulinas IgG e IgA en el plasma (**Fig. 2a y b**).

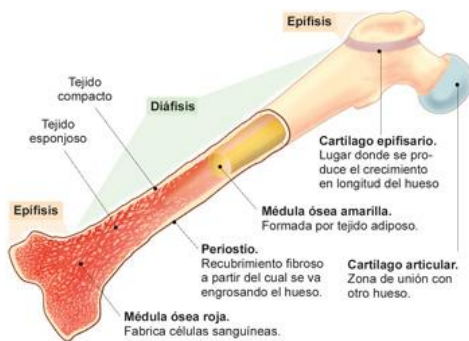


Fig 2a. Esquema de médula ósea.

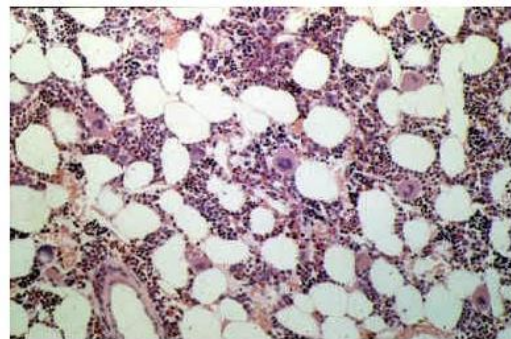


Fig 2b. Corte histológico de médula ósea teñida con H-E, 200X.

Fotografía tomada de Ross y Pawlina.

Órganos linfoides secundarios

Los órganos linfoides secundarios o periféricos incluyen a los ganglios linfáticos, al bazo y a todos los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT). En estos órganos es donde los linfocitos maduros interactúan con su antígeno. Varios tipos de tejidos linfoides organizados se localizan a lo largo de los vasos linfáticos, en los pulmones y en la lámina propia de la pared intestinal existe tejido linfoide consistente en poblaciones difusas de linfocitos y macrófagos. Los folículos linfoides son estructuras compuestas por poblaciones de células linfoides y no linfoides rodeados de capilares de vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos y el bazo representan los órganos linfoides secundarios más organizados, presentan zonas específicas para la actividad de los linfocitos T y B y además están rodeados por una cápsula.

a) Bazo

Es un órgano macizo localizado en la parte superior izquierda de la cavidad abdominal. El bazo filtra la sangre capturando a los antígenos que se encuentren circulando por ella a través de la arteria esplénica. La cápsula del bazo emite unas proyecciones hacia el interior del órgano formando dos compartimentos, la pulpa roja y la

pulpa blanca. La pulpa roja consiste en sinusoides rellenos de macrófagos que fagocitan a los eritrocitos viejos o defectuosos, por ello el bazo presenta una alta cantidad de hematíes, en contraste presenta poca cantidad de linfocitos. La pulpa blanca rodea las ramas de la arteria esplénica formando el escudo periarteriolar linfoide y poblada principalmente por linfocitos. Los folículos linfoides primarios ricos en linfocitos B se encuentran adyacentes a dicho escudo. El escudo periarteriolar presenta en la periferia la zona marginal, poblada por linfocitos y macrófagos. La arteria esplénica vacía su contenido en la zona marginal, donde los antígenos son atrapados por las células dendríticas y trasladados al escudo periarteriolar donde se encontrarán con los linfocitos activándolos. Una vez activados, linfocitos T y B se trasladan a los folículos primarios ubicados en la zona marginal donde se diferencian en linfocitos secundarios (**Fig. 3a, b y c**).

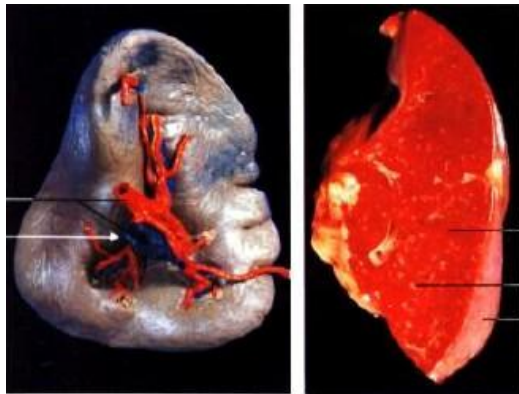


Fig. 3a. El órgano bazo. Fotografía tomada de Yokochi *et al.*

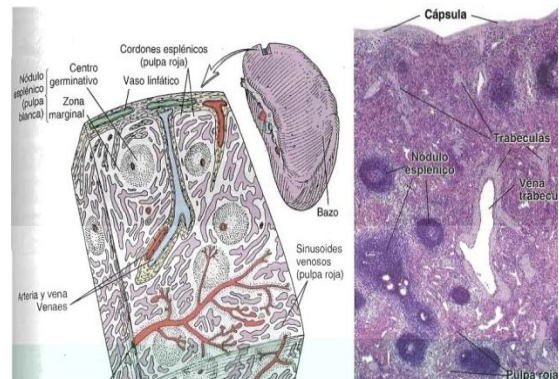


Fig. 3. b Esquema del bazo. **c.** Corte histológico del bazo teñido con H-E, 45X. Fotografía tomada de Ross y Pawlina.

a) Ganglios linfáticos

Son órganos macizos compuestos por una red de linfocitos, macrófagos y células dendríticas. Los antígenos son transportados, una vez que ingresan a los tejidos, por la linfa y de este modo llegan a los ganglios linfáticos donde serán reconocidos por las células presentadoras de antígeno activando así la respuesta inmunológica. El órgano está dividido en tres regiones concéntricas, la corteza, la paracorteza y la médula. La corteza es la parte más externa y está constituida por linfocitos principalmente de tipo B, macrófagos y células dendríticas foliculares, organizados en folículos primarios que se transforman en secundarios cuando el antígeno es reconocido. La parte media es la paracorteza y está formada principalmente por linfocitos cooperadores (LTc) y por células dendríticas provenientes de los tejidos y que expresan una gran cantidad de

moléculas MHC clase II. La médula está poco poblada por linfocitos pero presenta gran cantidad de células plasmáticas activadas produciendo anticuerpos. La activación de los LTc y la activación inicial de los linfocitos B se lleva a cabo en la paracorteza, las células plasmáticas diferenciadas migran, algunas se trasladan a la médula del ganglio y otras se mueven a la médula ósea a través de los vasos linfáticos (**Fig. 4a, b y c**).

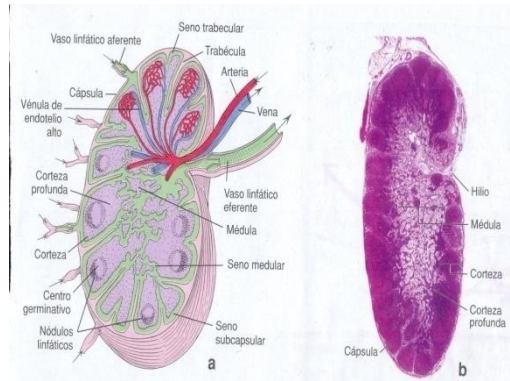


Fig. 4. a Esquema de ganglio linfático. **b** Corte histológico de ganglio linfático teñido con H-E, 18X. Fotografía tomada de Ross y Pawlina.

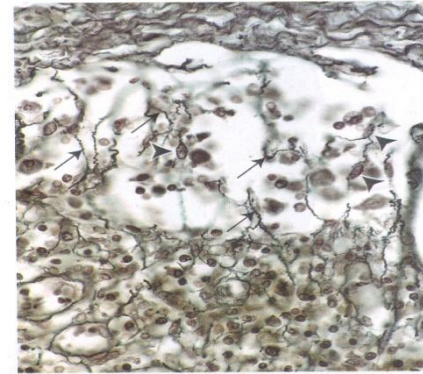


Fig 4. c Corte histológico de ganglio linfático teñido con impregnación argéntica, 640X. Fotografía tomada de Ross y Pawlina.

b) Tejido linfoide asociado a mucosas

Las membranas mucosas se presentan en los sistemas digestivo, respiratorio, urogenital y la piel, recubren al área del lumen. Las mucosas representan la principal vía de entrada de la mayoría de los patógenos. Estas membranas se encuentran protegidas por tejido linfoide conocido genéricamente como MALT. Dependiendo la zona reciben distintos nombres, el tejido asociado a la mucosa de las vías aéreas altas se denomina NALT, el asociado a vías aéreas bajas BALM, el asociado al sistema génito urinario es el GUALM, el asociado a la piel es el SALT y el más estudiado es el tejido linfoide asociado al aparato digestivo o GALT. Este tejido linfoide en las membranas mucosas está organizado a diferentes niveles, desde linfocitos agrupados en la lámina propia hasta estructuras bien organizadas como las placas de Peyer (**Fig 5**).



Fig 5. Corte histológico de ileon humano teñido con H-E, 40X. Las placas de Peyer se observan en la lámina propia. Fotografía tomada de Ross y Pawlina.

Una característica particular del MALT es presentar una gran población de células plasmáticas, que rebasa por mucho a las poblaciones presentes en la médula ósea, los ganglios linfáticos y el bazo juntas, estas células producirán sIgA (IgA secretora) característica de las secreciones mucosas. La capa epitelial mucosa externa presenta linfocitos intraepiteliales que son principalmente linfocitos T. Un tipo especial de célula denominada célula M es una célula epitelial plana y sin microvellosidades, su función es trasladar antígenos del lumen correspondiente a la lámina propia que se encuentra debajo de la capa epitelial por un proceso denominado transitis, la célula M presenta una invaginación como bolsa en su borde basolateral donde se localizan linfocitos B y T, células dendríticas y macrófagos, con los cuales se pondrá en contacto el antígeno al final de la transitis. La lámina propia contiene gran cantidad de linfocitos B, células plasmáticas, LTc activados y macrófagos, también se han observado gran cantidad de folículos linfoides.

En las mucosas las respuestas inmunes y la homeostasis local dependen del tráfico coordinado entre los linfocitos B y T efectoros y de memoria. La migración de células de manera organizada por el MALT y por sus sitios efectoros es la base para la integración y la regionalización del sistema inmune asociado a las mucosas (Bratzaeg *et al.*, 1999). El paso de los linfocitos del torrente sanguíneo al sitio efector depende de las moléculas de adhesión presentes en las membranas de los linfocitos y de las células endoteliales que interaccionan produciendo eventos combinados (Butcher *et al.*, 1996). Otras moléculas que intervienen en el reclutamiento de células del sistema inmune son las citocinas producidas por los linfocitos extravasados, las células endoteliales y de los leucocitos activados.

El primer paso de la migración de los linfocitos circulantes es independiente de su activación y mediado por moléculas de adhesión del tipo de las selectinas que reaccionan con ligandos tipo mucina, esto permite el posterior rodamiento de los linfocitos sobre la superficie del endotelio hasta que son detenidos por proteínas ligadas a moléculas de GTP, proceso controlado por quimiocinas que reaccionan con determinados receptores de membrana (Butcher *et al.*, 1996; Springer 1995 y del Pozo *et al.*, 1996). Después sigue una activación rápida de leucointegrinas que se unen a moléculas de adhesión en las células endoteliales de la superfamilia de las inmunoglobulinas que provocan que el leucocito quede detenido y finalmente sustancias quimioatrayentes en gradiente, dirigen la

migración de la célula detenida hacia el tejido en un proceso llamado diapédesis (Pozo *et al.*, 1996).

Definición de estrés

El término deriva del vocablo inglés *stresse* usado durante la Edad Media para denotar el sufrimiento y la pobreza de las personas, a su vez tiene su origen en los vocablos *destresse* y *estrece* del francés antiguo, ambos con significado de opresión, dolor y sufrimiento. La raíz más antigua de la cual deriva *estrece* es del latín *strictia*, término vulgar para el vocablo latino *strictus*, este último como pasado participio de *stringere* que significa oprimir, apretar o atar (Gómez y Escobar, 2006).

Hans Selye, pionero en el estudio del estrés, define a los estímulos nocivos como agentes estresores y a la respuesta del organismo le asigna el término de “síndrome de adaptación general” refiriéndose a la “respuesta no específica del cuerpo hacia cualquier estímulo”, dicho síndrome está dividido en tres estados: reacción de alarma, estado de resistencia y estado de agotamiento (Selye, 1936 y 1946). El estrés sea de origen psicoquímico o ambiental, rompe el estado equilibrado de homeostasis (Selye, 1956; Ray *et al.*, 1991), se considera un estímulo ambiental que provoca una reacción fisiológica del organismo constituida por diversos mecanismos de defensa para afrontar dicha situación que se percibe como amenazante, es en otras palabras, un estado de “amenaza” para la homeostasis, durante el cual se activa una respuesta adaptativa compensatoria (McEwen, 1998). Curtis en 1981 definió el estrés como cualquier situación o factor ambiental capaz de provocar una respuesta adaptativa como estresor. Un estresor son retos internos o externos que interrumpen la homeostasis (Ramsey, 1982). Chrousos y Gold (1988) definieron el estrés como un estado de disarmonía o una amenaza a la homeostasis, aunque aclaran que en individuos adaptados al esquema de estrés la homeostasis parece no alterarse. Para McEwen (2000) el estrés es una amenaza real o interpretada a la integridad fisiológica o psicológica que resulta en una respuesta conductual y/o fisiológica. El término alostasis se refiere al proceso adaptativo que mantiene la homeostasis a pesar de la adrenalina, el cortisol y otros mensajeros químicos (McEwen, 2005). Cuando un animal experimenta una sobreexpresión de la alostasis, puede presentar infecciones y enfermedades metabólicas o mentales. Actualmente el estrés se refiere al estímulo ambiental y a la respuesta provocada, tal respuesta antes se consideraba inespecífica pero en la actualidad se considera como un fenómeno común a nivel de organismo, órgano, tejido, a nivel celular y molecular (Perdrizet, 1997).

Respuesta al estrés

La respuesta al estrés es *per se* adaptativa (Fuchs *et al.*, 2001). Sin embargo, el estrés cuando es impredecible e incontrolable, especialmente cuando es crónico, puede tornarse en no adaptativo y al contrario, incrementa la vulnerabilidad cerebral a las enfermedades (McEwen, 2004; de Kloet *et al.*, 2005). En humanos, el estrés puede predisponer a las personas al desarrollo de desórdenes afectivos severos como la depresión mayor (Heim and Nemeroff, 1999; Campsi *et al.*, 2003).

La respuesta al estrés implica una serie de eventos a partir de un estímulo denominado estresor que activa el conocido eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y el sistema nervioso autónomo simpático, para ayudar al organismo a adaptarse fisiológicamente al desafío (Dhabhar *et al.*, 1997; Black, 2003). Dos moléculas que juegan un papel principal en la alostasis como respuesta al estrés, son el cortisol y la adrenalina / noradrenalina (Negrao *et al.*, 2000; McCarty *et al.*, 1996). Fisiológicamente el estrés se manifiesta por el aumento de la presión arterial, aumento del flujo sanguíneo hacia los músculos motores, aumento de la tasa metabólica celular, aumento de la concentración sanguínea de glucosa, aumento de la glucólisis en hígado y músculo, aumento de la fuerza muscular, de la actividad mental, así como de la velocidad de la coagulación sanguínea. Fisiológicamente esta respuesta al estrés se conoce como respuesta de alarma o de estrés (Guyton, 1997).

Características de los protocolos de estrés

Las formas más comunes de estresores con las que se ha experimentado y demostrado provocan cambios en el sistema inmunológico son la inmovilización, la restricción de movimiento, el nado forzado en agua fría y los choques eléctricos. Las características específicas de cada protocolo de estrés por ejemplo el tipo de estrés o la duración del mismo, puede producir inmunosupresión o bien una potenciación en la respuesta inmune (Khansari *et al.*, 1990). El estrés produce profundos efectos en el tráfico y en la distribución de los linfocitos (Dhabhar *et al.*, 1996; Dhabhar y McEwen 1996, 1997, 1999; Dhabhar 2000, 2003; Sheridan *et al.*, 1991). El estrés puede influenciar la función inmune induciendo daño en el material nuclear dentro de una célula inmune y/o alterar la capacidad de las células del sistema inmune para reparar los daños en el ADN (Forlenza y Baum, 2000). Existe evidencia para demostrar que al exponer animales de laboratorio a varios estímulos estresantes altera una variedad de parámetros de la inmunidad celular y humoral, tanto *in vivo* como *in vitro* (Keller *et al.*, 1991; Koolhaas y Bohus, 1994).

a) Estrés físico y estrés psicológico

Aunque los factores que inician el estrés físico y el estrés psicológico son diferentes, las formas en las que afectan al sistema inmunológico presentan muchas semejanzas (Butcher *et al.*, 2004). Los estresores físicos o psicológicos modulan al sistema inmunológico (Cohen y Hebert, 1996), los cambios en la función inmune depende de muchos factores incluido el tipo de respuesta inmune medida, el compartimento celular examinado y el tiempo de sometimiento al estrés (Laudenslager y Fleshner, 1994; Maier *et al.*, 1998; Moynihan *et al.*, 1996). Es conocido que el estrés de tipo físico o mental afecta las funciones gastroenterológicas, particularmente el síndrome de irritación del intestino grueso afecta en humanos principalmente a las mujeres (Drossman *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 1999). Se han comparado los efectos del estrés de naturaleza física con el de naturaleza psicológica sobre la inmunocompetencia y en ambos casos se presentan cambios pero de manera distinta (Ader *et al.*, 1991; Herbert and Cohen, 1993; Smith, 1995). El estrés psicológico parece ser tan importante como el estrés provocado por traumatismo físico en cuanto a la aparición de infecciones (Dreau *et al.*, 1999). El estrés de naturaleza psicológica se ha asociado con una predisposición y progresión a cierto tipo de enfermedades como el cáncer y las infecciones de tipo viral (Ben-Eliyahu S. *et al.*, 1991; Dobbs *et al.*, 1993; Munck *et al.*, 1991). El estrés psicológico puede modular la inmunidad mediada por células suprimiendo la proliferación linfocítica y la activación de células NK, disminuyendo el número de linfocitos CD4⁺ en sangre periférica y alterando la proporción de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ (Schedlowski *et al.*, 1993; Maes *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999; Engler *et al.*, 2004). Una variante del estrés psicológico es el estrés social el cual tiene un impacto particularmente en la susceptibilidad a los enteropatógenos aunque potencie ciertos aspectos de la respuesta inmune como la fagocitosis (Dreau *et al.*, 1999).

b) Diferencias entre sexos y entre edades

Se ha demostrado que el reclutamiento de neutrófilos durante la aplicación de un protocolo de estrés en ratas presenta diferencias significativas entre sexos (Barker *et al.*, 2005). El dimorfismo sexual es evidente en enfermedades respiratorias siendo los machos más susceptibles a infecciones respiratorias de tipo viral, bacteriano y por sepsis (Cannon y St. Pierre, 1997; Diodato *et al.*, 2001; Styrt y Sugarman, 1991; Yancey *et al.*, 2001), mientras que las hembras son más susceptibles a muchas enfermedades autoinmunes y presentan una mayor inmunorreactividad hacia cierto tipo de patógenos (Cannon y St. Pierre, 1997; Grosman 1984; Gulshan *et al.* 1990). Las hembras de muchas especies generalmente presentan respuestas

inmunológicas mayores que los machos (Gaillard and Spinedi, 1998; Klein, 2000; Schuurs and Verheul, 1990). La hipersensibilidad de efecto retardado (DTH) es mayor en las hembras de ratón (Matarese *et al.*; 2001; Ptak *et al.*, 1988), hembras de ratas (Elliot *et al.*, 2002) y en mujeres (Rees *et al.*, 1989) comparada con sus correspondientes machos. Se ha demostrado en ratas que el estrógeno afecta la actividad fagocítica de los macrófagos (Salem *et al.*, 1999), cierta actividad enzimática (Azevedo *et al.*, 2001) y la muerte intracelular (Chao *et al.*, 1994). Los estrógenos también parecen intervenir en la producción y liberación de citoquinas por parte de los leucocitos (Hu *et al.*, 1988; Pung y Luster, 1986; Salem *et al.*, 1999; Tsuyuguchi *et al.*, 2001) y esto parece influenciar la resistencia del hospedero a varias infecciones (de Souza *et al.*, 2001; Pung O. J. *et al.*, 1985). Con la edad comienza a haber problemas con la producción de las hormonas del estrés, de manera que en la madurez se presenta la “senescencia inmune” (Butcher *et al.*, 2004).

