

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**EFFECTO DEL ESTRÉS AGUDO INDUCIDO POR INMOVILIZACIÓN EN LA
SECRECIÓN Y TRANSPORTE DE IgA EN DUODENO E ILEON DE
RATONES BALB/c**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

M.C. y P. JUAN PABLO NEGRETE GONZÁLEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ALDO ARTURO RESÉNDIZ ALBOR

DRA. MARYCARMEN GODÍNEZ VICTORIA



ENERO 2012



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 29 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Efecto del estrés agudo inducido por inmovilización en la secreción y transporte de IgA en Duodeno e Ileón de ratones Balb/c”

Presentada por el alumno:

Negrete

Apellido paterno

González

Apellido materno

Juan Pablo

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	2	6	3
---	---	---	---	---	---	---

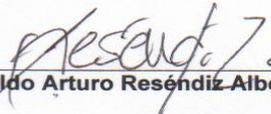
aspirante de:

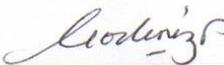
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

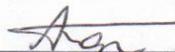
Directores de tesis


Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

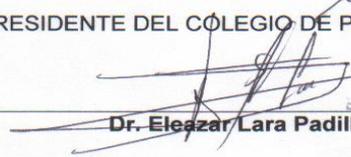

Dra. Marycarmen Godínez Victoria


Dr. Rafael Campos Rodríguez


Dr. Saúl Rojas Hernández


Dr. Alexander Kormanovski
Kovzova

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

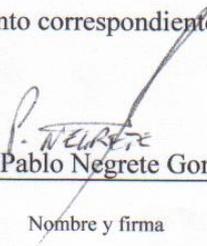


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 29 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Negrete González Juan Pablo alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091263 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor, Dra. Marycarmen Godínez Victoria y cede los derechos del trabajo intitulado "Efecto del estrés agudo inducido por inmovilización en la secreción y transporte de IgA en Duodeno e Ileón de 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 director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **pollito78_2@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Juan Pablo Negrete González

Nombre y firma

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología de Mucosas del Departamento de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor y la Dra. Marycarmen Godínez Victoria.

Durante la realización de esta tesis el alumno contó con el apoyo de la Beca-Tiempo otorgada por el Departamento de Comisión Mixta de Becas de la Sección III del ISSSTE y el Departamento de Enseñanza de la Delegación Poniente del ISSSTE, durante el periodo de agosto del 2009 a diciembre del 2011 y el apoyo del Instituto Politécnico Nacional con la Beca Institucional durante el periodo de agosto del 2009 a junio de 2010 y la Beca PIFI en el proyecto 20100655.

CONTENIDO

	Página
Índice	II
Índice de cuadros y figuras	V
Abreviaturas	VI
Resumen	IXI
Abstract	XI
Introducción	1
Materiales y métodos	30
Resultados	40
Discusión	49
Conclusiones	54
Perspectivas	55
Referencias	56

ÍNDICE

1. Introducción.	
1. Antecedentes generales.	1
1.1. Tejidos linfoides asociados a las mucosas.	1
1.2. Tejido linfoide asociado al intestino.	2
1.3. Transporte de IgA, IgG e IgM en mucosa intestinal.	5
1.4. Funciones del tejido linfoide asociado a mucosas.	8
1.5. Características de la IgA.	9
1.6. IgA polimérica.	10
1.7. Componente secretor.	11
1.8. Sistema nervioso-endocrino-inmunológico.	11
1.8.1 Efecto de citocinas sobre el SNC.	15
1.9. Estrés.	18
1.10. Antecedentes históricos del estrés.	22
2. Antecedentes Directos.	23
2.1. Niveles de IgA durante condiciones de estrés.	23
2. Planteamiento del problema.	26
3. Justificación.	27
4. Hipótesis.	28
5. Objetivos.	29
1. Objetivos generales.	29
2. Objetivos particulares.	29

6. Materiales y métodos.	30
1. Animales y grupos de experimentación.	30
2. Protocolo de estrés agudo.	31
3. Obtención de muestras biológicas.	31
3.1. Obtención de suero.	32
3.2. Intestino delgado.	32
3.3. Líquidos intestinales.	32
3.4. Placas de Peyer.	33
3.5. Células Epiteliales.	33
3.6. Células de lámina propia intestinal.	34
4. Determinación de Corticosterona.	35
5. Determinación de los Niveles intraluminales de sIgA.	35
6. Determinación de expresión de pIgR e IgA.	37
7. Determinación de Linfocitos B y Células Plasmáticas productoras de IgA.	38
8. Análisis Estadístico.	39
7. Resultados.	40
7.1. Niveles séricos de corticosterona.	40
7.2. Efecto del estrés agudo sobre la producción de IgA en el segmento proximal y distal del intestino delgado.	41
7.3. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células linfoides en placas de Peyer	42

7.4. Efecto del estrés agudo sobre el porcentaje de células linfoides en la lámina propia de duodeno e íleon.	44
7.5. Expresión de pIgR en células epiteliales de la mucosa de intestino delgado.	46
7.6. Expresión de pIgR en células intraepiteliales de mucosa de intestino delgado.	47
7.7. Expresión relativa de IgA en células epiteliales de la mucosa del intestino delgado bajo condiciones de estrés.	48
8. Discusión.	49
9. Conclusiones.	54
10. Perspectivas.	55
11. Referencias.	56

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Interacción de las hormonas con las células inmunes.	17
Cuadro 2. Efectos del estrés agudo sobre el Sistema Inmune.	21
Figura1. Representación de los elementos que integran el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT).	5
Figura 2. Transporte de IgA en la mucosa intestinal.	7
Figura3. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.	18
Figura 4. Modelo de estrés inducido por inmovilización.	31
Figura 5. Niveles séricos de corticosterona.	40
Figura 6. Efecto del estrés agudo inducido por inmovilización sobre la concentración de IgA en líquido intestinal de duodeno e íleon.	41
Figura 7. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células linfoides en placas de Peyer en duodeno e íleon.	43
.Figura 8. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células linfoides en lámina propia de duodeno e íleon.	45
Figura 9. Expresión relativa de pIgR en células epiteliales de la mucosa de duodeno de ratones Balb/C bajo condiciones de estrés.	46
Figura 10. Expresión relativa de pIgR en células epiteliales de la mucosa de íleon de ratones Balb/C bajo condiciones de estrés.	47
Figura 11. Expresión relativa de IgA en células epiteliales de la mucosa del intestino delgado de ratones Balb/c bajo condiciones de estrés.	48

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
cm	Centímetro
CMF	Citometría de flujo
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTL	Linfocitos t citotóxicos
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EIA	Inmunoensayo enzimático
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESM	Escuela Superior de Medicina
FAE	Folículo asociado al epitelio
GABA	Acido gamma-aminobutírico
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
HPA	Eje hipotálamo-pituitario-adrenal
IFN- γ	Interferon gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgA-S	Inmunoglobulina A secretora
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

IgM-S	Inmunoglobulina M secretoria
IL	Interleucina
IMC	Inmunidad mediada por células
IPN	Instituto politécnico nacional
Lc	Linfocitos
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LP	Lamina propia
M	Molar
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mIgA	Inmunoglobulina A monomérica
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NALT	Tejido linfoide asociado a nariz
ng	Nanogramos
NK	Natural killer (células asesinas)
NOM	Norma Oficial Mexicana
pIgR	Receptor de inmunoglobulinas poliméricas
PM	Peso molecular
PP	Placa de Peyer
PVDF	Polivinilideno de difluorido
RI	Respuesta inmune

RIA	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SAM	Eje simpático-adrenal-medular
SC	Componente secretor
SI	Sistema inmune
SNC	Sistema nervioso central
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
IU	Unidades internacionales
WB	Western blot

RESUMEN

Diferentes estudios han demostrado el efecto del estrés sobre el sistema inmune; entre ellos se ha observado un aumento en los niveles de IgA intraluminal del intestino delgado. Sin embargo se desconoce si este efecto es causado por un aumento en la permeabilidad intestinal inducido por la liberación de catecolaminas liberadas durante el estrés o por un aumento en la secreción y transporte de IgA en la mucosa intestinal. El objetivo de este estudio fue determinar si el estrés agudo modifica la secreción y transporte de IgA en el segmento proximal y distal del intestino delgado de ratones Balb/C como un mecanismo que explique el aumento en los niveles de IgA intraluminal. Para esto se consideraron 2 grupos de estudio: 1) control y 2) estrés. El grupo control se mantuvo bajo condiciones libres de estrés. En el grupo problema, el estrés agudo se indujo por inmovilización de las 4 extremidades y la cola de los ratones durante 4 h. Se obtuvieron muestras de suero para la determinación de corticosterona y se disecaron el duodeno y el íleon de los cuales se obtuvieron líquido intestinal, lámina propia, placas de Peyer y células epiteliales para la cuantificación de IgA, determinación del porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA y expresión de pIgR e IgA, respectivamente. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo en la concentración de IgA en líquidos intestinales en ratones sometidos a estrés siendo mayor la respuesta en íleon. También se observó un aumento en la expresión de pIgR en células epiteliales y en el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA⁺. Lo que permite concluir que el estrés agudo inducido por inmovilización aumenta la síntesis, el transporte y la secreción de IgA en ambos segmentos intestinales siendo el significativamente mayor en íleon.

ABSTRACT

Different studies have shown the effect of stress on the immune system. Within these effects has been found an increase in the levels of IgA intraluminal of the small intestine. However it is not known whether this effect is caused by an increase in intestinal permeability induced by the release of catecolaminas released during stress, or by an increase in the secretion and transport of IgA in

the intestinal mucosa. The general objective of this study was to determine if the acute stress modifies the secretion and transport of IgA in the proximal and distal segment of small intestine Balb/C. In this study was considered 2 study groups: 1) control group and 2) group of stress. The control group was under stress-free. In the problem group, acute stress was induced by immobilization of the 4 tips and the tail of mice for 4 hours. Serum samples were obtained for the determination corticosterona and dissected the duodenum and the ileum of which were obtained intestinal fluid, Peyer's patches and epithelial cells for the quantification of IgA, determination of the percentage of plasma cells producing IgA and expression of pIgR and IgA, respectively.

I. INTRODUCCION

1. ANTECEDENTES GENERALES

Las mucosas constituyen el sitio de entrada para muchos agentes patógenos y es el lugar de contacto con diferentes antígenos ambientales y alimenticios. A diferencia de la piel que es una barrera físicamente difícil de

atravesar por los microorganismos, las mucosas son desde este punto de vista, más frágiles. Sin embargo, están dotadas de un sistema de protección altamente especializado para regular la entrada de patógenos al organismo constituido por el tejido linfoide asociado a las mucosas ¹

1.1. Tejidos linfoides asociados a las mucosas

Se cree que la inducción de la inmunidad en las superficies mucosas ocurre en los agregados linfoides especializados denominados colectivamente como tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, por sus siglas en inglés).

El MALT cubre aproximadamente 400 m² de superficie corporal, el área más grande del cuerpo y ha desarrollado mecanismos que discriminan entre antígenos inofensivos, microorganismos comensales y patógenos peligrosos.²

El MALT está constituido principalmente en el tracto respiratorio por el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), en la nasofaringe (por ejemplo, amígdalas palatina y lingual); por el tejido linfoide asociado a nariz (NALT), a nivel intestinal por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), por ejemplo, placas de Peyer, apéndice, nódulos linfáticos mesentéricos, nódulos linfoides aislados y linfocitos intraepiteliales y por el tejido linfoide asociado al tracto genitourinario. Además del tejido linfoide, las células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas, en el GALT y en el tracto genitourinario pueden actuar como sitios inductores mucosos.¹

1.2. Tejido Linfoide Asociado al Intestino

El intestino delgado se divide en tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon. Anatómicamente el GALT se divide en dos compartimentos: a) tejido linfoide organizado, que es un sitio inductor de la respuesta inmunitaria intestinal constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos; y b) tejido linfoide difuso que es un sitio efector de la respuesta inmunitaria integrado por poblaciones de linfocitos dispersos en el entramado epitelial, linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos de la lamina propia.³

Las placas de Peyer (PP) están formadas por agregados linfoides macroscópicos situados en la cara anti-mesentérica de la mucosa intestinal. El tejido linfoide está separado del lumen intestinal por una monocapa de células epiteliales columnares, células M, LIE y algunas células secretoras de moco llamadas células de Goblet. Las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos luminales, carecen de recubrimiento de glicocálix y en su superficie luminal presentan pliegues en lugar de los microvilli característicos del resto de enterocitos.^{4,5} Por debajo de la monocapa de células, se encuentra una región difusa denominada cúpula subepitelial o región del domo, integrada por células dendríticas y algunos macrófagos. Las áreas interfoliculares están compuestas principalmente por linfocitos T cooperadores (CD4), células dendríticas maduras y macrófagos. Los folículos están integrados principalmente por linfocitos B IgM⁺ y precursores de células plasmáticas productoras de IgA. Los

centros germinales tienen principalmente linfocitos B IgA⁺ de memoria. A diferencia del resto de los órganos linfoides, las PP sólo presentan vasos linfáticos eferentes^{4,5}

Los ganglios linfáticos mesentéricos se localizan en el mesenterio del intestino y se dividen estructuralmente en tres regiones con distinta composición celular: corteza, paracorteza y médula. La corteza contiene folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B y células dendríticas. Por el contrario, la paracorteza se caracteriza por una elevada proporción de linfocitos T y células dendríticas. La médula, región más interna del ganglio, está integrada por linfocitos T y B y células plasmáticas.⁶

El sistema inmune común de mucosas se divide en sitios inductores, donde el antígeno es localizado, endocitado, procesado y presentado a los linfocitos T, mientras que en los sitios efectores ocurre la secreción de anticuerpos.⁷

El principal tejido linfoide que ha sido estudiado es las PP que se localizan en el intestino delgado. Las PP contienen una región en forma de domo que se encuentra altamente enriquecida por linfocitos (Lc), macrófagos, células dendríticas y células plasmáticas. Este tejido se encuentra recubierto por un epitelio, que contiene un folículo asociado al epitelio (FAE) y células M, altamente especializado para la absorción y transporte de antígenos intactos (proteínas, bacterias, virus y pequeños parásitos) hacia el tejido linfoide interno. Por debajo del domo de las PP los diferentes folículos contienen centros germinales donde ocurre la división de las células B. Estos centros germinales son los sitios principales donde se lleva a cabo el *switch* o el cambio de isotipo de

inmunoglobulinas de superficie en las células B (IgM⁺ o IgA⁺). Las áreas de células T son adyacentes y proporcionan funcionalidad a los linfocitos T citotóxicos (CTL) y células Th2 que favorecen la producción de IgA. Dentro de estos sitios inductores también se encuentran las células presentadoras de antígeno como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B⁷.

Una característica de los sitios inductores del BALT y del GALT es llevar la información inmunogénica que surge en una superficie mucosa a otras superficies mucosas del cuerpo. De esta forma, por la estimulación antigénica de las PP, las células B precursoras de IgA y células T activadas, vía vasos linfáticos eferentes alcanzan la circulación sistémica a través del ducto torácico y pueden diseminarse hacia los sitios efectores, constituidos por la LP de las mucosas intestinal, respiratoria, genitourinaria y de las glándulas secretorias (lagrimales, salivales y mamarias). Bajo la influencia del antígeno, de células T y citocinas se da la expansión clonal de células B que se convierten en células plasmáticas maduras. Este mecanismo de distribución de las células que forman parte de los sitios inductores a los sitios efectores, es conocido como sistema inmune común de mucosas⁷.

La IgA polimérica (pIgA) es mayoritaria en secreciones mucosas, mientras que en suero predomina la IgA monomérica (mIgA)⁹. La pIgA es transportada hacia la superficie mucosa mediante transcitosis epitelial. En este proceso, la IgA que contiene la cadena J se une al receptor de Ig polimérica (pIgR) presente en la membrana basolateral de las células epiteliales. El complejo IgA pIgR es internalizado y transportado mediante vesículas a la membrana apical de la célula epitelial para ser liberado al lumen intestinal. Durante el proceso de liberación, el pIgR se fragmenta y el dominio extracelular, componente secretor, queda unido a la pIgA, confiriendo resistencia frente a proteasas presentes en el lumen intestinal (Figura 2)¹⁰.

La producción de IgA mucosa está regulada por el perfil de citocinas presente. Así la IL-5, IL-6, TGF- β e IL-10 favorecen el cambio de isotipo de los linfocitos B y la síntesis de IgA en células plasmáticas³.