Hormonas del estrés

El sistema de estrés está constituido por el eje HPA y el sistema hipotalámico simpático (HS), que proveen el control de las respuestas al estrés a nivel periférico y central respectivamente (**Fig. 6**). Se considera que la activación del eje HPA después del estrés de tipo agudo tiene un efecto protector (Ader *et al.*, 1979; Besedovsky y Sorkin, 1977; Riley 1981).

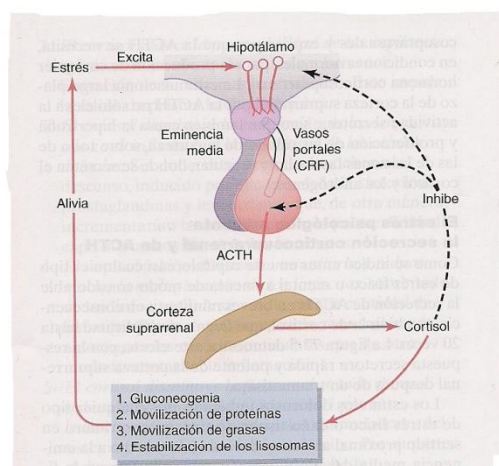


Fig. 6. Eje hipotálamo-hipofisis-adrenal

Estos sistemas se encuentran controlados por señales límbicas, circadianas, neurosensoriales y hormonales. Las situaciones de estrés, tales como la hiperglicemia, procesos inflamatorios, la fiebre, traumatismos, ejercicio intenso, cirugía y problemas emocionales, pueden activar este sistema (Pacak y Palkovits, 2001). Existe una región del hipotálamo denominada núcleo paraventricular (PVN), el estímulo que provoca el estrés activa esta región de diferentes maneras dependiendo la naturaleza del mismo, de manera que el agente estresor puede tener diferentes efectos sobre la secreción de glucocorticoides y catecolaminas (Kovacs *et al.*, 2005),

en particular la restricción de movimiento de tipo agudo estimula a las neuronas de la región medial parvocelular (mp) del PVN, neuronas que producen el factor liberador de catecolaminas (CRF) que a su vez estimulará a las neuronas de otras dos regiones del PVN, la región dorsal parvocelular (dp) y la región ventromedial parvocelular (vmp), éstas neuronas producen catecolaminas, el CRF llega por torrente sanguíneo a la médula de las glándulas suprarrenales donde se producen más catecolaminas, lo anterior forma parte del sistema hipotalámico simpático. Las catecolaminas tienen un papel central en los eventos relacionados con el estrés en un organismo, entre ellos la aparición de enfermedades infecciosas (Reiche, 2004). El sistema hipotálamo - hipófisis - adrenal se activa cuando el CRF llega a la hipófisis, en respuesta se producirán entre otras sustancias la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que por torrente sanguíneo llegará a la corteza de la glándula suprarrenal y provoca la producción de glucocorticoides. Los glucocorticoides son ampliamente inmunosupresivos (Munck *et al.*, 1984), por este motivo se usan en la clínica como antiinflamatorios (Schleimer *et al.*, 1989).

Zonas del cerebro que se activan durante el estrés relacionados con el sistema inmunitario

En la región medial parvocelular del hipotálamo existen neuronas que producen factor liberador de catecolaminas, durante el estrés esta hormona eleva la concentración de corticosterona en el plasma. En la periferia de la región magnocelular posterior también del hipotálamo se libera oxitocina que contribuye a que la interleucina 1 (IL-1) induzca la liberación de ACTH de la pituitaria (Watanobe *et al.*, 1995). El hipotálamo lateral puede participar en la regulación de la reactividad de la prueba de hipersensibilidad retardada en la piel (Wrona *et al.*, 1994; Juzwa *et al.*, 1995; Wenner *et al.*, 1996). Las proyecciones de las neuronas noradrenérgicas de las áreas A5 y A7 hacia la espina dorsal pueden contribuir a la activación de neuronas preganglionares que inervan los tejidos linfoides secundarios. La activación del *locus coeruleus* (LC) suprime la función de los linfocitos en el bazo y en sangre periférica de ratas, en particular éste es el sitio anatómico más importante que debe ser estimulado por el estrés para afectar al sistema inmune (Rassnick *et al.*, 1994). El periacueducto gris (PAG) bajo el efecto de la morfina, altera la función de los linfocitos y de las células NK.

Alteraciones cerebrales por el estrés

Dependiendo del tipo de estrés, físico o psicológico, se activan las neuronas del tallo cerebral o de las áreas del sistema límbico respectivamente, las cuales inciden sobre neuronas del NPV del hipotálamo que sintetizan hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Joseph-Bravo P y P. de Gortari, 2007). La elevación del cortisol a un nivel alto cotidiano provoca un efecto sobre

el tamaño del hipocampo, éste se presenta más pequeño en individuos sometidos a altos niveles de estrés, también estos individuos presentan una memoria reciente menos eficiente (Lupien *et al.*, 1998). Los niveles de cortisol en orina están relacionados con la función de la memoria (Seeman *et al.*, 1997). En primates no humanos existe una producción continua de neuronas en el hipocampo que es inhibida por el estrés (Gould *et al.*, 1998).

Inervación del tejido linfoide

Los tejidos linfoides primarios y secundarios están inervados por neuronas del sistema nervioso autónomo simpático, liberando norepinefrina como neurotransmisor. Estas neuronas se activan en el cerebro durante el estrés y alteran la función del sistema inmune. Los linfocitos y los macrófagos tienen receptores para este neurotransmisor así como para otro tipo de inmunomoduladores. Las células presentadoras de antígeno parecen no ser afectadas por la presencia o ausencia de nervios simpáticos (Callahan *et al.*, 2002).

La maduración y producción de los linfocitos, así como la síntesis de factor de crecimiento por las células de la médula ósea es alterada por el estrés (Tseilikman *et al.*, 1995; Khlusov *et al.*, 1993; Dygai *et al.*, 1992). El timo está inervado por nervios simpáticos y parasimpáticos, los primeros modifican la actividad linfocitaria. Los agonistas de las catecolaminas aceleran la maduración de los linfocitos en el timo (Singh, 1979), la liberación de los linfocitos se inhibe o estimula por los nervios parasimpáticos (Antonica *et al.*, 1994). Mas del 95% de fibras nerviosas en el bazo contienen norepinefrina y se ha identificado contacto entre las fibras nerviosas y los linfocitos CD4+ y CD8+, la inervación y los neuropéptidos liberados por los nervios simpáticos tienen su mayor efecto sobre los linfocitos T y las células dendríticas, se han detectado en el bazo la presencia en diferentes poblaciones de linfocitos diferentes tipos de receptores adrenérgicos (Khan *et al.*, 1986; Maisel *et al.*, 1989).

Efecto de las hormonas del estrés sobre el sistema inmunitario

El estrés puede exacerbar un buen número de enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide (Potter y Zautra, 1997; Zautra *et al.*, 1994), la colitis ulcerativa (Levenstein *et al.*, 1994), la inflamación estomacal (Dancey *et al.*, 1998) y el asma (Sekas y Wile, 1980). El estrés induce atrofia tímica aguda debida a la aceleración de la apoptosis de los timocitos inmaduros (Faris *et al.*, 1998; Tarcic *et al.*, 1998; Pruschy *et al.*, 1997; Nishina *et al.*, 1997).

Casi todas las células del sistema inmunitario poseen en sus membranas receptores para las neurohormonas del estrés adrenalina y noradrenalina, las fibras nerviosas simpáticas inervan extensamente los órganos linfoides como la médula ósea, el bazo, el timo y los ganglios

linfáticos, dichas vías nerviosas terminan cerca de los linfocitos (Reiche *et al.*, 2004). Se ha descubierto que existen microbios infecciosos que utilizan para su propio beneficio, los productos neurohormonales de la respuesta fisiológica al estrés, como la noradrenalina (Lyte, 2004). Las alteraciones sobre el sistema inmunitario inducidas por el estrés ocurren en los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y MALT) puesto que la estructura anatómica influencia los efectos de las hormonas del estrés sobre las células linfoides, además de ser el lugar donde ocurre la presentación del antígeno con las células efectoras. La activación del eje HPA (Keim and Sigg, 1976) y del sistema nervioso autónomo (Kvetnansky *et al.*, 1971) durante la aplicación de un protocolo de estrés de tipo agudo, se manifiesta con un incremento en la cantidad de catecolaminas y corticosterona en el plasma circulante. En contraste, se presenta una respuesta simpática-adrenal (específicamente en la médula de la glándula suprarrenal) (Konarska *et al.*, 1989) y respuestas particulares en el eje HPA (Hashimoto *et al.*, 1988) en animales expuestos nuevamente al estrés, es decir, existe una adecuación cuando el protocolo de estrés se vuelve de tipo crónico.

Las catecolaminas tienen un efecto proinflamatorio, es decir, estimulan la respuesta al estrés y la alostasis, en cambio, los glucocorticoides tienen un efecto contrario, es antiinflamatorio y tienden a volver al organismo a la homeostasis al provocar una retroalimentación negativa a la producción de CRF y evitar una sobreexpresión de la respuesta inmune (Munck *et al.*, 1984). Las catecolaminas (inducidas por una inyección de anferamina) tienen un efecto pronunciado en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en respuesta a un antígeno específico (Heilig *et al.*, 1993). Elevaciones agudas de catecolaminas afectan la migración de los linfocitos induciendo el egreso desde los órganos linfoides a la circulación. La epinefrina o el agonista β -adrenérgico isoproterenol puede facilitar esta migración disminuyendo la adhesión de los linfocitos T a las células endoteliales (Carlson *et al.*, 1996). Debido a que las vías nerviosas aferentes del PVN tienen su origen en la corteza cerebral, el efecto del estrés es distinto dependiendo de la naturaleza del estímulo ya que se percibe y registra de diferente manera.

Los glucocorticoides y las catecolaminas interactúan con receptores de las células inmunitarias, provocando cambios en su respuesta que incluyen modificaciones en el tráfico y proliferación celular, cambios en la secreción de citoquinas y anticuerpos, así como en la actividad citolítica (Dhabhar y McEwen, 2001; McEwen 1998; Padgett y Glaser, 2003). Estos receptores pueden ser activados de manera selectiva, por ejemplo, los elevados niveles de norepinefrina en el bazo pueden regular disminuyendo la expresión de los receptores para este

mismo neurotransmisor a manera de regular la respuesta inmune (Carr *et al.*, 1993). Las citoquinas pueden estimular el eje HPA y promover la producción de glucocorticoides y a su vez estos últimos ejercen una retroalimentación negativa hacia la producción y la liberación de las citocinas. Se ha comprobado la inhibición por parte de los glucocorticoides de IL-4, IL-5, IL-6 y IL-2, el IFN- γ y el TNF- α (Wiegers and Ruel, 1998; Richards *et al.*, 2001; Sapolsky *et al.*, 2001), la potenciación de la IL-10 (Blotta *et al.*, 1997; Richards *et al.*, 2001) y la cinergia con la IL-1, IL-4 e IL-6 (Wiegers *et al.*, 2005). En general los glucocorticoides inhiben la síntesis de las citocinas proinflamatorias o induce a las citocinas con potencial inmunosupresivo (Wiegers *et al.*, 2005). Las catecolaminas inhiben la IL-12 y potencian la producción IL-10 (Elenkov *et al.*, 1999), provocando ambos la actividad de los linfocitos Th2, es decir, promueven la inmunidad humoral (Elenkov *et al.*, 2002).

Particularmente el cortisol suprime el efecto de las citoquinas producidas por los linfocitos Th1 y Th2, el IFN- γ es menos sensible a dicha supresión pero IL-10 y la IL-12 parecen resistir su efecto (Skjolaas *et al.*, 2002). Además el cortisol suprime la proliferación de los linfocitos, la producción de la IL-2 y la función de los neutrófilos (Westley and Kelley, 1984; Blecha and Backer, 1986; Salak *et al.*, 1993), pero la citotoxicidad de las células NK se potencia (McGlone *et al.*, 1991). El estrés también provoca una inmunosupresión reflejada en granulocitosis (Kawamura *et al.*, 1997; Maruyama, Minagawa *et al.*, 1999) y atrofia tímica (Maruyama, Tsukahara *et al.*, 1999).

Otras sustancias que influyen sobre el sistema inmunitario durante el estrés

La sustancia P, el neuropéptido Y, la calcitonina, el péptido vasoactivo intestinal, la somatostatina, la hormona de crecimiento, la prolactina, la melatonina, encefalinas, endorfinas y otros opioides y la serotonina, son neuropéptidos, proteínas y hormonas que funcionan como inmunomoduladores de diferente manera durante el estrés (la naturaleza química, la concentración, el tipo de estrés, la activación de los receptores de membrana, la maduración de las células, etc). El neurotransmisor GABA puede regular la función inmune (Fride *et al.*, 1993).

También las células del sistema inmunitario, producen hormonas que regulan la función del sistema inmunitario. La hormona del crecimiento, la prolactina y el factor de crecimiento tipo 1 (como la insulina) son hormonas multipropósito que pueden ser sintetizadas por linfocitos y que pueden regular las funciones inmunológicas (Kelley *et al.*, 1992).

Influencia del estrés sobre el sistema inmunológico y su relación con las enfermedades

El sistema inmunológico es particularmente sensible al efecto del estrés (Dantzer and Kelley, 1989; Ray *et al.*, 1992). El estrés usualmente suprime al sistema inmunológico y está asociado a un incremento en la morbilidad de las infecciones, particularmente en las vías aéreas superiores (Caplan y Hoyt, 1985; Baker *et al.*, 1996; Hemila, 1996; Papiá *et al.*, 1999; Kohut *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2002) y a otras enfermedades (Cohen *et al.*, 1991; Fox 1981). La inmunosupresión ocasionada por el estrés tiene implicaciones significativas para la susceptibilidad y la progresión de ciertas enfermedades como por ejemplo el desarrollo de tumores (Sklar y Anisman, 1979; Temoshok, 1987), enfermedades autoinmunes (Shanks y Kusnecov, 1998), así como de enfermedades infecciosas influenciando en el proceso patológico (Olson *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1998). El estrés está directamente relacionado con múltiples enfermedades cardiovasculares (Esch, *et al.*, 2002a). El óxido nítrico (NO) de igual manera está relacionado con el estrés fisiológico y las enfermedades relacionadas (Esch *et al.*, 2002b). Otras moléculas involucradas son la melatonina (Brotto *et al.*, 2001) y la anandamida (Stefano, 2000) y la conexión con el NO y la respuesta del estrés también se ha propuesto (Stefano, 2001; Stefano, Fricchione *et al.*, 2001; Stefano, Murga *et al.*, 2001; Cordellini y Vassilieff, 1998; Gumusel *et al.*, 2001).

Las alteraciones inducidas por el estrés en la respuesta inmune mediada por células puede impactar la inmunocompetencia de manera tan significativa que el organismo se queda susceptible a diversas patologías, tales efectos incluyen la hipersensibilidad alterada de tipo retardado (Blecha *et al.*, 1994), la reducción en la proliferación de linfocitos T inducida por agentes mitogénicos, actividad alterada en las células NK (Keller *et al.*, 1981; Jain *et al.*, 1991) y cambios en el tráfico celular (Dhabhar *et al.*, 1995; Mizobe *et al.*, 1997). Incluso a pesar del tiempo, por ejemplo, Barreau *et al.* (2004) demostraron que la privación del cuidado materno en ratas provoca en el estado adulto una exageración en la respuesta inmune respecto a enfermedades gastrointestinales observadas en la densidad de mastocitos en la mucosa intestinal, la producción del tipo y cantidad de interleucinas proinflamatorias y la presencia de cierto tipo de mRNA, en ganglios mesentéricos, hígado y bazo. El estrés tienen una variedad de efectos sobre la función gastrointestinal (Soderholm y Perdue, 2001; Mawdsley and Rampton, 2005) incluida la motilidad intestinal, la secreción de iones, la secreción de mucina, la absorción, la adherencia de bacterias luminales y funciones inmunes en la mucosa.