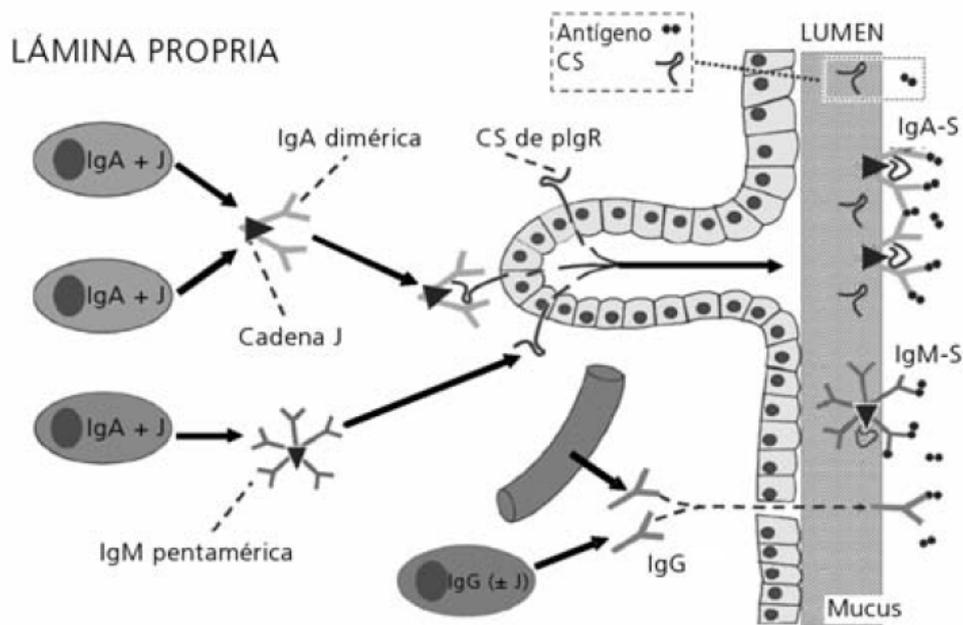


Figura 2. Transporte de IgA en mucosa intestinal. La IgA e IgM se sintetizan en el intestino de forma de polímeros y son transportadas al lumen intestinal mediante la unión con el receptor de Ig poliméricas (pIgR), mientras que la IgG, procedente en su mayoría de circulación sistémica es liberada al lumen por vía paracelular¹⁰.

La IgM se encuentra también en la superficie intestinal (6-18%) pero en menor proporción que la IgA, debido a la existencia de un menor número de células plasmáticas mucosales productoras y a un transporte menos eficiente de IgM al lumen intestinal¹¹. La IgM-S está compuesta por 5 moléculas de IgM unidas mediante la cadena J, al igual que la IgA. El transporte de IgM se realiza también a través del pIgR, pero a diferencia de IgA, IgM se une de forma no covalente al componente secretor y por ello es más lábil a enzimas proteolíticas. La IgM-S es más abundante en las primeras etapas de vida y puede llegar a ser el isotipo

mayoritario en individuos deficientes de IgA, puesto que la producción y transporte de IgM suelen estar incrementados como mecanismo compensador. No obstante, la IgM-S no puede reemplazar totalmente la funcionalidad de la IgA-S¹⁰.

1.4. Funciones del tejido linfoide asociado a las mucosas

La función primaria del MALT es proporcionar defensa al individuo en las superficies mucosas. Esta función opera coordinadamente con diversos factores protectores no inmunitarios, como son la: 1) flora bacteriana residente, que inhibe el crecimiento de patógenos potenciales; 2) la actividad motriz de la mucosa, peristalsis y su función ciliar, que mantiene el flujo de constituyentes de la mucosa, y por lo tanto disminuye la interacción de patógenos potenciales con células epiteliales; 3) sustancias como ácido gástrico y sales biliares intestinales que crean en las mucosas un ambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos; 4) las secreciones mucosas (glicocálix) que forma una barrera entre los patógenos potenciales y las superficies epiteliales y 5) los factores humorales innatos como la lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima que tienen efectos inhibidores específicos sobre los microorganismos. Una segunda función pero de igual importancia es evitar la entrada de antígenos de la mucosa a la circulación y proteger así el sistema inmunológico sistémico⁷.

1.5. Características de la IgA

En el organismo la IgA constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos por el MALT. Además, los anticuerpos S-IgA no solo están presentes en las secreciones externas, sino también ejercen propiedades antimicrobianas a las células epiteliales durante su transporte a través del epitelio. Representan la clase de inmunoglobulina predominante en las secreciones externas, cantidad bien definida, que brinda una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosas, al producir un bloqueo a este nivel ante la penetración al organismo de estos agentes patógenos¹².

La IgA es la inmunoglobulina predominante en la saliva y secreciones intestinales en forma de IgA-S, la mayoría se produce como resultado de una síntesis y no del torrente circulatorio. Entre sus funciones están las de inhibir la adherencia bacteriana y la neutralización de enzimas, virus y toxinas. Puede unirse de forma específica a moléculas presentes en la superficie bacteriana mediadora de la unión de esta célula epitelial, y su unión a la bacteria aumenta la afinidad de este complejo a la mucina, lo cual facilita la inmovilización del microorganismo a la capa mucosa con la consiguiente eliminación¹³.

La sIgA existe como una molécula polimérica compuesta de dos o más monómeros de sIgA, el peso molecular de cada monómero es de 300 kDa y está compuesto de una cadena J que las une (15.6 kDa) y un componente secretor (70 kDa). Cada monómero sIgA está formado de 4 polipéptidos, dos cadenas pesadas α y dos cadenas ligeras κ ó λ unidas covalentemente por enlaces bisulfuro. El componente secretor es una proteína altamente glicosilada producida por las

células epiteliales de la mucosa. Dicho componente secretor es muy importante porque estabiliza la estructura polimérica de la sIgA¹⁴.

En el humano hay dos subclases de IgA; IgA1 e IgA2. Las cadenas pesadas de IgA1 e IgA2 difieren solamente por 22 aminoácidos, tales diferencias estructurales le otorgan a la IgA2 resistencia a la acción de proteasas bacterianas que cortan específicamente a la IgA1 en la región de la bisagra¹⁵.

1.6. IgA Polimérica

La IgA es la inmunoglobulina más abundante que se presenta en la mucosa intestinal (80-90%) y desempeña un papel muy importante como primera defensa frente a toxinas y a la colonización e invasión de patógeno.

Se sintetiza principalmente en la lámina propia del intestino en respuesta a la activación de linfocitos T de las placas de Peyer. Estructuralmente, se distinguen dos isoformas de IgA: monomérica y polimérica⁹.

La inmunoglobulina A (IgA) es la clase de anticuerpos de mayor síntesis en humanos, existiendo dos subclases: IgA1 e IgA2, con tres halotipos¹⁶. En suero, la IgA suele presentarse en forma monomérica, mientras que en las secreciones aparece mayoritariamente en forma polimérica, fundamentalmente como dímero formado por dos monómeros de IgA, unidos por la cadena de unión J. La IgA secretora (IgAs) contiene en su estructura el componente secretor (CS), con siete sitios de N-glicosilación y la cadena J con un sitio N-glicano¹⁷.

1.7. Componente Secretor.

Componente secretor es un componente de IgA cuál consiste en una porción receptor polimérico de la inmunoglobulina. IgA polimérico ata al receptor polimérico de la inmunoglobulina en la superficie basolateral de células epiteliales y se toma en la célula vía transcitosis. El complejo del receptor-IgA pasa a través de los compartimientos celulares antes de ser secretada en superficie del luminal de las células epiteliales, todavía unido al receptor. Proteólisis del receptor ocurre y la molécula dimérica de IgA, junto con el componente secretor, está libre difundir a través del lumen¹⁸.

La IgA secretora humana (IgAs) contiene en su estructura un componente secretor, con 7 sitios de N-glicosilación y la cadena J con un sitio N-glicano. El CS esta unido de forma covalente en un extremo al dominio C α 2 y el otro extremo interactua de forma no covalente y al mismo tiempo con la cadena J y uno de los dominios C α 3 de la cadena pesada¹⁹. Los N-glicanos del componente secretor proveen a la IgA sitios de unión a las bacterias, además de que asegura la localización in vivo de las IgAs mediante su anclaje a células epiteliales de las superficies mucosas¹⁹.

1.8. Sistema Nervioso-Endocrino-Inmunológico. Relación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico

El concepto de que el cerebro puede modular al sistema inmune (SI) da origen a la teoría del estrés. Recientes avances en el estudio de las interacciones

entre el sistema nervioso central (SNC) y el SI han mostrado una vasta red de vías de comunicación entre estos 2 sistemas^{20 21}.

El sistema nervioso simpático (SNS), el cual inerva extensamente los órganos linfoides estableciendo conexiones anatómicas entre los sistemas nervioso e inmune, regula la función del SI principalmente por la vía de neurotransmisores adrenérgicos liberados a través de rutas neuronales^{29,22}. Las células inmunes accesorias y los linfocitos tienen receptores de membrana para la mayoría de los neuropéptidos y neurotransmisores como la norepinefrina, el principal neurotransmisor liberado en las terminaciones nerviosas simpáticas, y estas células responden a agonistas adrenérgicos, así como a otros neurotransmisores. Estos receptores son funcionales y su activación conduce a cambios en las funciones inmunes que incluyen la proliferación celular, el quimiotactismo y las respuestas inmunes específicas^{23,29}.

Existe una regulación recíproca entre el SNC y el SI, a través de la cual el SNC da señales al SI por vía hormonal y neuronal, y el SI da señales al SNC a través de polipéptidos producidos por las células inmunes. La principal vía hormonal por la cual el SNC regula al SI es el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) a través de las hormonas de la respuesta neuroendocrina de estrés^{31, 30}.

Las uniones entre el sistema nervioso y el SI son sugeridas por condiciones de comportamiento de inmunosupresión, los efectos de las lesiones cerebrales y el estrés sobre la respuesta inmune (RI) y cambios fisiológicos y químicos que ocurren en el cerebro durante esta respuesta.

Estas uniones incluyen glucocorticoides secretados por las glándulas adrenales, catecolaminas y neuropéptidos secretados por terminaciones nerviosas simpáticas y la médula adrenal, ciertas hormonas pituitarias, así como señales originadas en las células inmunes accesorias tales como los monocitos y los macrófagos, que están representadas principalmente por citocinas proinflamatorias^{20,29,24}.

Bajo condiciones de estrés agudo, la activación del SNS conduce a una liberación de norepinefrina de las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares. A través de interacciones con receptores α y β adrenérgicos, la epinefrina y la norepinefrina median los efectos metabólicos y cardiovasculares adaptativos bajo condiciones de estrés. Sin embargo, en condiciones de estrés crónico o prolongado, las acciones excesivas de los productos del eje HPA y del SNS pueden conducir a alteraciones patofisiológicas en muchos sitios del cuerpo incluyendo al SI²⁵.

Las catecolaminas son otra parte integral de la respuesta fisiológica a los estresores y son los efectores principales de la clásica respuesta “huída o lucha”. La activación inducida por el estresor de las células cromafines de la médula adrenal, conduce a la liberación de epinefrina a la circulación. Las elevaciones en plasma de epinefrina están estrechamente relacionadas con las elevaciones en plasma de glucocorticoides que sigue a la activación del eje HPA²⁶.

En animales hipofisectomizados se ha demostrado que la respuesta autoinmune, la inmunidad mediada por células (IMC) y la inmunidad mediada por anticuerpos (Acs), queda interrumpida o afectada²⁷. Este hallazgo apunta hacia un papel de las hormonas pituitarias en la generación de respuestas inmunes. La inmunocompetencia es restaurada en estos animales mediante tratamiento con prolactina²⁸. Por otro lado, se conoce que la hormona del crecimiento es necesaria en la maduración y funcionamiento adecuado del SI. Enfermedades como la acromegalia, donde la hormona del crecimiento es excesiva, está asociada con hipertrofia del timo y de los ganglios linfáticos²⁹. Los ratones deficientes en hormona del crecimiento y en tirotrófina, manifiestan deficiencia de la IMC, defecto que es corregido parcialmente por la administración de hormona del crecimiento, y totalmente cuando se añade a este tratamiento la tiroxina, de lo que se deduce que la prolactina, la hormona del crecimiento y la tirotrófina, ejercen efectos positivos sobre el SI^{34,20}.

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) es liberada de la pituitaria bajo la influencia del factor liberador de Corticotropina (FLC), principalmente producido por las neuronas de los núcleos paraventriculares del hipotálamo. La ACTH causa liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal, considerados potentes agentes inmunosupresores. Se ha demostrado que la ACTH actúa directamente sobre los linfocitos y puede aún ser sintetizada por estos. Por lo tanto, la liberación de ACTH de la pituitaria y posiblemente de los linfocitos activados, ejerce efectos inhibitorios sobre el SI³⁰. Los glucocorticoides constituyen el principal efector, y la

señal del sistema neuroendocrino y a través del receptor para glucocorticoides, ejercen efectos múltiples sobre las moléculas y las células inmunes³¹. Los corticosteroides afectan negativamente muchos aspectos de la IMC y provocan el cambio de respuesta de tipo T *helper* 1 (Th1) a respuesta de tipo T *helper* 2 (Th2)³².

1.8.1. Efectos de las citocinas sobre el SNC.

Durante una respuesta inmunológica (RI), las citocinas son liberadas por los linfocitos activados y por los macrófagos.

Estas citocinas proinflamatorias producidas en la periferia actúan sobre el cerebro por 2 vías principales: 1. una vía humoral, que permite a los patrones moleculares patógenos específicos actuar sobre receptores *toll-like* en aquellas áreas del cerebro que están desprovistas de una barrera hematoencefálica funcional, las así llamadas áreas circunventriculares, y 2. una vía neural, representada por los nervios aferentes que inervan los sitios corporales de infección y daño. En ambos casos, las citocinas producidas periféricamente inducen la expresión de citocinas cerebrales que son producidas por macrófagos residentes y células microgliales.

Estas citocinas producidas localmente se difunden a través del parénquima cerebral y actúan sobre áreas blanco del cerebro para organizar los componentes centrales de la respuesta del huésped a la infección²⁵. La IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) actúan sobre el hipotálamo para producir fiebre,

presumiblemente debido a que existen receptores para estas citocinas en las neuronas hipotalámicas³³.

Breder, Dinarello y Saper, comunicaron en su trabajo investigativo, que existe una población de neuronas dentro del hipotálamo que contiene IL-1 dentro de sus somas y axones. Estos autores argumentan que la IL-1 es una proteína neuronal intrínseca y un modulador de la función neuronal, es decir, que no solamente es una citocina, sino también un neuromodulador o una neurocina. Esto sugiere un mecanismo por el cual una señal de la periferia puede convertirse en un sistema de señal intrínseco para el SNC³⁴. Además, se ha señalado que cantidades extremadamente pequeñas de IL-1 actúan en el cerebro, lo que produce supresión de las respuestas inmunes celulares muy rápidamente y por un período de tiempo prolongado³⁵.

No obstante, las cosas se pueden complicar un poco más. Las células del sistema inmune poseen receptores para neurotransmisores diferentes de la Noradrenalina, tal es el caso de la acetilcolina, serotonina y dopamina. Cuadro 1

Cuadro 1. Interacción de las hormonas con células de sistema inmunes³⁶.

Hormona	Células que expresan receptores	Función celular
Corticosterona	Células T y B, neutrófilos y macrófagos	Inhibe la inflamación, inhibe la producción de IL-12 por CPA, inducir a un cambio de la producción de citocinas Th2 a Th1
Hormona liberadora Corticotropina	Células T, monocitos y macrófagos	Aumenta la producción de IL-1, pruebas de la modulación de la inflamación autócrina y / o parácrina
Catecolaminas: Adrenalina y Noradrenalina	Células T y B, células NK, monocitos y macrófagos	Inducir cambio hacia la respuesta Th2, participa CPA y células Th1

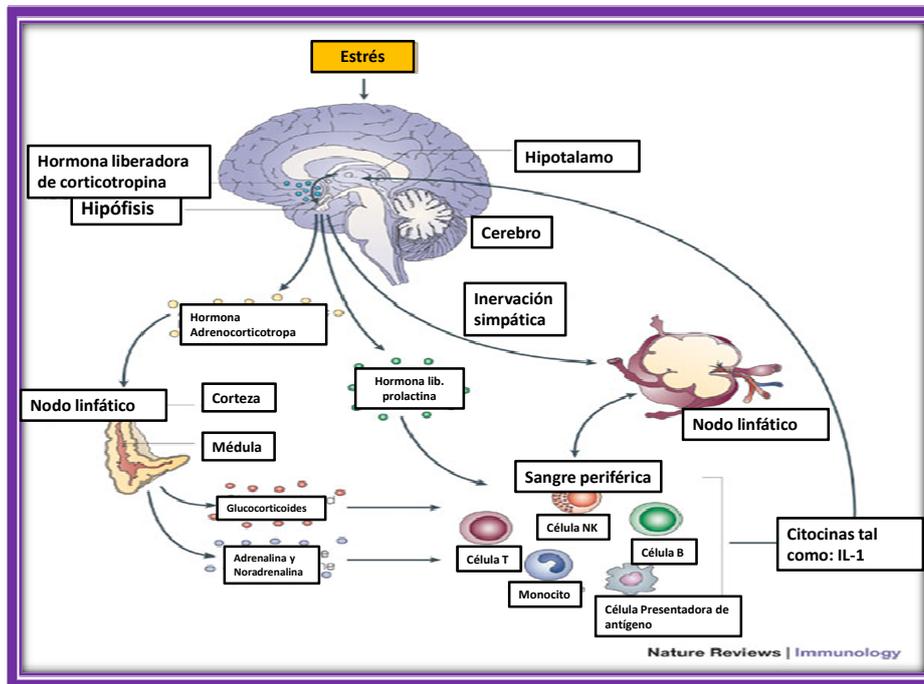


Figura 3. El eje HHA y el sistema nervioso autónomo dispone de dos vías clave para la desregulación del sistema inmunitario. Los factores de estrés pueden activar el eje simpático-adrenal-medular (SAM), así como el eje HPA, y por lo tanto provocar la liberación de hormonas hipofisarias y suprarrenales como las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), hormona corticotropina (ACTH), cortisol, hormona del crecimiento y la prolactina, que a su vez pueden actuar directa o indirectamente sobre el sistema inmunológico³⁷.