Aunque el estrés suprime el sistema inmunitario, es interesante que los factores estresantes de tipo psicológico y el ejercicio moderado potencien las respuestas inmunes (Nieman, 1997; Nieman y Pedersen, 1999; O'Leary, 1990; Nash, 1994).

Se considera al estrés como un importante inmunomodulador pues se ha demostrado que muchos parámetros de la inmunidad son afectados por el estrés físico y psicológico (Khansari *et al.*, 1990; Moynihan, 2003; Agarwal y Marshall, 2001). Tales modificaciones en el sistema inmunitario por el estrés son específicas a nivel de órganos y tejidos (Sudo *et al.*, 1997 y Ader *et al.*, 1993) y dependen de factores como el tipo y la duración del estrés (Sieber *et al.*, 1992; Hale *et al.*, 2001; Weisse *et al.*, 1990; Cohen, Kearney *et al.*, 1999).

Se ha demostrado la relación entre los sistemas neuroendocrino e inmunológico (Berciz, 1986; Khansari *et al.*, 1990). A través de una variedad de mecanismos mediados neuroendocrinológicamente se ha demostrado que el estrés afecta numerosos aspectos de la inmunidad (Biondi, 2001) como por ejemplo la respuesta inmune celular a la infección por virus del herpes simple (HSV) en órganos linfoides secundarios (Bonneau *et al.*, 1991 y 1993), el cortisol suprime las funciones de los linfocitos T y la actividad de las células NK (Masera *et al.*, 1989; Munck *et al.*, 1984), la epinefrina aplicada en infusión *in vitro* inhibe la proliferación de linfocitos (Cray *et al.*, 1983). Se ha reportado que el estrés generalmente induce la inmunosupresión de las respuestas inmunitarias celulares, pero parece no afectar las respuestas inmunitarias humorales (Rook *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 1991) debido a que los dos tipos de inmunidades están reguladas por diferentes grupos de linfocitos T cooperadores (Mosmann y Sad, 1996). Las respuestas celulares están reguladas por linfocitos Th1 que producen IL-2, IFN- γ y linfotoxina, las respuestas humorales por linfocitos Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. El aumento en la concentración de corticosteroides suprime la acción de las células Th1 pero estimula a las Th2 (Daynes y Araneo, 1989; Ramírez *et al.*, 1996).

Estrés agudo y estrés crónico

Existen muchos reportes de interacciones entre la frecuencia / intensidad en la administración del estresor y cambios en el sistema inmune (Moynihan y Santiago, 2007). El estrés de tipo agudo suele potenciar la respuesta inmune, mientras que el estrés de tipo crónico es inmunosupresivo (Dhabhar y McEwen, 1996 y 1997). El estrés presenta un efecto diferente en la producción de anticuerpos dependiente de los linfocitos T y también el efecto de las hormonas del estrés como las catecolaminas y la corticosterona se ve incrementado en el estrés agudo mientras que en el estrés crónico parecen no alterarse (Silberman *et al.*, 2003) Dhabhar and

McEwen en 1997 investigaron el efecto del estrés de manera aguda contra crónica con respecto a la DTH en respuesta a la administración del 2,4-dinitro-1-fluorobenceno (DNFB). El estrés crónico usualmente es inmunosupresivo (Dhabhar and McEwen, 1996 y 1997) a diferencia del estrés agudo observado en ratas, ratones y hamsters donde aparentemente la función inmune se incrementa por lo menos en la piel, en otras palabras, el estrés de tipo agudo suele potenciar la respuesta inmune, mientras que el estrés de tipo crónico es inmunosupresivo. Aplicando un protocolo de estrés por restricción de movimiento, las respuestas HPA producidas por estrés agudo son de mayor intensidad que las del estrés crónico y en el primero se observan alteraciones importantes en la redistribución de linfocitos y en la expresión de las CAM's, en cambio en el estrés de tipo crónico estas alteraciones no se presentan (Bauer *et al.*, 2001).

Breves periodos de estrés pueden incrementar el número de células y generalmente potencia la respuesta inflamatoria (Dhabhaar *et al.*, 1996; Flint *et al.*, 2001, 2003). Algunos cambios en el sistema inmunitario comúnmente reportados por la exposición a un estresor de tipo agudo incluye la supresión de la proliferación mitogénica y alogénica (Fleshner, Bellgrau *et al.*, 1995; Laudenslager *et al.*, 1983), la respuesta de anticuerpos séricos (Fleshner *et al.*, 1996; Fleshner, Hermann *et al.*, 1995; Moynihan *et al.*, 1994; Solomon, 1965), la respuesta citotóxica de las células NK (Ben-Eliyahu *et al.*, 1991), en la producción de citoquinas producidas por los linfocitos Th1 (Cocke *et al.*, 1993; Fleshner, Deak *et al.*, 1995; Glaser *et al.*, 1986; Fleshner *et al.*, 1994) y la función fagocítica de los macrófagos (Spehner *et al.*, 1996), sin embargo existen trabajos donde se reporta la potenciación del sistema inmunitario, como por ejemplo un incremento en la producción de citocinas de los linfocitos Th2 (Fleshner *et al.*, 1994), de la respuesta de hipersensibilidad de efecto retardado (Dhabhar y McEwen, 1996), la liberación de prostaglandina E2 por parte de los macrófagos (Jiang *et al.*, 1990; Morimoto *et al.*, 1991), IL-6 (Weinberg *et al.*, 1994) y NO (Coussons-Read *et al.*, 1994). La exposición a un estresor de tipo agudo en suero aumenta la cantidad de corticosterona, altera algunas proteínas y fiebre que persiste por varios días después del cese del estímulo (Deak *et al.*, 1997; Fleshner, Deak *et al.*, 1995). El estrés de tipo agudo está asociado con la elevación de la enzima timidilato sintetasa, requerida para la reparación y replicación del ADN en los leucocitos periféricos (Ehrmrooth *et al.*, 2002). La respuesta al estrés agudo severo (como el trauma físico) o estrés crónico moderado (como el emocional) puede tener efectos detrimentales y sostenidos sobre el sistema inmunitario (Padgett y Glaser, 2003) incluida la susceptibilidad potenciada a las infecciones (Padgett, Marucha *et al.*, 1998). El estrés psicológico agudo (como el duelo), afecta la relación entre el

sistema neuroendocrino y el inmunológico. Se han hecho estudios sometiendo a personas a estrés psicológico y se determinó que el estrés disminuye la inmunidad, lo comprobaron infectando con virus a los pacientes y observaron la poca capacidad para enfrentar la enfermedad (Cohen *et al.*, 1991, 1999; Cohen, 1995, Reid *et al.*, 2001; Takkouche *et al.*, 2001; Marsland *et al.*, 2002)

Aplicando como estímulo un toque eléctrico en la pata de ratas, se descubre que el estrés crónico por un periodo considerable de tiempo, afecta la neurogénesis del hipocampo cerebral (Dagyté *et al.*, 2009). Las respuestas en el eje HPA varían incluso si el protocolo de estrés crónico es aplicado de manera constante o de manera intermitente, esto se refleja en la elevación continua de la cantidad de glucocorticoides en el plasma circulante en el primer caso (Bauer *et al.*, 2001). El estrés crónico también induce la susceptibilidad al daño en el ADN en linfocitos humanos (Dimitroglou *et al.*, 2003). Exposiciones prolongadas a situaciones de estrés han estado asociadas a la aparición de ciertas neuropatologías (Willner y Mitchell, 2002) y es ampliamente conocido que el estrés crónico y las enfermedades psiquiátricas asociadas como la depresión profunda, el desorden post-traumático por estrés y la ansiedad, pueden modular la respuesta inmune (Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005; Calcagni y Elenkov, 2006).

Diferentes protocolos de estrés

Se cuenta con una considerable cantidad de evidencia que demuestra que la exposición de animales de laboratorio a diferentes factores estresantes, altera diferentes parámetros inmunológicos tanto celulares como humorales *in vivo* e *in vitro* (Keller *et al.*, 1991; Koolhaas and Bohus, 1994). El efecto del estrés por inmovilidad es mayor a nivel psicológico que físico (Antoni, 1986). Estudios realizados provocando estrés por inmovilidad por 2 h en ratas demostraron que induce cambios rápidos y de gran magnitud en las subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica, estos cambios implican el tráfico celular y la redistribución de leucocitos entre la sangre y los tejidos, proceso regulado por la hormona adrenal corticosterona (Dhabhar *et al.*, 1995). En el estrés por inmovilidad prolongada (de 12 h a 24 h) en ratones se descubre que en la inmunosupresión están involucradas las hormonas esteroideas justo al final de la respuesta al estrés así como los glucocorticoides endógenos. A ratones a los que se les extirparon las glándulas suprarrenales el TNF- α desapareció y la IL-6 se suprimió parcialmente (Shimizu *et al.*, 2000). En este mismo esquema de estrés se ha estudiado la relación de las hormonas esteroideas liberadas después del estrés con los nervios simpáticos (Sagiyama *et al.*, 2004). La inmunosupresión provocada por la inmovilidad se ha observado en el sistema inmunitario

adquirido, en cambio el sistema inmunitario innato se potencia (Minagawa *et al.*, 2000; Oya *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Estrés por restricción de movimiento

Uno de los primeros trabajos es el de Bühler *et al.* (1978), quienes descubren que el estrés provoca la liberación de las catecolaminas adrenalina, noradrenalina y dopamina. Levine y Saltzman (1987) reportaron la disminución del grado de recaída en la encefalomiелitis alérgica experimental, mediada por linfocitos T, provocada en ratas. La disminución fue significativa por un protocolo de cinco días de restricción de movimiento por siete horas diarias y por inyección de corticosterona o dexametasona. La exposición aguda de 2.5 h al estrés produce el incremento en los niveles plasmáticos de ACTH y CORT, niveles que disminuyen cuando se aplica este protocolo de estrés de manera crónica de 10 a 14 días (Armario *et al.* 1988; Hauger *et al.*, 1990). La exposición diaria por 2h de una a cuatro semanas (Natelson *et al.* 1988) o de 6h por cuatro a cinco semanas (Hashimoto *et al.* 1988) también produce habituación a las respuestas al estrés. Konarska *et al.* (1989) estudian la respuesta simpática-médula adrenal en ratas estresadas por 30 minutos por varios días, descubrieron que los niveles de catecolaminas séricas, particularmente epinefrina (EPI) y norepinefrina (NE), disminuyen por el tratamiento crónico.

El estrés por restricción de movimiento induce una variedad de mediadores neuroendocrinos que funcionan como inmunomoduladores en combinación con la corticosterona (Ader *et al.*, 1990; Pacak *et al.*, 1998). Pierzchala *et al.* (1990) aplican el protocolo en ratas y estudian su efecto sobre parámetros fisiológicos como peptidasas plasmáticas y metaencefalinas. Aplicando la restricción de movimiento de manera crónica en ratas, se descubre que después de la primera sesión de estrés de 30 min de duración, se establece una ruta de facilitación a la respuesta relacionada con la activación del eje HPA con la subsecuente producción de ACTH en balance con el efecto de retroalimentación provocado por la corticosterona producida (Akana *et al.*, 1992). En un experimento similar pero inmovilizando a las ratas, Andrés *et al.* (1998) demuestran que la “ruta facilitada” cambiaba con el esquema de estrés aplicado, la duración del mismo y el intervalo entre la aplicación del protocolo de estrés.

Mönnikes *et al.*, (1992) estudiaron el efecto del CRF sobre el vaciamiento estomacal y el tránsito en el colon en ratas sometidas al estrés demostrando que el vaciamiento gástrico se retrasa y se estimula el tránsito en el colon, años después, en el 2005, Nakade *et al.*, demuestran el mecanismo asociado al CRF que provoca el vaciamiento gástrico. Zhou *et al.* (1993) aplican el

protocolo de forma aguda por 1h antes de sacrificar a las ratas para estudiar la IL-6 y su relación con la activación del HPA. El estrés agudo por restricción de movimiento se considera como psicológico (Glavin *et al.*, 1994). Melia *et al.* (1994) aplicando el protocolo de estrés, de manera aguda y crónica, estudian la expresión del mRNA c-fos, un marcador de la actividad neuronal alterada, en varias zonas del cerebro de ratas. Esta respuesta fue muy variable incluso entre las ratas sometidas al estrés crónico en diferente número de sesiones, mostrando cierto tipo de adecuación. Saunders *et al.*, (1994) aplicaron el protocolo 4h y observaron el efecto sobre la permeabilidad del intestino de ratas, en un trabajo posterior (Saunders *et al.*, 1996) reportan que la restricción de movimiento aumenta la reacción inflamatoria de la colitis.

Mabry *et al.* (1995) estudiaron los niveles de epinefrina (EPI) y norepinefrina (NE) plasmáticas en ratas adultas jóvenes y adultas longevas sometidas a la restricción de movimiento de manera aguda y crónica descubriendo que las ratas viejas presentan una elevación de las catecolaminas mayor que las jóvenes durante el tratamiento de tipo agudo y que las ratas viejas difieren en la respuesta simpática-médula adrenal con respecto a las jóvenes en algunos aspectos solamente.

Banerjee *et al.* (1997) aplican este protocolo de estrés, considerado como físico y emocional, combinado con el efecto del diclorodifeniltricloroetano (DDT), sobre la respuesta inmunológica humoral. Saito *et al.* (1997) demuestran que la cantidad elevada de catecolaminas en el plasma durante una cirugía inhibe el crecimiento de los fibroblastos y su proliferación. Padgett *et al.* (1998) aplican este protocolo de estrés de manera aguda y reportan un retraso en el proceso de cicatrización de un 27% en ratones, presumiblemente los glucocorticoides están involucrados en esto. De manera crónica produce una profunda inhibición de la salida de plasma sinovial inducido por bradiquinina, posiblemente mediado por la corteza adrenal, que se traduce en la disminución en la respuesta inflamatoria (Strausbaugh *et al.*, 1999). Eijkelkamp *et al.* (2007) reportan que la contribución del sistema nervioso autónomo simpático tiene un efecto benéfico para la cicatrización, mediado por los receptores α -adrenérgicos.

Iwakabe *et al.* (1998), aplican el protocolo de estrés por 24 h a ratones demostrando la inhibición en la actividad de las células NK y el aumento en la concentración de corticosterona en suero, además de estudiar el balance de entre los linfocitos Th1 y Th2, demostrando que un desequilibrio cargado hacia la actividad de los linfocitos Th2, entre otras cosas porque el estrés por restricción de movimiento inhibe fuertemente la producción de IFN- γ paralelamente a la disminución de la actividad de las células NK, también inhibe la producción de IL-4 por las

células Th2, este desbalance estimula la aparición de enfermedades infecciosas y desórdenes alérgicos. Sheridan *et al.* (1998) estudian el efecto del estrés por restricción de movimiento sobre ratones infectados con virus del herpes y de la influenza, reportan cambios fisiológicos importantes en la respuesta inmune. El estrés crónico induce la reducción en la población de linfocitos por medio de la expresión del gen llamado Fos que provoca la producción de opioides endógenos, que son los que inducen la apoptosis (Yin *et al.*, 1999 y 2000).

Shimizu *et al.* (2000) aplicaron el protocolo de estrés por 12 h y 24 h y reportan una severa leucopenia en los órganos, pero los linfocitos NKT son resistentes. Oya *et al.* (2000) reportan en ratones específicamente que las poblaciones de linfocitos NK y los NKT se modifican de manera importante por la restricción de movimiento aplicado por 12 h y 24 h. Pruett *et al.* (2000) estudian los efectos de la corticosterona exógena y la restricción de movimiento en ratones en los cambios en las poblaciones linfocíticas en bazo y timo. Yin *et al.* (2000) aplican el protocolo a ratones por 12 h por dos días presentando una reducción significante en esplenocitos por un proceso apoptótico y además independiente del sistema HPA pero sí dependiente de los opioides endógenos. Ziegler *et al.* (2000) aplican el protocolo para estudiar específicamente la región paraventricular del hipotálamo.

La restricción de movimiento de forma aguda en cerdos, potencia la citotoxicidad de las células NK durante la primera hora y después se reduce hasta la cuarta hora del estrés en que vuelve a la citotoxicidad basal (Wrona *et al.*, 2001). Sudo *et al.* (2001) demuestran que la restricción de movimiento produce leucopenia en las Placas de Peyer debido a la apoptosis y a la migración celular. Tsukada *et al.* (2001) demuestran que la inhibición en la motilidad en el intestino delgado en ratas ocasionado por el protocolo de estrés se debe a los adenorreceptores $\beta 3$. El estrés por restricción de movimiento administrado durante una infección secundaria de HSV puede afectar la habilidad de los linfocitos T de memoria $CD8^+$ para reconocer el virus de los sitios de la mucosa relevantes clínicamente (Wonnacott *et al.*, 2002). El estrés por restricción de movimiento de tipo agudo en ratas induce la activación de los receptores de membrana de las células NK a nivel de colon y asociado a disfunciones estomacales y la activación de las células cebadas (Bradesi *et al.*, 2002) y en la vejiga (Spanos *et al.*, 1997). Willner y Mitchel, (2002) toman como modelo este tipo de estrés para el estudio de algunos aspectos de los síntomas producidos por la depresión en ratones muy parecidas a las presentadas por los humanos.

Este protocolo aplicado como reto por 2 h en un estudio donde se observó la respuesta de hipersensibilidad de efecto retardado (DTH) en hamsters de ambos sexos según el fotoperiodo,

midiendo las concentraciones plasmáticas de testosterona, estradiol y cortisol (Bilbo y Nelson, 2003), se observó un aumento significativo en la DTH promoviendo la migración de las células inmunes de la circulación a los tejidos (Bilbo *et al.*, 2002; Dhabhar, 2000; Dhabhar and McEwen 1999).