1.9. Estrés

El término estrés deriva del latín *stringere*, que significa originalmente “oprimir”, “apretar”, “atar”. En el siglo XVII la palabra estrés se utilizó frecuentemente para expresar el sufrimiento, la privación, las pruebas, calamidades y adversidades que tenían que padecer las personas. Más tarde, en

el siglo XVIII, el concepto estrés dejó de referirse a las consecuencias emocionales y comenzó a denotar el factor desencadenante de tales reacciones en el individuo. La palabra “estrés” se relaciona con el vocablo inglés strain, que alude a la tensión excesiva, conducente a comprimir y constreñir y que, en el caso de las ciencias biológicas, se usa para describir las características fisiológicas de la respuesta corporal al estrés⁷.

Actualmente el término estrés se utiliza para aludir a cualquier condición que perturba seriamente la **homeostasis o alostasis**, equilibrio dinámico del organismo) fisiológica y psicológica^{7, 36, 1} y que el organismo percibe como aversiva³⁸.

La palabra estrés es un concepto multidimensional que también se ha empleado para denotar sus tres componentes: el estresor la respuesta del organismo al estresor, y los estados fisiológicos intermediarios entre estresor y reacción corporal o procesos de evaluación cognoscitiva y emocional. Los **estresores** se definen como cualquier estímulo, externo o interno (físico, químico, acústico, somático y sociocultural), que de manera directa o indirecta propicie desestabilización en el equilibrio dinámico del cuerpo (homeostasis o alostasis)^{39 7, 36}.

Los estresores pueden estar presentes de manera aguda o crónica y también pueden ser resultado de la anticipación mental acerca de lo que puede ocurrir^{39,40, 7}. Los estresores psicológicos son los más potentes para desencadenar respuestas fisiológicas y conductuales.

Tipos de Estrés

La clasificación del estrés depende del tipo de estímulo, duración y frecuencia, por lo tanto se puede clasificar en:

1) estrés agudo: que se define como la aplicación de un estímulo único corto.

2) estrés crónico: que es la aplicación de estímulos repetitivos y que tienen una duración más larga⁴¹

La falta de control sobre el estresor contribuye a la aparición de enfermedades derivadas del estrés al deterioro en la capacidad de memoria y aprendizaje, a la exacerbación de las disfunciones cognitivas asociadas con la edad y al incremento en la susceptibilidad de las neuronas hipocámpicas a la atrofia o necrosis en respuesta a cambios metabólicos⁷.

Por otro lado, la “respuesta al estrés” puede definirse como el conjunto de reacciones fisiológicas y conductuales dirigidas a restablecer la homeostasis del organismo^{39, 7, 36,42}, cuya ocurrencia está determinada por la percepción que el organismo tiene del estresor. Por tanto, se puede decir que el “estrés es vida”, ya que se trata de un mecanismo adaptativo cuya meta es neutralizar los factores que alteran el estado de homeostasis; pero si el estrés se mantiene por periodos prolongados puede también ser “muerte”, debido a que el estrés crónico conlleva a múltiples estados patológicos, físicos^{42, 7} y/o psicológicos⁷. En el cuadro 2 se muestran los diferentes efectos del estrés sobre el sistema inmune.

Cuadro 2. Efectos del estrés agudo sobre el sistema inmune ³⁶.

Sistema innato inespecífico	<ul style="list-style-type: none">-Secreción de IL6- Inhibición de IL-12 e IL-12R (Liberación de radicales libres de oxígeno)- Elevación de Proteína C reactiva- Acumulación de amiloide- Déficit en fagocitosis- Reducción en MHC- Activación del complemento
Inmunidad humoral	<ul style="list-style-type: none">- Hipergamaglobulinemia- Aumenta IgE
Inmunidad celular	<ul style="list-style-type: none">- Reducida producción de IL 2- Incremento en producción de IL-10- Incremento producción de IL-4- Reducción de número y función NK- Reducida proliferación células T- Reducida producción de IFN-γ

1.10. Antecedentes históricos del estrés

Walter B. Cannon puede ser considerado como el padre de la teoría del estrés. Él enfocó su trabajo en el aspecto adaptativo de la respuesta al estrés para hacer frente a las emergencias³⁹. En 1915 Cannon propuso su “reacción de alarma” para explicar el incremento en la secreción de adrenalina después de la exposición del organismo a cualquier estresor; demostró así que esto se lleva a cabo como una forma de adaptación a la situación de estrés⁴³.

A Hans Selye, uno de los principales exponentes en la teoría del estrés, también se le considera como uno de los padres de dicha teoría. Selye describió las consecuencias patológicas del estrés crónico, así como las características generales de la respuesta al estrés^{44, 39, 7, 36}; definió al “síndrome general de adaptación” (o estrés) como la respuesta del organismo a algo perdido, un desequilibrio al que se debe hacer frente^{44, 19, 7}. Selye estudió también la reacción del segundo sistema endocrino involucrado en la respuesta de estrés, los glucocorticoides, y descubrió la inespecificidad de este sistema, ya que los glucocorticoides responden virtualmente a cualquier estresor. El síndrome general de adaptación (respuesta al estrés) descrito por Hans Selye consistía en tres etapas:

Fase de alarma: etapa en que el organismo se percata del agente nocivo (estresor), activa su sistema nervioso simpático y la corteza y médula de las glándula suprarrenales (que secretan glucocorticoides y adrenalina,

respectivamente) para movilizar los recursos energéticos necesarios que harán frente a la situación.

Fase de resistencia o adaptación: utiliza los recursos energéticos disponibles y, al mismo tiempo, los sistemas y órganos innecesarios para sobrevivir a la emergencia disminuyen sus funciones, por ejemplo, los sistemas digestivo y reproductivo, mientras que otros, como el inmune incrementan su actividad.

Fase de desgaste: se caracteriza por imposibilidad del organismo para hacer frente al agente estresor debido al enorme requerimiento y desgaste energético. Por lo tanto, si el estresor continúa activo, el organismo desarrolla múltiples patologías e incluso puede llegar a la muerte.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1. NIVELES DE IgA DURANTE CONDICIONES DE ESTRÉS.

Estudios donde evalúan el efecto del estrés sobre los niveles de IgA secretora (SIgA) en GALT se han enfocado principalmente a la mucosa oral siendo muy pocos los estudios enfocados a la mucosa intestinal. Los resultados obtenidos han demostrado que el efecto del estrés sobre diferentes factores de la inmunidad humoral a nivel de mucosas varía dependiendo del tipo y duración del estrés (agudo o crónico).

El proceso de desconfianza (estrés) en un individuo está asociado con la activación del eje HPA, caracterizada por un incremento en el cortisol y este

período de activación está relacionado con una significativa disminución de los niveles de IgA secretora en saliva en humanos cuando son sometidos a estrés ⁴¹. Por otra parte se ha observado que personas que son sometidas a estrés agudo ya sea físico o psicológico, los niveles de esta inmunoglobulina aumentan significativamente en saliva^{45,46}.

A nivel de mucosa intestinal sólo se cuenta con estudios en modelos de animales donde se evalúan las modificaciones sobre diferentes factores de la inmunidad celular y humoral ante el estrés crónico. En un estudio donde se evalúan el efecto del estrés crónico inducido por restricción de movimiento han mostrado que hay una reducción de la concentración de IgA intestinal, sin cambios en el número de células productoras de IgA en la lámina propia del intestino delgado siendo este efecto reversible con la adrenalectomía ya que este procedimiento restauró la producción de IgA intestinal en los ratones estresados. La simpatectomía química evitó la disminución de IgA intestinal observada en los ratones estresados. Cuando se administró dexametasona y epinefrina la concentración de IgA intestinal disminuyó significativamente así como el número de células productoras de IgA demostrando que el estrés crónico por restricción de movimiento, redujo la concentración de IgA intestinal a través de los efectos de los glucocorticoides y las catecolaminas.⁴⁷

Antecedentes en nuestro laboratorio han demostrado que el estrés agudo inducido por inmovilización aumenta los niveles intestinales de IgA, así como de la población de linfocitos intraepiteliales de la mucosa duodenal de los ratones

Balb/C. Estas observaciones nos permiten confirmar que la respuesta a nivel inmunológico depende tanto del tipo de estrés como de la duración del mismo (agudo y crónico).⁵⁹

Otros antecedentes de nuestro laboratorio son los siguientes:

En el estudio del efecto del estrés agudo por restricción de movimiento sobre la producción de IgA y poblaciones de linfocitos T y B del NALT de ratones Balb/C se observó un incremento en los niveles de IgA en lavados nasales y una disminución del porcentaje de linfocitos B y TCD4.⁴⁸

Por otra parte también se analizó el efecto del estrés agudo inducido por nado forzado sobre las poblaciones de linfocitos T y B en el Tejido Linfoide Asociado a la Nariz en ratones Balb/C. en el cual también se observó un aumento en los niveles de IgA en lavados nasales y en el porcentaje de linfocitos T CD4 en el NALT, pero los linfocitos B se mantuvieron sin cambios significativos⁵⁸.