Aplicando este protocolo de estrés en ratones por mucho tiempo previo y durante la infección manipulada con el virus del herpes simple, Anglen *et al.* (2003) demuestran el efecto del estrés sobre la evolución de la encefalitis provocada por el virus. Silberman *et al.* (2003) aplican el protocolo de estrés de manera crónica y aguda para observar el efecto sobre la producción de anticuerpos. Shi *et al.* (2003) reportan que el estrés de tipo crónico induce la apoptosis en los linfocitos y discuten el papel del eje HPA y de los opioides endógenos relacionados. Zelena *et al.* (2003) aplican el protocolo de manera crónica en ratas, estrés de 1 h por 7 días, estudian el rol del hipotálamo durante el estrés crónico. Sharma *et al.* (2004) descubren que la L-arginina, precursor para la liberación de óxido de nitrógeno, modula la respuesta inmune al estrés por restricción de movimiento en ratas y ratones.

A nivel molecular, el estrés por restricción de movimiento por 2h activa los genes que determinan la apoptosis y la proliferación celular (Flint *et al.*, 2005). Kanemi *et al.* (2005) estudian las variaciones en las poblaciones linfocitarias, incluidos los linfocitos NK, aplicando el protocolo de estrés por 2h en pulmones, analizando las poblaciones por citometría de flujo y por histoquímica descubriendo que las poblaciones se modifican debido a la activación de receptores β adrenérgicos. Obminska-Mrukowicz y Szczypka (2005) estudian la influencia del dietilditiocarbamato (DTC) y del zinc como suplementos alimenticios sobre la respuesta celular de restauración en ratones Balb-c aplicando el protocolo por 12 h a ratones en dos ocasiones separadas por un día, demuestran que la restricción de movimiento causa involución de los órganos linfáticos, la disminución en porcentaje de los timocitos maduros ($CD4^+$) e inmaduros ($CD4^+$ y $CD8^+$), disminución en porcentaje de los esplenocitos ($CD4^+$, $CD8^+$ y $CD19^+$) y disminución la producción de IL-1. El estrés por restricción de movimiento produce hipotermia e hiperglicemia (Watanabe *et al.*, 2008). Xu *et al.* (2008) aplican el protocolo en ratones genéticamente modificados a los cuales se les provocó de manera experimental colitis, observaron que el estrés aumenta la severidad del padecimiento pero que opera de manera independiente del IFN- γ

Aplicando este protocolo de estrés por tres semanas se evidencia una disminución en la respuesta inmunológica por parte de los linfocitos T cooperadores, específicamente la reducción a

la respuesta a los agentes mitógenos, una disminución en la producción de IFN- γ , TNF- α y una clara disminución en la cantidad de linfocitos CD4⁺ sin cambios en las poblaciones de linfocitos CD8⁺ (Frick *et al.*, 2008).

Aplicando este protocolo de estrés de manera aguda y por dos horas, demostró que el estrés tiene relación con la expresión de la IL-10 y de otras interleucinas de la misma familia como la IL-9, la IL-20 y la IL-24 en bazo de ratón y combinado con un reto de inyección de lipopolisacáridos, parece ser que dos horas son suficientes para notar el efecto inmunomodulatorio provocado por el estrés (Curtin, Kingston *et al.*, 2009). El estrés por restricción de movimiento suprime la producción de IFN- γ , pero activa la liberación de la IL-12 e incrementa la producción de la citocina proinflamatoria IL-10, que a su vez inhibe la producción del IFN- γ y la IL-12 (Curtin, Noreen *et al.*, 2009).

Campisi *et al.* (2003) estudiaron la expresión de los genes Hsp durante la aplicación de este protocolo de estrés. Estas proteínas protegen a las células de los efectos del estrés y están presentes en procariontes y eucariontes (Tobian *et al.*, 2004). Matsuo *et al.* (2009) aplicando el protocolo de manera aguda en ratones, estudian la expresión de genes Hsp en colon y su relación con las bacterias comensales y los glucocorticoides.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés como estímulo produce cambios en el sistema inmunitario de diferentes maneras. La distribución linfocitaria es un reflejo de la respuesta inmunológica ante el estrés así que consideramos importante conocer como se modifican éstas poblaciones en los órganos linfoides primarios y secundarios durante la aplicación de un protocolo de estrés por restricción de movimiento, usando como modelo ratones Balb-C.

JUSTIFICACION

Los trabajos publicados sobre el efecto del estrés por restricción de movimiento sobre el sistema inmunológico se han limitado a la cantidad de células en sangre periférica, en hígado y bazo, se ha puesto más atención en parámetros como la temperatura, los niveles de glucosa y el efecto de las catecolaminas, entre otros parámetros fisiológicos, más que a la distribución linfocitaria, o más bien este fenómeno se estudia como corroboración de la respuesta inmune paralela a la elevación de los niveles de catecolaminas y glucocorticoides producidos. El presente trabajo pretende aportar información específicamente sobre las modificaciones en cantidad y proporción de las células del sistema inmunitario en órganos linfoides primarios y secundarios, así como su correlación con la concentración de corticosterona liberada medida en suero aplicando este protocolo de estrés y en un futuro comparar los efectos con otros protocolos y de esta manera analizar un fenómeno que hasta la fecha solo se ha revisado muy someramente.

HIPOTESIS

La aplicación de un estrés agudo inducido por restricción de movimiento provocará cambios en la distribución de las diferentes poblaciones linfocitarias en los órganos linfoides primarios y secundarios estudiados.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés agudo inducido por restricción de movimiento sobre las poblaciones de linfocitos B y T en órganos linfoides primarios y secundarios de ratones Balb/c.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si el estrés agudo inducido por restricción de movimiento modifica los niveles de corticosterona sérica en ratones Balb/c.
2. Analizar si el estrés por restricción de movimiento modifica el porcentaje de linfocitos en médula ósea y timo.
3. Analizar si el estrés por restricción de movimiento modifica el porcentaje de linfocitos en bazo, ganglios cervicales, ganglios mesentéricos, placas de Peyer del segmento proximal y distal.
4. Analizar si el estrés por restricción de movimiento modifica el porcentaje de linfocitos en ratones Balb/c sometidos al protocolo de estrés por restricción de movimiento y posterior recuperación de 2 h en los órganos antes mencionados.

MATERIALES Y METODOS (VER ANEXO 1)

Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c, de 20-25 g de peso mínimo proporcionados por el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN mantenidos en un ciclo de 12 hrs de luz / 12 hrs de oscuridad con comida y agua a libre demanda antes de ser requeridos para los ensayos. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las normas de la Comisión de Bioética de la Escuela Superior de Medicina. Se ocuparon un total de 15 ratones por experimento, Grupo 1) grupo control y que no fueron sometidos al protocolo de estrés, Grupo 2) estrés por restricción de movimiento, y fueron sacrificados inmediatamente después de aplicado el esquema de estrés por 4 h, y finalmente el Grupo 3) Grupo de Recuperación, fueron estresados por 4 h y sacrificados después de 2 h de aplicado el estres.

Protocolo de estrés

Se les tomó la temperatura vía rectal con un termómetro digital marca Virbac de uso veterinario antes de aplicar el protocolo de estrés y cada hora hasta antes del sacrificio (**Fig. 7a y 7b**). Los ratones se colocaron cada uno durante 4 horas dentro de un tubo cónico de plástico de 9 cm de ancho X 3 cm de altura X 3.5 cm de diámetro con pequeños orificios de ventilación en las paredes para evitar la hipertermia, éste tubo les permite mantener el movimiento de sus extremidades y girar pero no presentaban movimiento longitudinal (**Fig. 8 y 9**).

Obtención de muestras

I. Obtención de suero

Los ratones se anestesiaron con éter etílico en un vaporizador, se colocaron en posición supina en una charola de disección y se hace un corte longitudinal (**Fig. 10**), se cortaron las costillas izquierdas en su base para dejar expuesto el corazón aún latente y con una jeringa de insulina se extrajo toda la sangre del corazón (**Fig. 11**) y se trasladó a un vial donde coaguló (**Fig. 12a y b**). Después se retiró el coágulo con un palillo y se centrifugó el vial a 3000 rpm por siete minutos. El suero recuperado se separó en otro vial y fue almacenado en congelación a -70°C.

II. Determinación de Corticosterona

Los niveles de corticosterona fueron determinados en el suero mediante un inmunoensayo enzimático (EIA), utilizando el *kit* de la marca Stressgen, con base a las instrucciones del fabricante. La lectura de la placa se realizó en un lector de ELISA (BIO-RAD), a una longitud de onda de 405 nm. Se realizó una curva estándar para conocer la concentración de corticosterona (ng/ml) ajustando los valores problema con los de referencia.

III. Obtención de órganos

El bazo, los ganglios cervicales, los ganglios mesentéricos, las placas de Peyer (proximales y distales) y el timo son retirados con unas finas pinzas de relojero (**Fig. 13a, 14, 15, 17a y 18a**) y colocados en un contenedor con PBS-1X inmerso en una cama de hielo *frappé* (**Fig. 13b, 16 15b, 17b y 18b**). Durante todo el proceso es importante mantener las células en hielo *frappé* para evitar su deterioro.

Todas las suspensiones celulares se prepararon en paralelo como se describe a continuación. Los órganos linfoides se removieron asépticamente de los animales sacrificados bajo anestesia, se disgregaron sobre una malla de acero inoxidable (diámetro de 0.0021-in.) con ayuda del émbolo de la jeringa de insulina en 10 ml de PBS-1X (**Fig. 19**) Posteriormente las suspensiones celulares que contienen los linfocitos se filtrarán a través de una malla de organza estéril en un tubo Falcon de 15 mL completando el volumen a 10 mL y se centrifugaron 10 min a 1500 rpm (**Fig. 20a, b y c**). En el caso particular del bazo y debido a la gran cantidad de glóbulos rojos, se dejó reposando en el hielo el tubo 10 min para que sedimenten los hematíes que fueron eliminados, al término del tiempo se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se procesó como el resto. Finalmente las pastillas celulares se resuspendieron con 2 ml de PBS-1X. La viabilidad celular se realizó con la prueba de exclusión con Azul Tripano y observada al microscopio en una cámara de Neubauer donde se contaron las células vivas.

Para obtener la médula ósea se desollaron las patas traseras del ratón (**Fig. 21a**) y se desarticularon las *femura* de la cintura pélvica (**Fig. 21b y c**), con las tijeras se retiraron los músculos y se cortaron ambas epífisis sujetando el hueso con las pinzas de relojero, posteriormente con una jeringa de insulina se hizo un lavado de la médula ósea con PBS-1X, el líquido obtenido se colocó en un tubo conico de 15 mL (**Fig. 21d**) y se procesó como el resto de las suspensiones celulares.

IV. Inmunotinción celular

Todos los ensayos fenotípicos para la caracterización de los linfocitos se realizaron en paralelo. Posterior al aislamiento de los linfocitos totales, se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en PBS 1x, y se incubaron con 10 μ l de los *cocktails* de anticuerpos diluidos 1:100 durante 30 min a temperatura ambiente y en obscuridad. Posteriormente las células se lavaron por centrifugación con 500 μ l de PBS durante 5 min a 1300 rpm y se fijaron con 400 μ l de *p*-formaldehído al 1%, finalmente se almacenaron en obscuridad a 4°C hasta su análisis. El fenotipo de superficie se analizó usando mAb anti-ratón (Becton Dickinson Technologies,

Gaithersburg, MD) obtenidos de BD PharMingen (San Diego, CA), como se describe a continuación: tinción negativa (TN) auto-fluorescencia celular, tinción 1 (T1): CD3⁺APC/CD4⁺PERCP/CD8⁺PE y tinción 2 (T2): B220⁺PERCP/CD19⁺PE.

V. Citometría de flujo

Para realizar el análisis por citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia relativa se midió en un citometro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson San Jose, Ca) equipado con un laser de 15 mW ion-argón y filtros para analizar FITC (530 nm), PE (585 nm) y PerCP (>650nm). Se adquirieron un total de 10,000 eventos y se separaron a partir de la población de linfocitos totales. El análisis de la población se realizó utilizando el software CellQuest® (Becton Dickinson).

VI. Analisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Sigma Plot, versión 11.0. En todos los casos se compararon las medias de los resultados obtenidos entre el grupo control, el grupo de estrés y el grupo de recuperación (*t* de student). La significancia estadística se considero cuando el valor de *p* fue de ≤ 0.05 . Se realizaron cinco experimentos independientes entre si utilizando 5 ratones por grupo.

RESULTADOS

Niveles de corticosterona en suero

La concentración de corticosterona en suero fue determinada por ensayo inmunoenzimático (EIA) para los tres grupos de experimentación, obteniéndose las siguientes concentraciones: grupo control (15.48 ± 4.55), grupo de ratones sometidos a estrés (159.07 ± 13.78) y el grupo de recuperación (65.38 ± 17.74)

Se observó un aumento significativo ($p < 0.001$) de la concentración de corticosterona en el grupo sometido al protocolo de estrés por restricción de movimiento para después disminuir durante el periodo de recuperación de 2 h, aunque no regresa a su nivel basal.

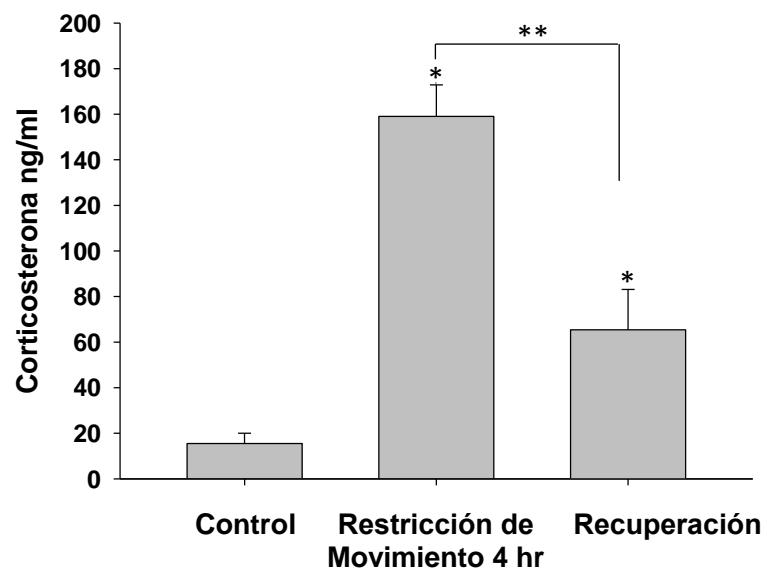


Fig. 7 Concentración sérica de corticosterona en respuesta al estrés agudo inducido por restricción de movimiento. Los datos representan la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes entre sí. * $p=0.001$ (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales. ** $p=0.001$ diferencia entre el grupo de estrés agudo inducido por restricción de movimiento vs grupo de recuperación.

Poblaciones celulares

Los porcentajes de linfocitos determinados por citometría de flujo se presentan en forma de graficos de barras a partir de los gráficos generados asociando tamaño (FSC) y granularidad (SSC) celular tomando en cuenta un total de 10,000 en cada región.

Se estudiaron cuatro poblaciones celulares: linfocitos B (CD19), linfocitos B inmaduros (B220/CD19), linfocitos T cooperadores (CD4⁺) y linfocitos T citotóxicos (CD8⁺).

Tabla No. 1. Porcentajes de linfocitos en órganos linfoides primarios

MEDULA OSEA

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4	CD8
CONTROL	40.3 ± 3.4	45.14 ± 5.5	0.43 ± 0.2	0.22 ± 0.4
RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO	41.92 ± 2.4	46.71 ± 4.1	1.08 ± 0.4	0.23 ± 0.1
RECUPERACION	37.47 ± 3.2	45.85 ± 3.6	0.23 ± 0.4	0.67 ± 0.3

TIMO

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4/CD8
CONTROL	0.15 ± 0.4	0.14 ± 0.5	84.55 ± 2.2
RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO	0.11 ± 0.4	0.37 ± 0.6	87.59 ± 2.4
RECUPERACION	0.35 ± 0.2	0.18 ± 0.6	91.13 ± 3.4

Tabla No. 2. Porcentajes de linfocitos en órganos linfoides secundarios

BAZO

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4	CD8
CONTROL	45.6 ± 3.4	40.7 ± 5.5	45.1 ± 7.2	30.5 ± 5.4
RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO	54.3 ± 2.4	56.6 ± 4.1	60.3 ± 2.4	35 ± 6.1
RECUPERACION	50.4 ± 3.2	45.3 ± 3.6	45.3 ± 8.4	30.9 ± 4.3

GANGLIOS CERVICALES

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4	CD8
CONTROL	50.16 ± 1.4	45.51 ± 2.5	46.2 ± 3.2	34.63 ± 5.4
RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO	35.19 ± 2.4	24.42 ± 4.1	54.98 ± 2.4	13.46 ± 6.1
RECUPERACION	45.07 ± 3.2	22.08 ± 3.6	43.95 ± 2.4	15.44 ± 4.3

GANGLIOS

MESENTERICOS

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4	CD8
CONTROL	31.31 ± 1.9	22.74 ± 0.59	45.84 ± 1.6	15.36 ± 3.1
RESTRICCION DE MOVIMIENTO	40.6 ± 3.9	35.86 ± 3.2	45.68 ± 2.1	15.67 ± 2.8
RECUPERACION	30.76 ± 1.54	24.84 ± 4.8	44.07 ± 2.7	20.97 ± 3.4

PLACAS DE PEYER DISTALES

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4	CD8
CONTROL	45.17 ± 1.9	38.2 ± 0.59	70.59 ± 1.6	21.02 ± 3.1
RESTRICCION DE MOVIMIENTO	53.14 ± 3.9	57.14 ± 3.2	51.17 ± 2.1	25.16 ± 2.8
RECUPERACION	52.18 ± 1.54	50.19 ± 4.8	58.17 ± 2.7	20.14 ± 3.4

PLACAS DE PEYER PROXIMALES

TRATAMIENTO	CD19	B220/CD19	CD4	CD8
CONTROL	36.42 ± 1.9	58.65 ± 0.59	69.29 ± 1.6	20.79 ± 3.1
RESTRICCION DE MOVIMIENTO	43.15 ± 3.9	65.17 ± 1.2	50.25 ± 2.1	22.7 ± 2.8
RECUPERACION	40.17 ± 1.54	60.14 ± 1.8	55.17 ± 2.7	20.5 ± 3.4

a) Bazo

En bazo se muestra que el efecto del estrés inducido por restricción de movimiento incrementa de manera significativa ($p < 0.001$) el porcentaje de linfocitos B de (40.7 ± 5.5) en el grupo control a (56.6 ± 4.1) en grupo de restricción, CD19 de 45.6 ± 3.4 del grupo control a 54.3 ± 2.4 el grupo sometido a estrés y de CD4 de 45.1 ± 7.2 del grupo control a 60.3 ± 2.4 el grupo sometido a restricción de movimiento. En el grupo de recuperación todas las poblaciones recuperaron los niveles basales.

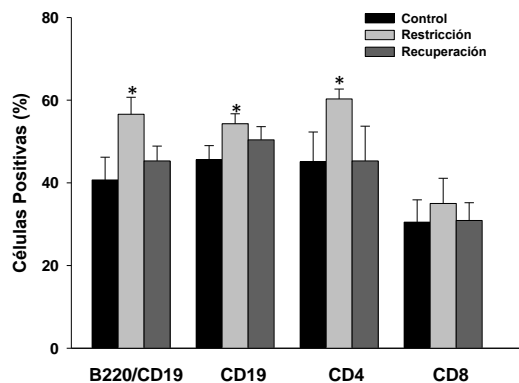


Fig. 8. Poblaciones celulares de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en bazo. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. *p=0.001 (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

b) Ganglios cervicales

En los ganglios cervicales el cambio en los porcentajes celulares presenta en la población de linfocitos T cooperadores un aumento durante el estrés para después de la recuperación disminuir incluso por debajo del nivel basal a diferencia de las otras poblaciones donde se observa una drástica disminución y posterior recuperación en el caso de los linfocitos B maduros y de los linfocitos T citotóxicos siendo más evidente en los primeros, la población de linfocitos B inmaduros sigue disminuyendo a pesar de la recuperación.

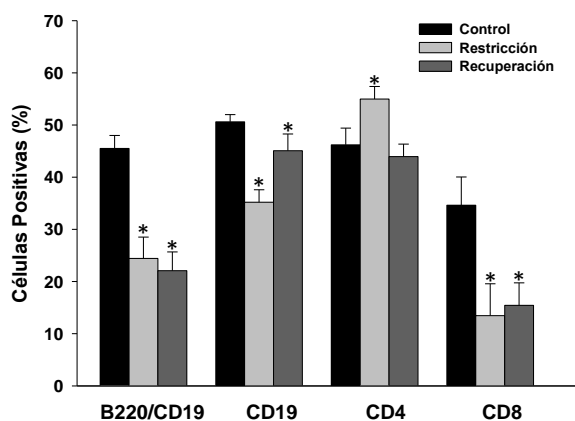


Fig. 9. Poblaciones celulares de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en ganglios cervicales. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. *p=0.034 (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

c) Ganglios mesentéricos

Las poblaciones de linfocitos B tanto maduros como inmaduros presentan un aumento poblacional durante la aplicación del protocolo de estrés y la consiguiente disminución después del periodo de recuperación, incluso ligeramente por abajo del nivel basal en el caso de los

linfocitos B maduros, los linfocitos T presentan un comportamiento diferente, observándose ninguna modificación en la población de linfocitos T cooperadores durante la aplicación del protocolo de estrés y una ligera disminución poblacional durante el periodo de recuperación, en el caso de los linfocitos T citotóxicos, la población aumenta ligeramente durante la aplicación del estrés seguido de un notable aumento durante el periodo de recuperación.

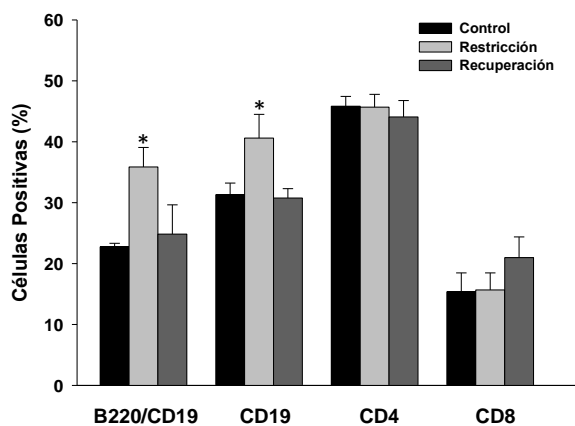


Fig. 10. Poblaciones celulares de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en ganglios mesentéricos. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. *p=0.001 (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

d) Médula ósea

Es obvio que en la médula ósea se encontrarían poblaciones mínimas de linfocitos T, pues aunque se forman ahí, todos migran hacia el timo para alcanzar su proceso de maduración. Con respecto a los linfocitos B, no se observaron modificaciones en relaciones a las poblaciones analizadas.

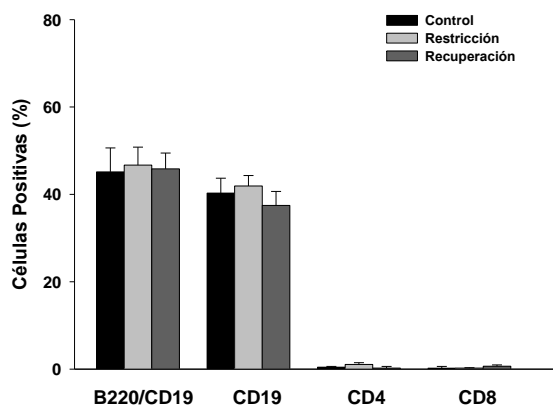


Fig.11. Poblaciones celulares de linfocitos B inmaduros y maduros, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en médula ósea. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. *p=0.001 (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

e) Placas de Peyer distales

Observamos que las poblaciones de linfocitos B siguen el patrón de aumento durante el estrés y disminución durante la recuperación a diferencia de los linfocitos T cooperadores que disminuyen de manera drástica durante el estrés seguido de una lenta recuperación.

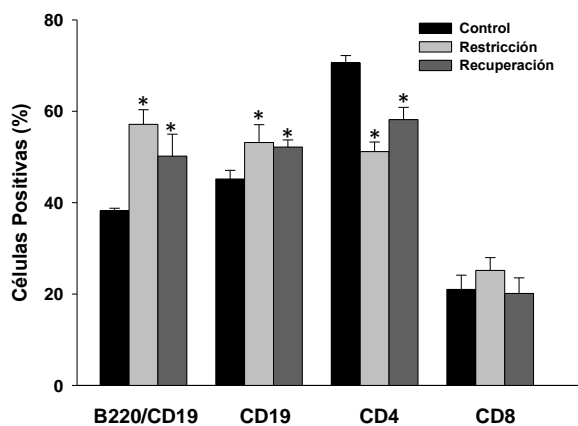


Fig. 12 Poblaciones celulares de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en placas de Peyer distales. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. *p=0.009 (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

f) Placas de Peyer proximales

De igual manera que en las placas de Peyer distales, las poblaciones de linfocitos B siguen el patrón de aumento durante el estrés y disminución durante la recuperación y los linfocitos T cooperadores disminuyen drásticamente durante el estrés recuperándose lentamente.

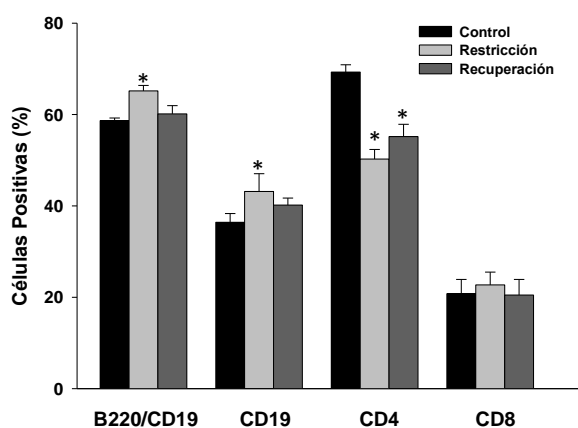


Fig. 13. Poblaciones celulares de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en placas de Peyer proximales. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. *p=0.001 (*t* de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

g) Timo

Nuevamente, se esperaba no encontrar poblaciones de linfocitos B al ser el timo el sitio de maduración de los linfocitos T de tal manera que para este órgano se tomó en cuenta la población de linfocitos T (CD4/CD8) y no se observaron modificaciones en estas poblaciones celulares en relación al protocolo de estrés utilizado.

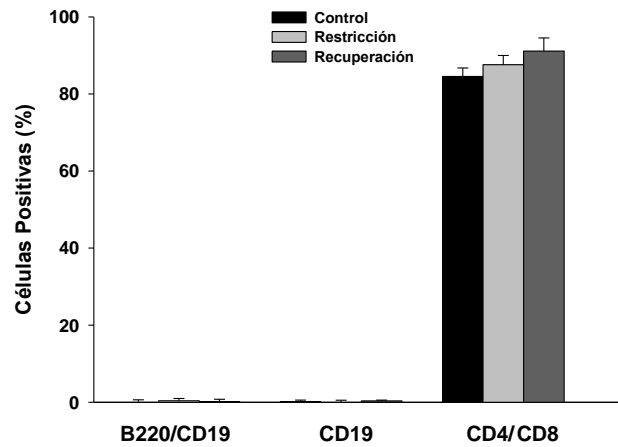


Fig. 14. Poblaciones celulares mínimas de linfocitos B y de linfocitos T en timo. Los datos representan la media \pm desviación estandar de al menos tres experimentos independientes entre si. * $p=0.001$ (t de student) diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales.

DISCUSION

Es aceptado que la corticosterona y otras hormonas adrenales, producen cambios en el tráfico celular durante el estado de estrés (Cohen, 1972; Fauci, 1975; Dhabhar *et al.*, 1996). En el presente trabajo claramente se observó lo esperado, un aumento considerable en la concentración de esta sustancia en los ratones sometidos al protocolo de estrés seguida de una disminución durante la recuperación que no alcanza el nivel basal muy probablemente por falta de tiempo. El efecto de hormonas del estrés como la adrenalina induce una respuesta similar a la obtenida por la restricción de movimiento, incluso con parámetros fisiológicos como la hiperglicemia, la hipotermia y la función inmune (Watanabe *et al.* 2008). Endocrinológicamente, este tipo de estrés aplicado de manera aguda produce respuestas del eje HPA de mayor intensidad y cambios importantes en la distribución linfocitaria, respuestas que no se observan aplicando la restricción de movimiento de manera crónica (Bauer *et al.*, 2001).

Schimizu *et al.* (2000) explican la leucopenia en sangre periférica a la migración celular y a la apoptosis ocurrida en el timo, aplicando el protocolo de estrés durante periodos de 12 y 24 h. Flint *et al.* (2005) demostraron que el estrés por restricción de movimiento de tipo agudo por 2h activa los genes que determinan la apoptosis y la proliferación celular y se produce una redistribución de leucocitos de la sangre hacia otros órganos, entre ellos órganos linfáticos y médula ósea (Dhabhar *et al.*, 1994, 1995; Dhabhar 1998). Sería oportuno determinar en un trabajo futuro, la magnitud de la apoptosis celular producido en un periodo de 4h y compararla con periodos más largos e incluso con otros protocolos de estrés. Aunque se ha demostrado que la apoptosis explica los cambios en el tamaño de las poblaciones, no existen trabajos que esclarezcan su parte en el asunto por lo menos de manera contundente, solo se considera complementaria a la ya demostrada migración celular. Otro aspecto a tomar en cuenta para entender el proceso de migración celular es analizar la expresión de integrinas.

Los niveles mínimos de linfocitos T en la médula ósea tal vez se deban a los linfocitos que aún no han migrado al timo para su maduración. Los cambios observados en los linfocitos B maduros e inmaduros siguen el patrón esperado de aumento durante el estrés y posterior regreso al nivel basal durante la recuperación, en el caso de las poblaciones de los linfocitos B maduros la población disminuye incluso por debajo del nivel basal, esto se explica por la migración celular aunque no hay que perder de vista que la maduración de los linfocitos B no se lleva a cabo al 100% en la médula ósea.

En el timo se observó de manera contundente la ausencia de linfocitos B y con respecto a los linfocitos T se consideró estudiar las poblaciones totales aclarando que de manera normal, en el timo existe mayor cantidad de linfocitos T cooperadores. El aumento poblacional progresivo se debe seguramente a la maduración linfocitaria repentina producida por el estrés.

Los cambios en las cuatro poblaciones estudiadas en el bazo fue el patrón esperado de aumento durante el estrés y disminución durante la recuperación, el aumento se debe probablemente a los linfocitos activados por el estrés provenientes de los órganos linfoides primarios.

En el caso de los ganglios cervicales, la única población que sigue el patrón de aumento-disminución son los linfocitos T cooperadores, las otras tres poblaciones muestran una disminución drástica durante el estrés debida a la migración celular hacia otras partes del cuerpo, recordemos que los linfocitos T cooperadores activan a los otros linfocitos, quizás por esto no migren.

En los ganglios mesentéricos las poblaciones de linfocitos B son las que presentan el patrón de aumento y disminución, lo que indica que no migran a diferencia de los linfocitos T cooperadores que disminuyen ligeramente por migración o apoptosis y los linfocitos T citotóxicos que al contrario van aumentando y seguramente provenientes del timo. Para tratar de explicar esto haría falta medir otros parámetros como la producción de citoquinas y el nivel de apoptosis.

Tomando en cuenta el trabajo de Fukui *et al.* (1997), al aplicar el protocolo de estrés por restricción de movimiento en la misma cepa de ratones pero de manera crónica y aplicando el protocolo de estrés por más tiempo, se comprueba que el estrés agudo potencia la respuesta inmune y el crónico la disminuye, por lo menos en bazo y en ganglios mesentéricos.

En ambas placas de Peyer no se observan diferencias en las modificaciones comparando el mismo tipo de poblaciones. Las poblaciones de linfocitos B y linfocitos T citotóxicos presentan el patrón aumento disminución esperado, solamente los linfocitos T cooperadores muestran una disminución y posterior recuperación explicada por la migración celular.

La circulación linfocitaria está mediada por mecanismos altamente específicos que implican la expresión de moléculas de adhesión celular y las integrinas, que actúan sobre los linfocitos y sobre las células endoteliales (Butcher and Picker, 1996; Fisher *et al.*, 1988). La redistribución de los linfocitos implica la acción combinada de múltiples familias de quimioatrayentes, citoquinas y moléculas de adhesión (CAM's), éstas últimas tienen un papel

central en la trans migración y están probablemente relacionadas con la iniciación y la propagación de enfermedades infecciosas y autoinmunes (Bauer *et al.*, 2001).

El tráfico y la redistribución de linfocitos periféricos entre los diferentes compartimentos del sistema inmune son importantes para la respuesta inmune mediada por células y parece ser alterado por el estrés. Durante el estrés, una marcada reducción en el número de linfocitos se observa en el timo, bazo y sangre periférica, posiblemente provocado por los altos niveles de corticosteroides (Ottaway y Husband, 1994; Keller *et al.*, 1988), aunque en la médula ósea ocurre lo contrario, un aumento en número y proporción de linfocitos después de experimentado el estrés (Sudo *et al.*, 1997). Se ha reportado que durante estrés de tipo agudo, el número de linfocitos circulantes resulta dramáticamente alterado (Dhabhar *et al.*, 1995), también se observa este fenómeno después de la administración de esteroides (Cohen, 1972; Fauci, 1975). Hay evidencia de que en humanos (Mills and Dimsdale, 1996) y en ratones (Tarcic *et al.*, 1995) el estrés agudo provoca cambios en las CAM's y su relación con los linfocitos. El número de linfocitos decrece en la sangre periférica durante el estrés posiblemente debido a la falta de abastecimiento de linfocitos T provenientes del timo que han desaparecido por apoptosis (Schimizu *et al.*, 2000).

Parece ser que en el estrés crónico no se presentan cambios tan drásticos debido a la habituación del organismo a las hormonas del estrés (Bauer *et al.*, 2001). Aplicando un protocolo de estrés por inmovilización de manera crónica Domínguez-Gerpe y Rey-Méndez (2001) observaron que el estrés aumenta marcadamente la apoptosis dentro del timo y una consecuente reducción en la cantidad de timocitos, particularmente de tipo inmaduro, en torrente sanguíneo disminuye la cantidad de linfocitos, en menor medida los LB, con respecto a los linfocitos T, se presentan algunas formas inmaduras, el bazo y los ganglios linfáticos demuestran una marcada reducción en celularidad pero la proporción relativa de LT aumenta, mientras que las poblaciones de LB no muestran cambio, la porción relativa de los LT en la médula ósea aumenta.

En ratas sometidas al estrés por restricción de movimiento de tipo agudo por 2 h. se observó una redistribución de leucocitos de la sangre hacia otros órganos como piel, órganos linfáticos y la médula ósea (Dhabhar *et al.*, 1994; Dhabhar *et al.*, 1995; Dhabhar 1998) y que las hormonas adrenales del estrés son los principales mediadores de tal distribución leucocitaria (Dhabhar *et al.*, 1996).Este protocolo de estrés provoca un cambio en las poblaciones linfocitarias en bazo y ganglios mesentéricos asociados además de dar origen a niveles alterados de anticuerpos y citoquinas (Fukui *et al.*, 1997). Bauer *et al.* (2001) estudian el efecto de aplicar

este protocolo de estrés de manera crónica y aguda sobre la población linfocitaria periférica y en la expresión de integrinas $\beta 2$.