Por último se investigó el efecto del estrés agudo inducido por nado sobre la producción de IgA y en las poblaciones de linfocitos T y B de la lámina propia y placas de Peyer del intestino delgado (ID) de ratones Balb/C. encontrando un incremento en los niveles intestinales de IgA y los porcentajes de linfocitos B en el segmento proximal y distal del ID⁴⁹.

En el 2009 se estudió el efecto del estrés agudo por inmovilización en la producción basal de IgA en intestino delgado de ratones Balb/C encontrando un incremento en los niveles intestinales de IgA y poblaciones de linfocitos B en el segmento proximal y distal del ID⁵⁰.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El estrés agudo aumenta la concentración de IgA en el lumen de los diferentes segmentos del intestino delgado debido a un aumento en la secreción de IgA en los sitios inductor y efector así como al aumento en el transporte de IgA (transcitosis) en el epitelio de la mucosa intestinal?

III. JUSTIFICACION

La mayoría de los trabajos donde evalúan el efecto del estrés agudo sobre la respuesta humoral adaptativa a nivel de mucosa del sistema gastrointestinal sólo han estudiado los niveles de IgA en saliva. Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que a nivel de mucosa intestinal existe un aumento en los niveles de IgA en el lumen del duodeno y del íleon de ratones sometidos a estrés agudo inducido por inmovilización. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual aumenta el nivel de esta inmunoglobulina. Los niveles de IgA en la mucosa intestinal durante el estrés pueden modificarse por dos mecanismos ya sea por un aumento en la permeabilidad intestinal mediado por la liberación de catecolaminas como la adrenalina y la noradrenalina o por la interacción de las catecolaminas (noradrenalina, serotonina, acetilcolina, GABA y Neuropeptido-Y, entre otras) y los glucocorticoides (corticosterona) con los receptores de las células del sistema inmune activando o suprimiendo su función. En este trabajo evaluamos el efecto del estrés agudo inducido por inmovilización sobre la secreción y el transporte de IgA como posibles mecanismos por los cuales los niveles de IgA en el lumen intestinal se encuentran aumentados.

IV. HIPOTESIS

El incremento en la concentración de IgA en el lumen intestinal se debe tanto al aumento en el transporte de IgA mediado por el pIgR como a una mayor secreción de IgA por células plasmáticas localizadas en los sitios inductores y efectores de la mucosa intestinal.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el estrés agudo inducido por inmovilización modifica la secreción y transporte de IgA en duodeno e íleon de ratones Balb/C.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los niveles de corticosterona sérica para validar el modelo de estrés inducido por inmovilización.
2. Determinar el efecto del estrés agudo sobre los niveles de IgA en el lumen de duodeno e íleon por la técnica de ELISA.
3. Determinar el efecto del estrés agudo sobre la secreción de IgA en lámina propia y placas de Peyer mediante la determinación del porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA por citometría de flujo.
4. Determinar el efecto del estrés agudo sobre el transporte de IgA a través de la expresión de pIgR en células epiteliales por la técnica de Western-blot.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y grupos de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/C, machos de 8 a 12 semanas de edad con un peso de 25 a 30 g obtenidos del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. El manejo de los animales se hizo en conformidad con las regulaciones federales de México para la atención y experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, Ciudad de México, México) y aprobado por el Comité Institucional de uso y cuidado animales de la ESM-IPN.

Los ratones se mantuvieron en grupos de 5 animales en cajas de plástico, aislados del ruido y sin variaciones de temperatura. Fueron alimentados a libre demanda y en ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h. Todos los ensayos se iniciaron a las 7 de la mañana para evitar la influencia del ciclo circadiano sobre la secreción hormonal.

De manera aleatoria los animales fueron divididos en 2 grupos de 5 animales cada uno. Grupo 1, ratones control; Grupo 2, ratones sometidos a estrés agudo. El grupo control se mantuvo en movimiento libre y bajo las condiciones antes mencionadas, hasta el momento de su sacrificio. El grupo de estrés agudo fue sometido a un protocolo de estrés durante 4 h e inmediatamente después fue sacrificado.

2. Protocolo de estrés agudo

El estrés se indujo por inmovilización durante 4 h. Para esto los ratones fueron inmovilizados de sus 4 extremidades y la cola sobre una plancha quirúrgica (Figura 3). Inmediatamente después del periodo de estrés los animales fueron sacrificados para la obtención de muestras biológicas.



Figura 4. Modelo de estrés inducido por inmovilización. Los animales fueron fijados a una placa con cinta adhesiva de sus 4 extremidades y la cola durante 4 h e inmediatamente después fueron sacrificados.

3. Obtención de muestras biológicas

Al concluir el periodo de estrés, ambos grupos de ratones fueron anestesiados con ketamina a una dosis de 100UI intraperitoneal y sacrificados por dislocación cervical para obtener diferentes muestras biológicas.

3.1. Obtención del suero

Se obtuvieron de 0.5 a 1 mL de sangre por punción intracardiaca. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se formó el coágulo (1 h aproximadamente). Posteriormente fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 min. El suero fue recuperado y almacenado en alícuotas de 100 μ L a -70 °C hasta el momento de su análisis para la determinación de corticosterona.

3.2. Intestino delgado

Para obtener el intestino delgado se realizó una incisión en la línea media en la región abdominal del animal. Los puntos de referencia del intestino delgado fueron 0.2 cm por debajo del píloro y 0.2 cm por arriba del ciego. Posteriormente el intestino se dividió en dos partes iguales para obtener el segmento proximal (duodeno) y distal (íleon) del intestino para la obtención de líquidos intestinales, placas de Peyer y células epiteliales.

3.3. Líquidos intestinales

Se transfundieron 3 mL de PBS 1X a través de la luz de cada segmento intestinal con ayuda de una cánula la cual fue introducida 0.5 cm por uno de los polos de cada segmento intestinal. Los lavados intestinales se transfirieron a tubos de plástico de 15 mL y se les agregó 100 μ L de un cóctel inhibidor de proteasas (Complete mini REF 11 836 153 001, Roche).

Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación fue almacenado en

alícuotas de 100 μ L a -70 °C hasta el momento de su análisis para la determinación de SIgA por la técnica de ELISA e Inmunoblot.

3.4. Placas de Peyer

Para visualizar las placas de Peyer (PP), se introdujo una cánula de metal de forma longitudinal de cada segmento intestinal. Las PP fueron disecadas con ayuda de unas tijeras curvas. Se obtuvieron de 4-5 placas por cada segmento intestinal. Las PP fueron disgregadas con ayuda de una malla de organza y lavadas con PBS. La suspensión celular se ajustó a 1×10^6 células/mL para la determinación de células plasmáticas por citometría de flujo (CMF).

3.5. Células Epiteliales

Una vez disecadas las PP, el intestino fue evertido e incubado en 50 mL de una disolución de EDTA 1.5 mM en medio de cultivo RPMI e incubado a baño María a 37 °C en agitación constante (~ 150 rpm), durante 30 min. El intestino fue disgregado con el embolo de una jeringa para desprender las células epiteliales. La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de organza, transferida a un tubo cónico de 15 mL y centrifugada a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el botón celular fue resuspendido con 10 mL de medio de cultivo RPMI. La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de organza y nuevamente centrifugada bajo las mismas condiciones. Posteriormente el botón celular fue resuspendido en 4 mL de Percoll al 20 % (GE Healthcare Bio-Sciences AB 17-0891-01) y transferido a un tubo de plástico cónico que contenía 4 mL de Percoll al 40% con la finalidad de formar un gradiente (40:20). Los tubos

fueron centrifugados a 2500 rpm durante 25 minutos a 4°C con 0 de aceleración y 0 de desaceleración. Se recuperaron las células obtenidas de la interface que corresponden a las células epiteliales, se lavaron con 10 mL de medio de cultivo RPMI y se centrifugaron a 1500 rpm, durante 10 min a 4 °C para eliminar el excedente de Percoll y así evitar la muerte celular ocasionada por este medio. El botón celular fue recuperado y resuspendido en 1 mL de búfer de lisis, se agregaron 400 µL de un cóctel inhibidor de proteasas y se homogenizaron en un agitador vórtex. La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recuperado y almacenado en alícuotas de 100 µL a -70 °C hasta el momento de su análisis para la detección de la expresión de plgR e IgA por la técnica de Western-blot (WB).