CONCLUSIONES

Si bien pudo comprobarse que el estrés agudo inducido por restricción de movimiento potencia el sistema inmunitario, particularmente la respuesta celular y que los niveles de corticosterona y los cambios en las poblaciones celulares siguiendo el patrón de aumento y posterior disminución durante la recuperación se apegaron a lo esperado, harían falta otros tipos de estudios complementarios a nivel para obtener información más contundente sobre los cambios en las poblaciones linfocitarias.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman y S. Pillai. 2008. *Inmunología celular y molecular*. 6ª ed. Edit. Elsevier. Barcelona, España. Pags. 3 – 7.
- Ader R., N. Cohen and N. J. Grotta. Adrenal involvement in conditioned immunosuppression. *Int J. Immunopharmacol.* 1979;1:141-145.
- Ader R., D. Felten, and N. Cohen Interactions between the brain and the immune system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990;30:561-602
- Ader, R., Felton D. L. and Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press; 1991.
- Ader Robert and Nicholas Cohen. *Psychoneuroimmunology: conditioning and stress*. *Annu. Rev. Psychol.* 1993;44:53-58
- Agarwal S. K. and G. D. Marshall. Stress effects on immunity and its application to clinical immunology. *Clin Exp Allergy* 2001;31:25-31.
- Akana Susan F., Mary F. Dallman, Margaret J. Bradbury, Karen A. Scribner, Alison M. Strack and Claire-Dominique Walker. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. *Endocrinology*. 1992; 131(1):57-68.
- Andrés Rosa, Octavi Martí and Antonio Armario. Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats. *Am. Jour. Phys.* 1999;277:863-868
- Anglen Crystal S., M. E. Truckenmiller, Todd D. Schell and Robert H. Bonneau. The dual role of CD8+ T lymphocytes in the development of stress-induced herpes simplex encephalitis. *Jour. Neuroimmunol.* 2003;140:13-27
- Antoni F. A. 1986. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin releasing factor. *Endocr. Rev.* 1986;7:351.
- Antonica A, Magni F, Mearini L, Paolucci N. Vagal control of lymphocyte release from rat thymus. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 1994;48:187-197
- Armario A., J. Hidalgo and M. Giralt. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 1988;47:263-267
- Azevedo R. B., Lacava Z. G. M., Miyazaka C. K., Chaves S. B. and Curi R. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. *Brazil Med Biol Res* 2001;34:683-687.

- Baker A. M., Meredith J. W. and Haponik E. F. Pneumonia in intubated trauma patients - microbiology and outcomes. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;153:343-349
- Barker Laura A., Paul F. Dazin, Jon D. Levine and Paul G. Green. Sympathoadrenal-dependent sexually dimorphic effect of nonhabituating stress on *in vivo* neutrophil recruitment in the rat. *Brit. Jour. Pharmacol.* 2005;145:872-879
- Banerjee, B. D., B. C. Koner and A. Ray. Influence of stress on DDT-induced humoral immune responsiveness in mice. *Environmental Research.* 1997;74:43-37.
- Barreau F., L. Ferrier, J. Fioramonti and L. Bueno. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 2004;53:501-506.
- Bauer Moisés E., Paula Perks., Stafford L. Lightman and Nola Shanks. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? *Life Sci.* 2001;69:1167-1179
- Ben-Eliyahu S., Yirmiya R., Liebeskind J., Taylor A. and Gale R. *Brain Behav. Immun.* 1991;5:193-205
- Berciz I. Pituitary function and immunity. Boca Raton, FL: CRC Press: 1986.
- Besedovsky H. and E. Sorkin. 1977. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin. Exp. Immunol.* 1997;27:1-12
- Bilbo S. D., Dhabhar F. S., Viswanathan K. Saul A., Yellon S. M. and Nelson R. J. Short day lengths augment stress-induced leukocyte trafficking and stress-induced enhancement of skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99:4067-4072
- Bilbo Staci D. and Randy J. Nelson. Sex differences in photoperiodic and stress-induced enhancement of immune function in Siberian hamsters. *Brain. Behav. Immun.* 2003;17:463-472.
- Biondi, M. 2001. The effects of stress on immune function: an overview. In: Ader, R.F.D., Cohen, N. (Eds.), *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, San Diego, pp 189-226.
- Black, P. H. The inflammatory response is an integral part of the stress response: implications for atherosclerosis, insuline resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain. Behav. Immunol.* 2003;17:350-364
- Blecha F., Topliff D. and Can J. *Comp. Med.* 1984; 48: 211-214
- Blecha F., and P. E. Baker. 1986. Effect of cortisol in vitro and in vivo on production of bovine interleukin 2. *Am. J. Vet. Res.* 1986;47:841 - 845.
- Blotta M. H., R. H. DeKruyff, and D. T. Umestsu, D. T. Corticosteroids inhibit IL - 12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL - 4 sybthesis in CD4+ lymphocytes. *J. Immunol.* 1997;158:5589-5595.

Bonneau, R.H., Sheridan J. F., Feng, N. G., Glaser R. Stress-induced effect on cell-mediated innate and adaptive memory components of the murine immune response to herpes simplex virus infection. *Brain, behav. Immun.* 1991;5:274-295.

Bonneau, R.H., Sheridan J. F., Feng, N. G., Glaser R. Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms. *J. Neuroimmunol.* 1993;78:19-33.

Bradesi S., Eutamene H., J. Fioramonti and L Bueno. Acute restraint stress activates functional NK1 receptor in the colon of female rats: involvement of steroids. *Gut* 2002;50:349-354

Bratzaeg I., N. Farstad and Guttorm Haraldsen. 1999. Regional specialization in the mucosal immune system : primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* 1999;20(6):267-277.

Brotto L. A., Gorzalka B. B. and LaMarre A. K. Melatonin protects against the effects of chronic stress on sexual behaviour in male rats. *Neuroreport* 2001;12:3465-3469.

Bühler H. U., M. Da Prada, W. Haefely and G. B. Picotti. Plasma adrenaline, noradrenaline and dopamine in man and in different animal species. *J. Physiol.* 1978;276:311-320.

Butcher, E. C., and Picker L. J. 1996. *Science.* 272, 60-66.

Butcher Stephen K. and Janet M. Lord. Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor. *Aging Cell* 2004;151-160

Calcagni, C. e I. Elenkov. 2006. Stress system activity, innate and T helper cytokines and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:62-72.

Callahan TA, Moynihan JA. The effects of chemical sympathectomy on T-cell cytokine responses are not mediated by altered peritoneal exúdate cell function or an inflammatory response. *Brain Behav. Immun* 2002;16:33-45.

Campisi J., T. H. Leem and M. Fleshner. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:272-286

Cannon J. G. and St Pierre B. A. Gender differences in host defense mechanisms. *J. Psychiatr. Res.* 1997;31:99-113.

Caplan E. S. and Hoyt N. J. Identification and treatment of infections in multiply traumatized patients. *Am J Med* 1985;79:68-76.

Carlson SL, Beiting DJ, Kiani CA, Abell KM, McGillis JP. Catecholamines decrease lymphocyte adhesion to cytokine-activated endothelial cells. *Brain Behav. Immun* 1996;10:55-67.

Carr JA, Ortiz KA, Paxton LL, Saland LC, Savage DD. Alterations in spleen norepinephrine and lymphocyte [3H]dihydroalprenolol binding site number in genetically epilepsy-prone rats. *Brain Behav Immun* 1993;7:113-120.

Chao T. C., Van Alten P. J. and Walter R. J. Steroid sex hormones and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:42-52.

Chrousos, G., L. D. Loriaux, and P.W. Gold. The concept of stress and its historical development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988;245:3-7.

Cocke R., J. A. Moynihan, N. Cohen, L. J. Grota and R. Ader. Exposure to conspecific alarm chemosignal alters immune responses in BALBc mice. *Brain Behav Immunol* 1993;7:36-46.

Cohen J. J. *Immunol.* 1972; 108: 841-843

Cohen S. Psychological stress and susceptibility to upper respiratory infections. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;152:S53-S58

Cohen S., Tyrrell D. A. and Smith A. P. Psychological stress and susceptibility to the common cold. *N. Engl. J. Med.* 1991;325:606-612

Cohen S. and T. B. Hebert. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol* 1996;47:113-142.

Cohen F., K. A. Kearney and L. S. Zegans *et al.* Differential immune system changes with acute and persistent stress for optimists vs. Pessimists. *Brain Behav Immun* 1999;13:155-74

Cohen S., Hamrick N., Rodriguez M. S., Feldman P. J., Rabin M. S. and Manuk S. B. Reactivity and vulnerability to stress-associated risk for upper respiratory illness. *Psychosom Med* 2002;64:302-310.

Collins S., Barbara G. and Vallance B. Stress inflammation and the irritable bowel syndrome. *Can J. Gastroenterol* 1999;13:47-49.

Cordellini S. and Vassilief V. S. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rat is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *General Pharmacology.* 1998;30:79-83.

Coussons-Read M. E., K. A. Maslonek, K. Fecho, L. Pérez and D. T. Lysle. Evidence for the involvement of macrophage-derived nitric oxide in the modulation of immune status by a conditioned aversive stimulus. *J Neuroimmunol* 1994;50:51-58.

Cray, B., Borysenko, M., Sutherland D. C., Kutz I., Borysenko, J. Z. and Benson H. Decrease in mitogen responsiveness of mononuclear cells from peripheral blood after epinephrine administration in humans. *J. Immunol.* 1983;130:694-699.

Curtin Niamh M., Kingston H. G. Mills and Thomas J. Connor. Psychological stress increases expression of IL-10 and its homolog IL-9 via β -adrenoceptor activation: reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain Behav and Immun* 2009a;23:371-379.

Curtin Niamh M., Noreen T. Boyle., Kingston H. G. Mills and Thomas J. Connor. Psychological stress suppresses innate IFN- γ production via glucocorticoid receptor activation: reversal by the anxiolityc chloradiazepoxide. *Brain Behav Immun* 2009b;23:535-547.

Curtis, S. E. 1981. Environmental management in animal agricultura. The Iowa State University Press. Ames, Iowa. 1981; 11 -15.

Dagyty G., E. A. van der Zee, f. Postema, P. G. M. Luiten, J. A. den Boer, a. Trentani and P. Meerlo Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary supression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience* 2009;162:904-913.

Dancey C. P., M. Taghavi and R. J. Fox. *J. Psychosom. Res.* 1998;44:537-545.

Dantzer, R. and Kelley, K. W. Stress and immunity: an integrated view of relationship between the brain and immune system. *Life Sci.*1989;44:1995-2008.

Daynes R. A. and B. A. Araneo. *Eur. J. Immunol.* 1989;19:2319

de Kloet E. R., Joels M. and Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:463-475.

de Souza E. M., Rivera M. T., Araujo-Jorge T. C. and de Castro S. L. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol Res* 2001;87:513-520.

Deak T., J. L. Meriwether, M. Fleshner, R. L. Spencer, A. Abouhamze, L. I. Moldawer, R. E. Grahn, L. R. Watkins and S. F. Maier. Evidence that acute stressor exposure may induce the acute phase response in rats. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 1997;273(42): R1998-R2004.

del Pozo, M. A. Sánchez-Mateos P. and Sánchez-Madrid, F. *Immunol. Today* 1996;17:127-131.

Dhabhar F. S. 1996 Dissertation (Rockefeller Univ., New York)

Dhabhar F. S. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:359-372

Dhabhar F. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad. Sci.* 2000;917:876-893.

Dhabhar F. S. Stress lymphocyte trafficking and the augmentation of skin immune function. *Ann N Y Acad Sci* 2003;992:205-217.

Dhabhar F. S. and B. S. McEwen. Stress-induced enhancement of antigen-specific-cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 1996;156:2608-2615.

Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav. Immun* 1997;11:286-306.

Dhabhar F. S. and McEwen B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:1059-1064

Dhabhar F. S. y B. S. McEwen. Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: possible explanations for paradoxical observations. *Psychoneuroimmunology*, 2001;1:301–30.

Dhabhar F. S., Miller A. H., Stein M. McEwen B. S. and Spencer R. L. *Brain Behav Immun* 1994;8:66-79

Dhabhar F. S., A. H. Miller, B. S. McEwen y R. L. Spencer. Effects of stress on immune cell distribution. *The journal of Immunology* 1995;154:5511–5527.

Dhabhar F. S., Miller A. H., McEwen B. S. and Spencer R. L. Stress induces changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol* 1996;157:1638-1644

Dimitroglou E., Zafiropoulou M., Messini-Nikolaki N., Doudounakis, S. Tsilimigaki S. and Piperakis S. M. DNA damage in a human population affected by chronic psychogenic stress. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206:39-44.

Diodato M. D., Knoferl M. W., Schwacha M. G., Bland K. I. and Chaudry I. H. Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 2001;14:162-169.

Dobbs C., Vázquez M., Glaser R. and Sheridan J. J. *Neuroimmunol.* 1993;48:151-160

Domínguez-Gerpe Lourdes y Manuel Rey-Méndez. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunology* 2001;2(7):1-11

Dreau, D. et al. Effects of social conflict on immune responses and *E. coli* growth within closed chambers in mice. *Physiol Behav* 1999;67:133-140.

Drossman D. A., Creed F. H., Olden K. W. et al. Psychosocial aspects of the functional gastrointestinal disorders. *Gut* 1999;45(suppl 2):25-30.

Dygai AM, Goldberg ED, Shakhov VP, Ivashenko IN, Khlusov IA. Compensation-adaptation reactions of hemopoiesis-inducing microenvironment of bone marrow in stress. *Gematologiya i Transfuziologiya*, 1992;37:3-5.

Ehrmrooth E., Zacharia R., Svendsen G., Jorgensen M. M., Yishay M., Sorensen, B. S., Hjelm Poulsen J. R. and von der Maase H. Increased thymidylate synthase mRNA concentration in blood leukocytes following an experimental stressor. *Psychother Psychosom* 2002;71:97-103.

Eijkelkamp Niels, Christopher G. Engeland, Praveen K. Gajendrareddy and Philip T. Marucha. Restraint stress impairs early wound healing in mice via α -adrenergic but not β -adrenergic receptors. *Brain Behav Immun* 2007;21:409-412.

Elenkov, I. J., E. L. Webster, D. J. Torpy, and G. P. Chrousos. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999;876:1 - 11.

Elenkov, I. J. and G. P. Chrousos. Stress, hormones, proinflammatory, and antiinflammatory cytokines and autoimmunity. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2002;96:290-303.

Elliot J. C., Picker M. J., Nelson C. J. and Lysle D. T. Sex differences in opioid-induced enhancement of contact hypersensitivity: clinical outcomes and molecular mediators. *Brain Behav. Immun.* 2002;16:181.

Engler H., Dawils L., Hoves S., Kurth S., Stevenson J. R., Schauenstein K. and Stefanski V. Effect of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *J Neuroimmunol* 2004;156:153-162.

Esch Tobias, George B. Stefano, Gregory L. Fricchione and Herbert Benson. Stress in cardiovascular diseases. *Med Sci Monit* 2002a;8(5):RA93-101

Esch Tobias, George B. Stefano, Gregory L. Fricchione and Herbert Benson. Stress-related diseases - a potential role for nitric oxide. *Med Sci Monit* 2002b;8(6): RA103-118.

Fauci A. *Immunol.* 1975 ; 28 : 669-679

Faris M., K. M. Latinis, S. J. Kempiak, G. A. Koretzky and A. Nel. Stress induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Molecul Cell Biol* 1998;18:5414-24.

Fisher A., Grosppierre B., Anderson D. and Springer T. *Immunodeficient Rev.* 1988;1:39-54

Fleshner M., D. Bellgrau, L. R. Watkins, M. L. Laudenslager and S. F. Maier. Stress-induced reduction in the rat mixed lymphocyte reaction is due to macrophages and not to changes in T cells phenotypes. *J. Neuroimmunol.* 1995;56:45-52.

Fleshner M., J. Hermann, L. L. Lockwood, M. L. Laudenslager, L. R. Watkins and S. F. Maier. Stressed rats fail to expand the CD45+CD4+ (Th1-like) T cell subset in response to KLH: possible involvement of IFN- γ . *Brain Behav Immunol* 1995;9:101-112.

Fleshner M., T. Deak, R. L. Spencer, M. L. Laudenslager, L. R. Watkins and S. F. Maier. A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology* 1995;136:5336-5342.

Fleshner M., F. X. Brennan, N. K. Nguyen, L. R. Watkins and S. F. Maier. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti-KLH immunoglobulin response. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1996;271(40):R1344-R1352.

Flint M. S., Valosen J. M., Johnson E. A., Miller D. B. and Tinkle S. S. 2001. Restraint stress applied prior to chemical sensitization modulates the development of allergic contact dermatitis differently than restraint stress prior to challenge. *J Neuroimmunol* 2001;113:72-80.

Flint Melanie S., Judith E. Carroll, Frank J. Jenkins, William H. Chambers, Melissa L. Han and Andrew Baum. Genomic profiling of restraint stress-induced alterations in mouse T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2005;167:34-44.

Forlenza M. J. and Baum A. Psychosocial influences on cancer progression: alternative cellular and molecular mechanisms. *Curr Opin Psychol* 2000;13:639-645.

Fox B. H. 1981. Psychosocial factors and the immune system in human cancer. In Ader R. (Ed.) *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, New York, pp. 103-157

Fride E, McIntyre T, Skolnick P, Arora PK. Immunocompetence in the long sleep and short sleep mouse lines: baseline versus primed responses. *Brain Behav. Immun* 1993;7:231-242.

Frick, L. R., M. L. Barreiro Arcos, M. Rapanelli, M. P. Zappia, M. Brocco, C. Mongini, A. M. Genaro y G. A. Cremaschi. 2008. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress*, doi: 10.1080/10253890802137437.

Fuchs E., Flugge G., Ohl F., Lucassen P., Vollmann-Honsdorf G. K. and Michaelis T. Psychosocial stress, glucocorticoids and structural alterations in the shrew hippocampus. *Physiol Behav* 2001;73:285-291.

Fukui Y., N. Sudo., X. Yu., H. Nukina., H. Sogawa and C. Kubo. The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production. *Journal of Immunology* 1997;79:211-217

- Gaillard R. C. and Spinedi E. Sex and stress-steroids interactions and immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1998;15:354-352
- Geneser, F. 2000. *Histología*. 3^a ed. Edit. Med. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pags.
- Glaser R., J. Rice, C. E. Speicher, J. C. Stout and J. K. Kiecolt-Glaser. Stress depressed interferon production by leukocytes concomitant with a decrease in natural killer cell activity. *Behav Neurosci* 1986;100:675-678.
- Glaser, R. and J. K. Kiecolt-Glaser. 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005;5:243-251.
- Glavin G., Paré W., Sandbak T., Bakke H. and Murison R. *Neurosci. Biobehavioral Rev.* 1994; 18: 223-249
- Gómez G. B. y A. Escobar. Estrés y sistema inmune. *Rev. Mex. Neurosci.* 2006;7(1):30-38
- Gould E, Tanapat P. McEwen BS, Flugge E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998;95:3168-3171.
- Grosman C. J. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr Rev* 1984;5:435-455.
- Gulshan S., McCrudden A. B. and Stimson W. H. Oestrogen receptors in macrophages. *Scand J immunol* 1990;31:691-697.
- Gumusel B., Orhan D. Tolunay O. and Uma S. The role of nitric oxide in mediating noradrenergic, noncholinergic relaxation in rat pulmonary artery. *Nitric Oxide* 2001;5:296-301
- Guyton, A. G. y J. E. Hall. 1997. *Tratado de Fisiología Médica*. 9^a ed. Edit. Interamericana-McGraw Hill. México DF. Pags. 845 – 6.
- Hale K. D., V. K. Ghanta, D. K. Gauthier *et al.* Effect of rotational stress of different duration on NK cell activity, proinflammatory cytokines and POMC-derived peptides in mice. *Neuroimmunomodulation* 2001;9:34-40
- Hashimoto K., Suemaru S., Takao T., Sugawara M. Makino S. and Ota Z. Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenocortical responses in chronically stressed rats. *Reg Pep* 1988;23:177-226.
- Hauger R. L., H. Lorang, M. Irwin and G. Aguilera. (1990). CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res* 1990;532:34-40.

Heilig M, Irwin M. Grewal I, Sercarz E. Sympathetic regulation of T-helper cell function. *Brain Behav. Immun* 1993;7:154-163.

Heim C. and Nemeroff C. B. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry* 1999;46:1509-1522

Hemila H. (1996) Vitamin C and common cold incidence: a review of studies with subjects under heavy physical stress. *Int J Sport Med* 1996;17:379-383.

Herbert T. B. and Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom. Med.* 1993;55:364-379.

Hu S. K., Mitcho Y. L. and Rath N. C. Effecto of estradiol on interleukin-1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1988;10:247-252.

Iwakabe K., M. Shimada, A. Otha, T. Yahata, Y. Ohmi, S. Habu y T. Nishimura. The restraint Stress drives a shift in Th1 / Th2 balance toward Th-dominant immunity in mice. 1998 ¿y lo demás?

Jain A., Zwickler D., Hollander C., Brand H., Saperstein R., Hutchinson B., Brown C. and Audhya A. *Endocrinol.* 1991;128:1329-1336

Jiang C. G., J. L. Morrow-Tesch, D. I. Beller, E. M. Levy and P. H. Black. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. *Brain Behav Immun* 1990;4:278-291.

Joseph-Bravo P., P. de Gortari. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Bioteología V14 CS3*, 2007

Juzwa W, Gnacinska G, Rawicz-Zegrzda I, Kaczmarek J. Modulation of cellular immunity by a lesión of the lateral hypothalamic area (LHA) in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 1995;47: 403-408.

Kanemi O., X. Zhang., Y. Sakamoto, M. Ebina and R. Nagatomi. Acute stress reduces intraparenchymal lung natural killer cells via beta-adrenergic stimulation. *Clinical and Experimental Immunology* 2005;139:25-34.

Kawamura T. Toyabe S. Moroda T. Iiai T. Takahuashi-Iwanaga H. Fukuda M. et al. Neonatal granulocytosis is a postpartum event wich is seen in the liver as well as in the blood. *Hepatology* 1997;26:1567-1572.

Keim K. and Sigg E. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1976; 4: 289-297

Keller S., Weis J., Schleifer S., Miller N. and Stein M. *Science* 1981;213:1397-1399.

Keller S. E., S. J. Schleifer, A. S. Liotta, R. N. Bond, N. Farhooody ad M. Stein. Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9297-9301.

Keller, S. E., S. J. Schleifer and M. K. Demetrikopoulos. 1991. Stress-induced changes in immune function in animals: hypothalamo-pituitary-adrenal influences. In: Ader R., Felten, P. L., Cohen, N. (Eds.) *Psychoneuroimmunology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, pp. 771-788.

Kelley KW, Arkins S, Li YM. Growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors: new jobs for old players. *Brain Behav. Immun* 1992;6:317-326.

Khan MM, Sansoni P, Silverman ED, Engleman EG, Melinon KL. Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper and cytolytic lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* 1986;35:1137-1142.

Khansari, D. N., Murgu, A. J., Faith R. E. Effects of stress on the immune system. *Immunol. Today*. 1990;11:170-175.

Khlusov IA, Dygai AM, Goldberg ED. The adrenergic regulation of interleukin production by bone marrow cells during immobilization stress. *Biulleten Eksperimentalnoi Biologii I Meditsiny*. 1993;116:570-572.

Klein S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes and behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2000;24:627-638.

Kohut M. L., Boehm G. W. and Moynihan J. A. Prolonged exercise supresses antigen-specific cytokine response to upper respiratory infection. *J Appl Physiol* 2001;90:678-684

Koolhaas J. M. and Bohus B. 1994. Animal models of stress and immunity . In: Leonard, B. E., Miller K. (Eds.). *Stress, the immune system and psychiatry*. John Wiley and sons, Chichester, pp. 69-83.

Konarska M., Stewart R. and McCarty R. Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiol. Behav*. 1989;45:255-261

Kovacs, K. J., I. H. Miklos, and B. Bali. 2005. Psychological and physiological stressors. *Handbook of stress and the brain*. 2005;15:775-792

Kvetnansky R., Weise V. and Kopin I. *Endocrinol*. 1971; 89:46-49

Laudenslager M. L., S. M. Ryan, R. C. Drugan, R. L. Hyson and S. F. Maier. Coping an immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science* 1983;221:560-570.

Laudenslager M. L. and M. Fleshner. Stress and immunity: of mice, monkeys, models and mechanisms. In: The handbook of human stress and immunity, edited by R. Glaser and J. Kiecolt-Glaser. New York Academic, 1994, p 161-181

Levenstein S., C. Pantera, V. Varvo, M. L. Scribano, E. Berto, A. Andreoli and C. Luzi. *Am. J. Gastroenterol.* 1994;89:1219-1225.

Levine S, Saltzman A. Nonspecific stress prevent relapses of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Brain Behav. Immun* 1987;1:336-341.

Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory déficits. *Nature Neuroscience.* 1999;1:69-73.

Lyte, M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2004;12:14-20.

Mabry T. R., P. E. Gold and R. McCarty. Age-related changes in plasma catecholamine responses to chronic intermittent stress. *Phys and Behav* 1995;58(1):49-56.

Maes M., Van Bockstaele D. R., Gastel A., Song C., Schotte C., Neels H., DeMeester I., Scharpe S. and Janca A. 1999. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. *Neuropsychobiology* 1999;39:1-9.

Maier S. F., M. Fleshner and L. R. Watkins. Neural endocrine and immune mechanisms of stress-induced immunomodulation. In: *New frontiers in stress research. Modulation of brain function.* Edited by A. Levy, E. Graver, D. Ben-Nathan and E. R. de Kloet. Chur. Switzerland: Harwood Academic, 1998, p. 175-187.

Maisel AS, Fowler P, Rearden A, Motulsky HJ, Michel MC. A new method for isolation of human lymphocyte subsets reveals differential regulation of beta-adrenergic receptors by terbutaline treatment. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.*1989;46:429-439.

Marsland A. L., Bachen E. A., Cohen S., Rabin B. and Manuk S. B. Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. *Physiol Behav* 2002;77:711-716 .

Maruyama S. Minagawa M. Shimizu T. Oya H. Yamamoto S. Musha N. et al. Administration of glucocorticoids markedly increases the numbers of granulocytes and extrathymic T cell in the bone marrow. *Cell Immunol* 1999;194:28-35.

Maruyama S. Tsukahara A. Suzuki S. Tada T. Minagawa M. Watanabe H. et al. Quick recovery in the generation of self-reactive CD4 low NKT cells by an alternative intrathymic pathway when restored from acute thymic atrophy. *Clin Exp Immunol* 1999;117:587-95.

Masera, R., Gatti G., Sartori M. L., Carignoa, R., Salvanori, A., Magro, E., Angeli, A. Involvement of Ca²⁺ dependent pathways in the inhibition of human natural killer (NK) cell activity by cortisol. *Immunopharmacology*. 1989;18:11-22.

Matarese G., Sanna V., Di Giacomo A., Lord G. M., Howard J. K., Bloom S. R., Lechler. R. I., Fontana S. and Zapacosta S. Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. *Eur. J. Immunol*. 2001;31:1324-1332.

Matsuo K., X. Zhang, Y. Ono and R. Nagatomi. Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid. *Brain Behav Immun* 2009;23:108-115.

Mawdsley J. E. and D. S. Rampton. 2005. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005;54:1481-1491.

McCarty R. and Gold P. Catecholamines, stress and disease: a psychobiological perspective. *Psychosomatic Medicine*, 1996;58:590-597.

McEwen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal Med*. 1998;338:171-9.

McEwen, B. 2000. Stress, definition and concepts of. Pages 508 -509 in *Encyclopedia of Stress*, Vol. 3. G. Fink, ed. Academic Press. San Diego, CA.

McEwen B. S. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1032:1-7.

McEwen, B. S. Stressed or not stressed? What is the difference? *Rev. Psychiatric Neurosci*. 2005;30:315 - 318.

Melia K. R., A. E. Ryabinin, R. Schroeder, F. E. Bloom and M. C. Wilson. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J. Neurosci*. 1994;14(10):5929-5938

Mills P. and Dimsdale J. J. *Psychosom. Res*. 1996;41:49-53

Minagawa M. Oya H. Yamamoto S. Shimizu T. Bannai M. Kawamura H. et al. Intensive expansion of natural killer T cell in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice y: twenty years of T cells. *Brain Behav. Immun* 2007;21(7):872-880.

Mizobe K., Kishihara K., El-Naggar R., Madkour G., Kubo C. and Nomoto K. *J. Neuroimmunol*. 1997; 73: 81-89.

Mönnikes H., B. G. Schmidt, H. E. Raybould and Y. Taché. CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic motor response to restraint stress. *Am Phys Soc* 1992;G137-G143

Morimoto A., T. Watanabe, K. Morimoto, T. Nakamori and N. Murakami. Possible involvement of postaglandins in psychological stress-induced responses in rats. *J Physiol (Lond.)*1991;443:421-429 1991.

Mosmann T. R. and S. Sad. *Immunol. Today* 1996;17:138.

Moynihan J. A. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 2003; 17(Suppl. 1):S11-6

Moynihan J. A., J. D. Karp, N. Cohen and R.Cocke. Alteration in interleukin-4 and antibody production following pheromone exposure: role of glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 1994;54:51-58.

Moynihan J. A. and R. Ader. Psychoneuroimmunology: animal models of disease. *Psychosom. Med.*1996;58:546-558.

Munck, A., P. M. Guyre, and N. J. Holbrook. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinol Rev.* 1984;5:25-44.

Munck A. and Guyre P. Glucocorticoids and immune function In: Ader R., Felten D., and Cohen N. editors. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press, 1991 pp. 447-474

Nash M. S. 1994. Excercise and immunology. *Med. Sci. Sports Excerc.* 1994;26:125-127

Natelson B. H., J. E. Ottenweller, J. A. Cook, D. Pitman, R. McCarty, W. N. Tapp (1988). Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical response. *Phys Behav* 1988;43:41-46

Negrao A. B., Deuster P. A., Gold P. W., Singh A. and Chrousos G. P. Individual reactivity and physiology of stress response. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2000;54:122-128

Nieman D. C. Excercise immunology: practical applications. *Int. J. Sports Med.* 1997;18(Suppl.)1:S91-S100.

Nieman D. C. and B. K. Pedersen. Excercise and immune function. Recent developements. *Sports Med.* 1999;27:73-80

Nishina H., K. D. Fischer, R. Radvanyi *et al.*, Stress signalling kinase Sek 1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 1997;385:350-353.

Obminska-Mrukowicz B. and M. Szczyпка. Influences of DTC and zinc supplementation on the cellular response restoration in restrained mice. *J. Vet. Sci.* 2005;6(1):25-32.

O'Leary A. 1990. Stress, emotion, and human immune function. *Psycholl. Bull.* 1990;108:803-808.

- Olson G. A., R. D. Olson, A. L. Vaccarino and A. J. Kastin. 1998. Endogenous opiates: 1997. *Peptides* 1997;19:1791-1843.
- Ottaway C. A. and A. J. Husband The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol. Today*. 1994;15:511-517.
- Oya H. Kawamura T. Shimizu T. Bannai M. Kawamura H. Minagawa M. et al. The differential effect of stress on natural killer T and NK cell function. *Clin Exp Immunol* 2000;121:384-90.
- Pacak K., J. Baffi, R. Kvetnansky, D. S. Goldstein and M. Palkovits. Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress -related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses. *Adv. Pharmacol.* 1998;42:561-564
- Pacak K. y M. Palkovits. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001;4;502-548.
- Padgett D. A. and R. Glaser (2003). How stress influences de immune response . *Trends immunol* 23, 444-448.
- Padgett D. A., Marucha P. T. and Sheridan J. F. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav Immun* 1998;12:64-73.
- Padgett D. A., Sheridan J. F., Dorne J., Bernston G. G., Candelora J. and Glaser R. Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 7231-7235.
- Papia G, McLellan B. A., El Helou P., Louie M., Rachils A., Szalai J. P. and Simor A. E. Infection in hospitalized trauma patients: incidence, risk factors and complications. *J Trauma-injury Infect Crit Care* 1999;47: 923-927.
- Pierzchala K and G. R. van Loon. Plasma native and peptidase-derivable met-enkephalin responses to restraint stress in rats. *J. Clin. Invest.* 1990, 85: 861-873
- Potter P. T. and A. J. Zautra. (1997). *J. Consult. Clin, Psychol.* 65, 319-323.
- Pruschy M., Y. Q. Shi, N. E. Crompton, J. Steinbach, A. Aguzzi and C. Glanzmann. The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T-lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. *Biochem Res Commun* 1997;241:519-524.
- Ptak W., Dobrowolski Z., Marcinkiewicz J. and Griyglewski A. 1988. Sex differences in regulation of contact sensitivity reaction in mice. I. influence of sex on the generation of contrasuppressor and afferent suppressor cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1988;47:289-295.

Pung O. J., Tucker A. N., Vore S. J. and Luster M. I. Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates to depressed production of interleukin 2. *Infect Immun* 1985;50:91-96.

Pung O. J. and Luster M. I. *Toxoplasma gondii* decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Exp Parasitol* 1986;61:48-56.

Ramírez F., D. J. Fowell, M. Puklavec, S. Simmonds and D. Mason. *J. Immunol.* 1996;156:2406

Ramsey J. M. *Basic pathophysiology: modern stress and the disease process.* Menlo Park (CA): Addison-Wesley Publishing; 1982;30-73.

Rassnick S, Sved AF, Rabin BF. *Locus coeruleus* stimulation by corticotropin-releasing hormone supresses in vitro cellular immune responses. *Journal of Neuroscience.* 1994;14:6033-6040.

Ray A., Mediratta, P. K. Puri S. and Sen P. Effect of stress on immune responsiveness, gastric ulcerogenesis and plasma corticosterone in rats: modulation by diazepam and naltrexone. *Ind. J. Exp. Biol.* 1991;29:233-236.

Ray A., Mediratta, P. K. and Sen P. Modulation by naltrexone of stress-induced changes in humoral immune responsiveness and gastric mucosa integrity in rats. *Physiol. Behav.* 1992;51: 293-296.

Rees J. L., Friedmann P. S. and Matthews, J. N. Sex differences in susceptibility to development of contact hypersensitivity to dinitrochlorobenzene (DNCB). *Br. J. Dermatol.* 1989;120:371-374.

Reiche, E. M. et al. Stress, depression, the immune system and cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5:617-625.

Reid M. R. Mackinnon L. T. and Drummond P. D. The effects of stress management on symptoms of upper respiratory tract infection, secretory immunoglobulin A and mood in young adults *J Psychosom Res* 2001;51:721-728.

Richards, D.F., M. Fernández, J. Caulfield, and C. M. Hawrylowics. Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL -10 and reducen IL - 4, IL - 5 and IL - 13 production. *Eur. J. Immunol.* 2001;30:2344 - 2354.

Riley V. 1981. Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia . *Science* 212, 1100-1109.

Rook G. A. W., R. Hernandez-Pando and S. L. Lightman. *Immunol. Today* 1994;15:301.

Ross M. H. y W. Pawlina. 2007. *Histología.* 5° ed. Editorial Médica. Buenos Aires, Argentina. Pags: 457,

Sagiyama K, Tsuchida M, Kawamura H, Wang S, Li C, Bai X, et al. Age-related bias in function of natural killer T cells and granulocytes after stress reciprocal association of steroid hormones and sympathetic nerves. *Clin Exp Immunol* 2004;135:56-63.

Saito T., Tasawa K., Yokoyama Y. and Saito M. 1997 Surgical stress inhibits the growth of fibroblasts through the elevation of plasma catecholamine and cortisol concentrations. *Surg Today* 1997;27:627-631.