3.6. Células de lámina propia intestinal

Después de la incubación de los segmentos intestinales con la disolución de EDTA, los intestinos fueron lavados en medio de cultivo RPMI 1640 e incubados en una disolución de RPMI con 60 IU/mL de colagenasa tipo IV (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), en baño María a 37 °C, en agitación continua a 150 rpm, durante 30 min. Posteriormente los intestinos fueron disgregados con ayuda del embolo de una jeringa para romper las fibras de colágena de la matriz extracelular. La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de organza y centrifugada a 1500 rpm, durante 10 min a 4 °C. El botón celular fue resuspendido en 10 mL de medio de cultivo RPMI 1640 y centrifugado bajo las mismas condiciones para lavarlo. El botón celular fue resuspendido en 4 mL de Percoll al

40% y trasferido a un tubo cónico que contenía 4 mL de Percoll al 75 % para formar un gradiente de Percoll de 75:40. El gradiente se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas para la obtención de células epiteliales hasta obtener el botón celular para su cuantificación. Las células de la lámina propia fueron empleadas para la cuantificación de linfocitos B y células plasmáticas productoras de IgA por CMF.

4. Determinación de Corticosterona

Los niveles de corticosterona fueron determinados en suero por inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en ingles enzyme immunoassay) utilizando un kit de la marca Stressgen (catalogo 901-097 480), con base a las instrucciones del fabricante. La lectura de la placa se llevó a cabo 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 en ng/mL

5. Determinación de los niveles de sIgA en líquidos intestinales

Los niveles de sIgA se determinaron por la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) en líquidos intestinales de duodeno e íleon de ratones Balb/C bajo condiciones fisiológicas y de estrés agudo.

En una placa de ELISA de 96 pozos de fondo plano se agregaron 100 μ L de una disolución de anticuerpo anti-IgA de mieloma de ratón hecho en conejo a una dilución 1:100 en búfer de carbonatos con pH de 9.3 y se incubó toda la noche en refrigeración a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05% de 2 min por cada lavado y otros 3 lavados con PBS 1X de 2 min por cada lavado.

La placa se bloqueó con 100 μ L/pozo de una disolución de leche libre de grasas al 6 % en PBS-Tween al 0.05%. A continuación la placa se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.05% de 2 min por cada lavado y otros 3 lavados con PBS 1X de 2 min por cada lavado. Posteriormente se agregaron 100 μ L/pozo de cada muestra de líquido intestinal diluida 1:5 en PBS-1X. La placa se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se decantó y se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.05% y 3 veces con PBS 1X. Se agregaron 100 μ L de un anticuerpo anti-IgA peroxidado de ratón (Sigma) diluido 1:3000 en una disolución de PBS-Tween al 0.05% e incubada 2 h a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS-Tween al 0.05% y se agregaron 100 μ L de disolución de sustrato/pozo (ácido cítrico 0.1 M, difosfato disódico 0.2 M, peróxido de hidrógeno al 30 %, orto-fenidiamina 4.6 mM en agua destilada) y se incubó la placa a temperatura ambiente (TA) en oscuridad durante 10 minutos. La reacción se detuvo agregando 50 μ L por pozo de una disolución de ácido sulfúrico 2.5 M. La absorbancia fue determinada en un lector de placas de ELISA utilizando un filtro de 492 nm.

6. Determinación de la expresión de pIgR

La expresión de pIgR en células epiteliales de duodeno e íleon de ratones control y bajo condiciones de estrés, se determinaron por la técnica de Western-Blot.

La concentración proteica de cada muestra fue determinada por el método de Bradford. A cada muestra proteica de células epiteliales se le agregaron 18 μ L de SDS y 2 μ L de β -mercaptoetanol y se incubaron a baño María a 80 °C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas. Se utilizaron 30 μ g de cada extracto proteico/pozo en un gel de poliacrilamida al 10 %. La electroforesis se llevo a cado a 88 V durante 2 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF a 18 V para pIgR y 20 V en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad, modelo No.trans-blot SD Cell).

Para la determinación de IgA, las membranas fueron bloqueadas con una disolución de leche al 5% (w/v) en búfer TBS-T pH 7.4 durante 2 h en agitación continua e incubadas con una disolución de anticuerpo primario policlonal anti-IgA (anti conejo) a una dilución 1:10,000, durante toda la noche en refrigeración y en agitación continua. Posteriormente se realizaron 3 lavados de las membranas con disolución TBS-T1X de 10 min cada uno en agitación a TA.

Para la determinación de pIgR, las membranas fueron bloqueadas con una disolución de gelatina de pescado al 1% (w/v) diluida en búfer TBS-Tween 0.05% a pH 7.4 durante 2 h en agitación continua. Posteriormente las membranas fueron incubadas con una disolución de anticuerpo primario policlonal anti-componente

secretor (SC) a una dilución 1:10 000, durante toda la noche en refrigeración y en agitación continua. Después se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con disolución TBS-Tween 0.05% a pH 7.4 y se incubaron con una disolución de anticuerpo secundario anti conejo a una dilución 1:10 000 en gelatina de pescado al 1% (w/v) diluida en búfer TBS-Tween 0.05% a pH 7.4 durante 2 h a TA en agitación constante. Se realizaron 3 lavados de las membranas de 10 min cada uno con disolución TBS-Tween 0.05% a pH 7.4.

Finalmente, las membranas fueron incubadas durante 1 min con luminol (Santa Cruz) y las bandas fueron detectadas usando una película fotográfica (Film Bag Amersham Hyperfilm ECL) con una exposición de 30 segundos para IgA y 2 min para pIgR. La densitometría de las bandas de proteínas fueron determinadas con el software Quantity One 1-D.

7. Determinación de linfocitos B y células plasmáticas productoras de IgA

Los linfocitos B y las células plasmáticas productoras de IgA de las placas de Peyer y la lámina propia del duodeno e íleon de ratones control y bajo condiciones de estrés fueron determinadas por CFM. Todos los ensayos fenotípicos para la caracterización de los linfocitos se realizaron en paralelo. Los linfocitos totales aislados fueron ajustados a una concentración de 1×10^6 células/mL en PBS 1x, y se incubaron con 10 μ L de los cocteles de anticuerpos

diluidos 1:100 durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las células se lavaron por centrifugación con 500 μ L de PBS durante 5 min a 3000 rpm y se fijaron con 400 μ L de *p*-formaldehído al 1%, finalmente se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis. Para esto se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD19/PE (BD Pharmigen, catálogo SC21714), anti-CD138/APC (BD Pharmigen, catálogo 558626) y anti-IgA/FITC (BD Pharmigen, catálogo 559354). La tinción de las células se llevó a cabo utilizando el protocolo de tinción intracelular de Beckton Dickinson.

Una vez teñidas las células, fueron adquiridas en un citómetro de flujo FASC Calibur, BD utilizando el software Cell Quest Pro V. 4.0. Se adquirieron 20,000 eventos de la región de linfocitos delimitada en el dot-plot de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC). Los archivos fueron analizados utilizando el software Summit V 4.0. Se reporta el porcentaje de linfocitos positivos de la región de linfocitos totales.

8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat, versión 11.0. En todos los casos se compararon las medias de los resultados obtenidos entre el grupo control y el grupo de estrés (*t* de student). Para la comparación de medias de ambos grupos de estudio entre ambos segmentos intestinales se utilizó la técnica de ANOVA de una vía. La significancia estadística se consideró cuando el valor de *p* fue ≤ 0.05

VII. RESULTADOS

7.1. Niveles séricos de corticosterona

Para validar el protocolo de estrés, se determinaron los niveles de corticosterona en suero de ratones en condiciones fisiológicas y de estrés por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

La Figura 5 muestra que los ratones sometidos a estrés inducido por inmovilización durante 4 h aumentaron significativamente la concentración sérica de corticosterona (139.07 ± 3.78 ng/mL) en comparación con los ratones del grupo control (5.4 ± 4.5 ng/mL) los cuales se mantuvieron en condiciones libres de estrés hasta el momento de su sacrificio; ($P < 0.001$).