Salak, J. L., J. J. McGlone, and M. Lute. Effects of in vitro adrenocorticotrophic hormone, cortisol and human recombinant interleukin - 2 on porcine neutrophil migration and luminol-dependent chemiluminescence. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993;39:327-337.

Salem M. L., Matsuzaki G., Madkour G. A. and Nomoto K. β -Estradiol-induced decrease in IL-12 and TNF- α expression suppresses macrophage functions in the course of *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:481-497.

Sapolsky, R. M., L. M. Romero, and A. U. Munck. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Rev.* 2001;21:55-89.

Saunders P. R., U. Kosecka, D. M. McKay and M. H. Perdue. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1994;267(30):G794-G799.

Saunders P. R., P. Miceli, B. A. Vallance, L. Wang, S. Pinto, G. Tougas, M. Kamath and K. Jacobson. Noradrenergic and cholinergic neural pathways mediate stress-induced reactivation of colitis in rat. *Autonomic Neuroscience Basic and Clinical* 2006;124:56-68.

Schedlowski M., Falk A., Rohne A., Wagner T. O., Jacobs R., Tewes U., Schmidt, R. E. 1993. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J Clin Immunol* 1993;13:344-351.

Schleimer R. P., Claman H. N. and Oronsky A. (1989) *Anti-inflammatory Steroid Action* (Academic, San Diego)

Schuurs, A. H. and Verheul H. A. 1990. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* 1990;35:157-172.

Seeman TE, McEwen BS, Singer BH, Alberts MS, Rowe JW. Increase of urinary cortisol excretion and memory declines. MacArthur studies of successful aging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1997;82:2458-2465.

Sekas G. and M. Z. Wile *J. Med. Educ.* 1980;55:440-446.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936;138:32

Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrin* 1946;6:117-230.

Selye H. (1956). *The stress of life*. McGraw Hill. New York.

Shanks N. and A. W. Kusnecov. Differential immune reactivity to stress in Balb/CyJ and C57BL/6J mice: *in vivo* dependence on macrophages. *Physiol. Behav.* 1998;65:95-103.

Sharma K. K., P. K. Mediratta, K. H. Reeta and P. Majahan. Effect of L-arginine on restraint stress induced modulation of immune responses in rats and mice. *Pharmacological Research* 2004;49: 455-460

Sheridan J. F., Feng N. G. Bonneau, R. H., Allen C. M., Huneycutt B. S. and Glaser R. Restraint stress differentially affects anti-viral cellular and humoral immune responses in mice. *J Neuroimmunol* 1991;31:245-255.

Sheridan J. F., C. Dobbs, J. Jung, X. Chu, A. Konstantinos, D. Padgett and R. Glaser. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:803-808

Shi Y., S. Devadas, K. M. Greenelch, D. Yin, R. A. Mufson and J. Zhou. Stressed to death: implication of lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 2003;17:S18-S26.

Shimizu T. Kawamura T. Miyaji C. Oya H. Bannai M. Yamamoto S. et al. Resistance of extrathymic T cell to stress and the role of endogenous glucocorticoids in stress associated immuno-suppression. *Scand J Immunol* 2000;51:285-92.

Sieber W. J., J. Rodin, L. Larson *et al.* Modulation of human natural killer cell activity by exposure to uncontrollable stress. *Brain Behav Immunol* 1992;6:141-156.

Silberman D. M., M. R. Wald and A. M. Genaro. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T.lymphocyte reactivity. *Journal of Immunology* 2003;144:53-60.

Singh U. Effect of catecholamines on lymphopoiesis in fetal mouse thymic explants. *Journal of Anatomy.* 1979;129:279-292.

Skjolaas, K. A., D. M. Grieger, C. M. Hill, and J. E. Minton. Glucocorticoid regulation of type 1 and type 2 cytokines in cultured porcine splenocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2002;87:79 - 87.

Sklar L. S. and H. Anisman. Stress and coping factors influence tumor growth. *Science*. 1979;205:513-515.

Smith, J. A. Guidelines, standards and perspectives in exercise immunology. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1995;27:497-506.

Soderholm J. D. and M. H. Perdue. Stress and the gastrointestinal tract II. Stress and intestinal barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001;280:G7-G13.

Solomon G. F. Stress and antibody response in rats. *Int Arch Allergy* 1965;35:97-104.

Song C., Kenis G., van Gastel A., Bosmans E., Lin A., de Jong R., Neels H., Scharp C. S., Janca A. Yasukawa K., Maes M. Influence of psychological stress on immune-inflammatory variables in normal human: Part II. Altered serum concentrations of natural antiinflammatory agents and soluble membrane antigens of monocytes and T lymphocytes. *Psychiatry Res* 1999;33:59-71.

Spanos C., Pang X., Ligris K. et al. Stress-induced bladder mast cell activation: implication for intestinal cystitis. *J. Urol.* 1997;157:669-672.

Spehner V., B. De Wazieres, L. Nicod, S. Harraga, J. R. Robert and E. Seilles. Auditory stress induces changes in membrane functions in mouse peritoneal macrophages. *Scand J Immunol* 1996;44: 643-647.

Springer, T. A. *Annu. Rev. Physiol.* 1995;57:827-872.

Stefano G. B. Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta Pharmacologica Sinica* 2000; 21:1071-1081.

Stefano G. B., Fricchione G. L., Slingsby B. T. and Benson H. The placebo effect and relaxation response: neural processes and their coupling to constitutive nitric oxide. *Brain Research Reviews*, 2001; 35:1-19.

Stefano G. B., Murga J. and Benson H. et al. Nitric oxide inhibits norepinephrine stimulated contraction of human internal thoracic artery and rat aorta. *Pharmacology Research*, 2001;43: 199-203.

Strausbaugh H. J., M. F, Dallman and J. D. Levine. Repeated, but not acute, stress suppresses inflammatory plasma extravasation. *PNAS* 1999;96(25): ¿PAGINAS ?

Styrt B. and Sugarman B. Estrogens and infection. *Rev Infect Dis* 1991;3:1139-1150.

Sudo N., X. N. Yu, H. Sogawa and C. Kubo. Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation* 1997;4:113-119.

Sudo N., N. Oyama, X. N. Yu and C. Kubo. Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoids decreases Peyer's Patch cell numbers via mechanisms that are either dependent or independent on apoptotic cell death. *Neuroimmunomodulation* 2001;9:333-339.

Takkouche B., Regueira C., Gestal-Otero J. J. A cohort study of stress and the common cold. *Epidemiology* 2001;12:345-349

Tarcic N., Levitan G., Ben-yosef D. Proust P., Ovadia H. and Weiss D. *Neuroimmunomodulation* 1995;2:249-257.

Temoshok, L. Personality coping style, emotion and cancer: towards and integrative model. *Cancer Surv.* 1987;6:545-567.

Tobian A. A., D. H. Canadian, W. H. Boom and C. V. Harding. 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J. Immunol.* 2004;172:5277-5286.

Tselikman VE, Volchegorskii IA, Kolesnikova OL, Gienko IA, Viazovskii IA, Lifshits RI. The formation of blood system tolerance in rats to the repeated action of a stressor stimulus. *Fiziologicheskii Zhurnal Imen I M Sechenova.* 1995;81:88-94.

Tsukada F., M. Sugawara, K. Sawamura, Y. Ohuchi, H. Kohno and Y. Ohkubo. B3-adrenoceptor is involved in the inhibition of small intestinal motility due to restraint stress in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2001;24(9):995-997.

Tsuyuguchi K., Suzuki K., Matsumoto H., Tanaka E., Amitani R. and Kuze F. Effect of estrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin Exp Immunol* 2001;123:428-434.

Watanabe M. Tomiyama-Miyaji C. Kainuma E. Inoue M. Kuwano Y. Ren H. Shen J. Abo T. Role of α -adrenergic stimulus in stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. 2008;115:43-49.

Watanobe H, Sasaki S, Takebe K. Involvement of oxytocin and cholecystokinin-8 in interleukin-1 beta-induced adrenocorticotropin secretion in the rat. *Neuroimmunomodulation.* 1995;2:88-91.

Weinberg A. D., J. J. Wallin, R. E. Jones, T. J. Sullivan, D. N. Bourdette, A. A. Vandenberg and H. Offner. Target organ-specific up-regulation of the MRC OX-40 marker and selective production of Th1 lymphokine mRNA by encephalitogenic T helper cells isolated from the spinal cord of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1994;152:4712-4721.

- Weisse C. S., C. N. Pato, C. G. McAllister *et al.* Differential effects of controllable and uncontrollable acute stress on lymphocyte proliferation and leukocyte percentages in humans. *Brain Behav Immun* 1990;4:339-51.
- Wenner M, Kawamura N, Miyazawa H, Ago Y, Ishikawa T, Yamamoto H. Acute electrical stimulation of lateral hypothalamus increases natural killer cell activity in rats. *Journal of Neuroimmunology*. 1996;67:67-70.
- Westley, H. J., and K. W. Kelley. Physiologic concentrations of cortisol suppress cell-mediated immune events in the domestic pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1984;177:156-164.
- Wieggers, G. J., and J. M. H. M. Ruel. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. *Trends Pharmacol. Sci.* 1998;19:317-321.
- Wieggers G. J., I. E. M. Stec, P. Stezer, J. M. H. M. Ruel. Glucocorticoids and the immune response. *Handbook of stress and the brain.* 2005;15:175-191.
- Willner, P. and P. J. Mitchell. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol.* 2002;13:169-188.
- Wonnacott KM, Bonneau RH. The effects of stress on memory cytotoxic T lymphocyte - mediated protection against herpes simplex virus infection at mucosal sites. *Brain Behav. Immun* 2002;16:104-117.
- Wrona D, Jurkowski MK, Trojnar W. Staszewaska M, Tokarski J. Electrolytic lesions of the lateral hypothalamus influence peripheral blood NK cytotoxicity in rats. *Journal of Neuroimmunology*. 1994;55:45-54.
- Wrona, D., W. Trojnar, A. Borman, Z. Ciepielewski, and J. Tokarski. Stress-induced changes in peripheral natural killer cell cytotoxicity in pigs may not depend on plasma cortisol. *Brain Behav. Immun.* 2001;15:54-64.
- Xu Y., N. H. Hunt and S. Bao. The effect of restraint stress on experimental stress on experimental colitis is IFN- γ independent. *Journal of Immunology*. 2008;200:53-61.
- Yancey A. L., Watson H. L., Cartner S. C. and Simecka J. W. Gender is a major factor in determining the severity of *Mycoplasma* respiratory disease in mice. *Infect Immun* 2001;69:2865-2871.
- Yin D., R. A. Mufson, R. Wang and Y. Shi. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* 1999;397:218.
- Yin D., D. Tuthill, R. A. Mufson and Y. Shi. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.* 2000;191:1423-1428.

Zautra A. J., M. H. Burleson, K. S. Matt, S. Roth and L. Burrows. *Health Psychol.* 1994;13: 139-148.

Zelena D., Z. Mergl, A. Földes, K. J. Kovács, Z. Tóth and G. B. Makara. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1110-E-1117.

Zhou D., A. W. Kusnecov, M. R. Shurin, M. DePaoli and B. S. Rabin. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 1993;133(6):2523-2530.

Ziegler D. R. and J. P. Herman. Local integration of glutamate signaling in the hypothalamic paraventricular region: regulation of glucocorticoid stress response. *Endocrinology* 2000;141(12): 4801-4804.

ANEXO 1



Fig. 15a. Primera toma de temperatura rectal



Fig. 15b. Toma de temperatura rectal durante la aplicación del protocolo de estrés

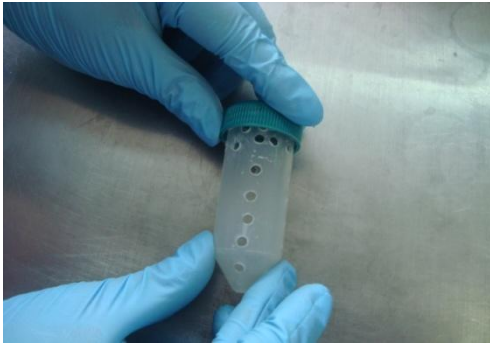


Fig. 16. Tubo cónico para restringir el movimiento



Fig. 17. Aplicación del protocolo de estrés



Fig. 18. Disección del ejemplar anestesiado



Fig. 19. Exsanguinación y sacrificio del animal



Fig. 20a. Recuperación de la sangre para la obtención de suero



Fig. 20b. Obtención de suero



Fig. 21a. Extracción del bazo



Fig. 21b. Bazo en PBS 1X y en hielo *frappé*

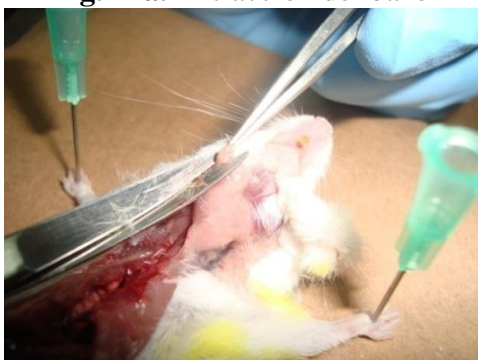


Fig.22. Extracción de ganglios cervicales

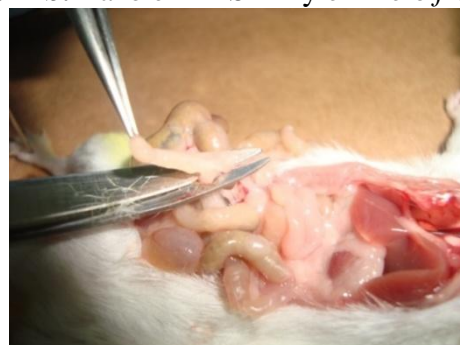


Fig. 23. Extracción de ganglios mesentéricos



Fig. 24. Ganglios linfáticos en PBS 1X y en hielo *frappé*



Fig. 25a. Obtención de placas de Peyer

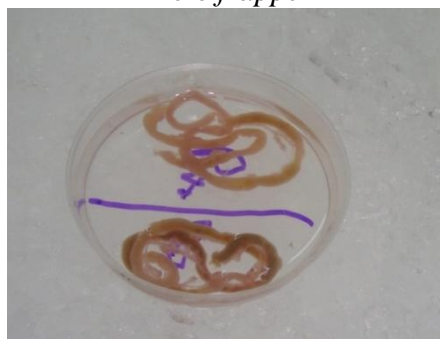


Fig. 25b. Placas de Peyer en PBS 1X y en hielo *frappé*

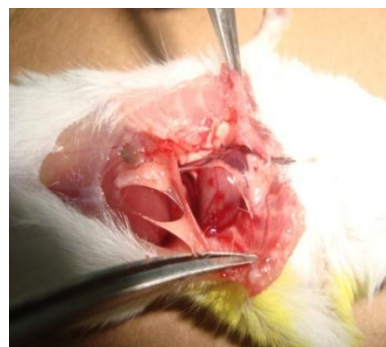


Fig. 26a. Extracción del timo

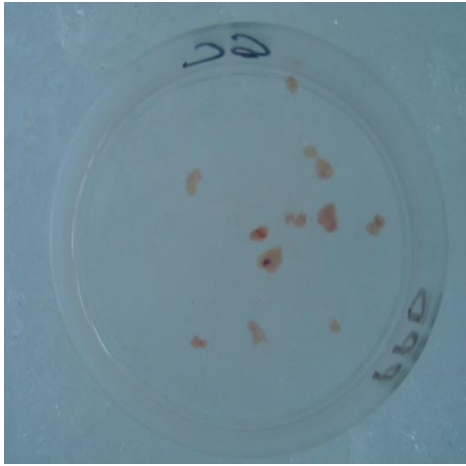


Fig 26b. Timo en PBS 1X y en hielo *frappé*



Fig. 27. Disgregación de los órganos linfoides



Fig. 28a. Recuperación del filtrado celular

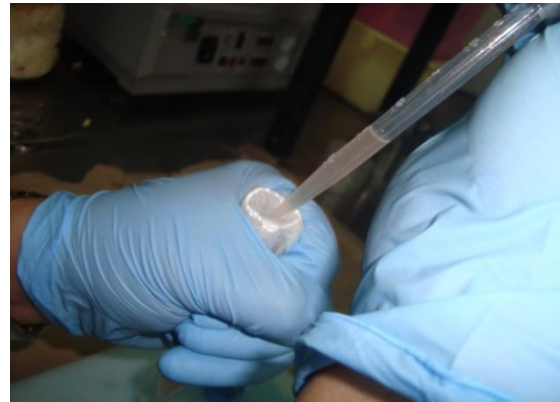


Fig. 28b. Segundo filtrado con organza



Fig. 28c. Obtención de la suspensión celular

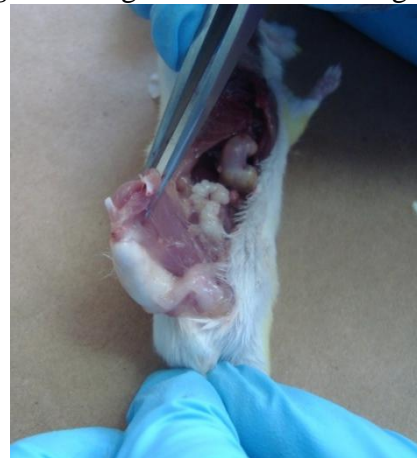


Fig. 29a. Desollamiento de las patas traseras



Fig. 29b. Desarticulación de las patas traseras

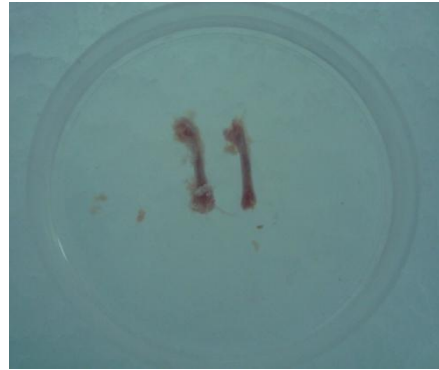


Fig. 29c. Obtención de los *femura*



Fig. 29d. Lavado de los *femura* para la obtención de la médula ósea

|