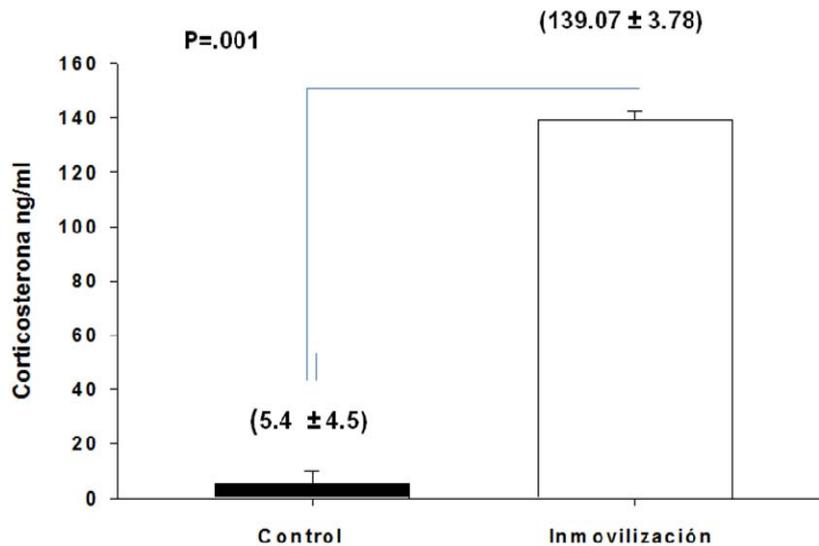


Figura 5. Niveles sericos de Corticosterona. Las barras representan la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes entre sí (n=6 ratones/grupo). Los ratones estresados aumentaron significativamente la concentración de corticosterona en comparación con el grupo control; ($P < 0.001$).

7.2 Efecto del estrés agudo sobre la producción de IgA en el segmento proximal y distal del intestino delgado

La concentración de IgA en el lumen duodenal aumentó significativamente en los ratones bajo condiciones de estrés ($0.79 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$) en comparación con el grupo control ($0.55 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$; $P < 0.001$). Este mismo efecto se observó a nivel de íleon encontrando una concentración de IgA significativamente más alta en los ratones sometidos a estrés ($1.2 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ vs $0.73 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ en el grupo control; ($P < 0.001$). Otro aspecto de gran importancia fue la concentración significativamente más alta de IgA en el íleon en comparación con el duodeno en ambos grupos de estudio ($P < 0.001$).

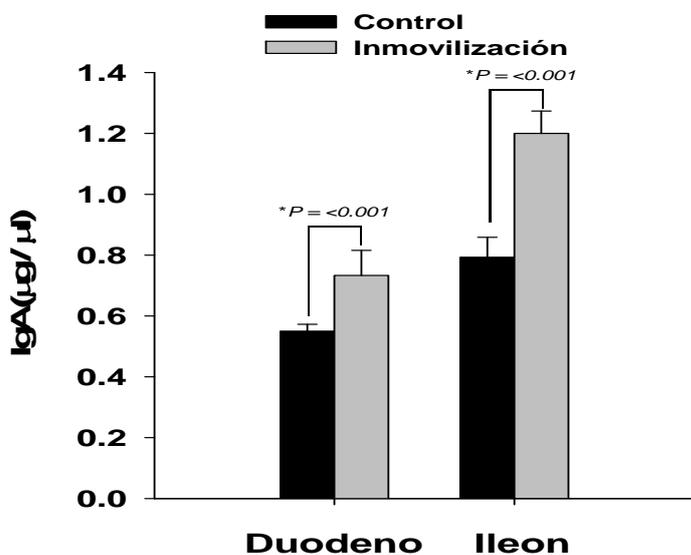


Figura 6. Efecto del estrés agudo inducido por inmovilización sobre la concentración de IgA en líquido intestinal de duodeno e íleon. Los niveles de IgA aumentaron significativamente en los ratones sometidos a estrés en comparación con el grupo control en ambos segmentos. Las barras representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes entre si.

7.3. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células linfoides en placas de Peyer

El porcentaje de linfocitos B (células CD19+), células plasmáticas (CD138+/CD19+) y células plasmáticas productoras de IgA (CD138+/CD19+/IgA+) en placas de Peyer del intestino delgado fueron determinados por citometría de flujo.

A nivel de duodeno (Figura 7A), se puede observar un aumento significativo del porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA en placas de Peyer en los ratones bajo condiciones de estrés ($2.82 \pm 0.15\%$ vs $2.04 \pm 0.03\%$) en comparación con el grupo control

Al igual que duodeno, el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA ($6.08 \pm 1.1\%$ vs $2.1 \pm 0.4\%$) aumentó significativamente en comparación con el grupo control en el íleon. También se observó un aumento en el porcentaje de células plasmáticas (Figura 7B).

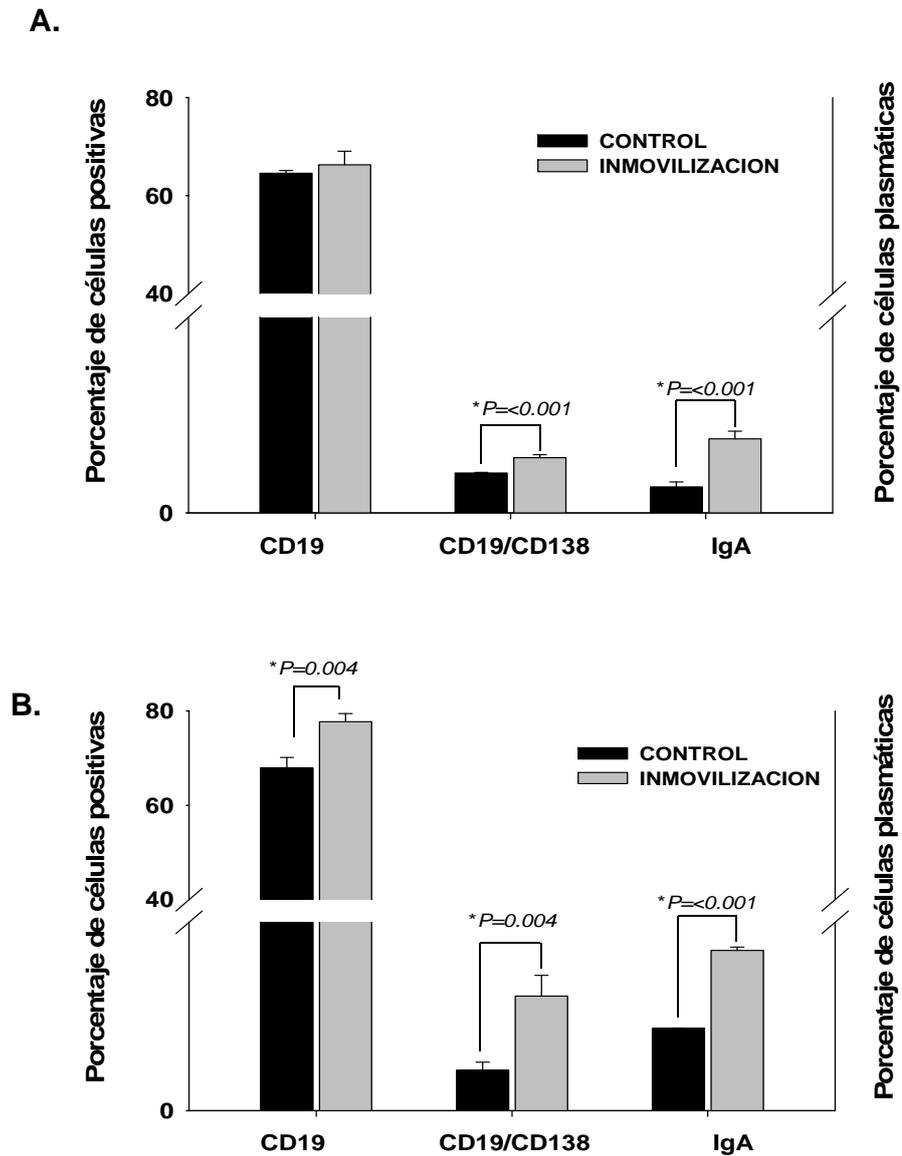


Figura 7. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células linfoides en placas de Peyer en duodeno (A) e íleon (B). Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes entre sí (n=6 ratones/grupo/experimento). Las poblaciones linfoides estudiadas fueron: linfocitos B, CD19; células plasmáticas, CD19/CD138; y células plasmáticas productoras de IgA, IgA.

7.4 Efecto del estrés agudo sobre el porcentaje de células linfoides en la lámina propia de duodeno e íleon

A nivel de lámina propia duodenal (Figura 8A) también se observó un aumento significativo en el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA en los ratones sometidos a estrés (4.73 ± 0.36) en comparación con el grupo control (2.29 ± 0.18). Las células plasmáticas productoras de IgA de la lámina propia de íleon (Figura 8B) también aumentaron significativamente en el grupo de estrés (2.88 ± 0.83 versus 2.55 ± 0.15 en el grupo control).

A diferencia de las placas de Peyer, las células B y las células plasmáticas totales sólo aumentaron de manera significativa en el duodeno de ratones sometidos a estrés (Figura 8A). En el íleon estas células se mantuvieron sin cambios significativos (Figura 8B).

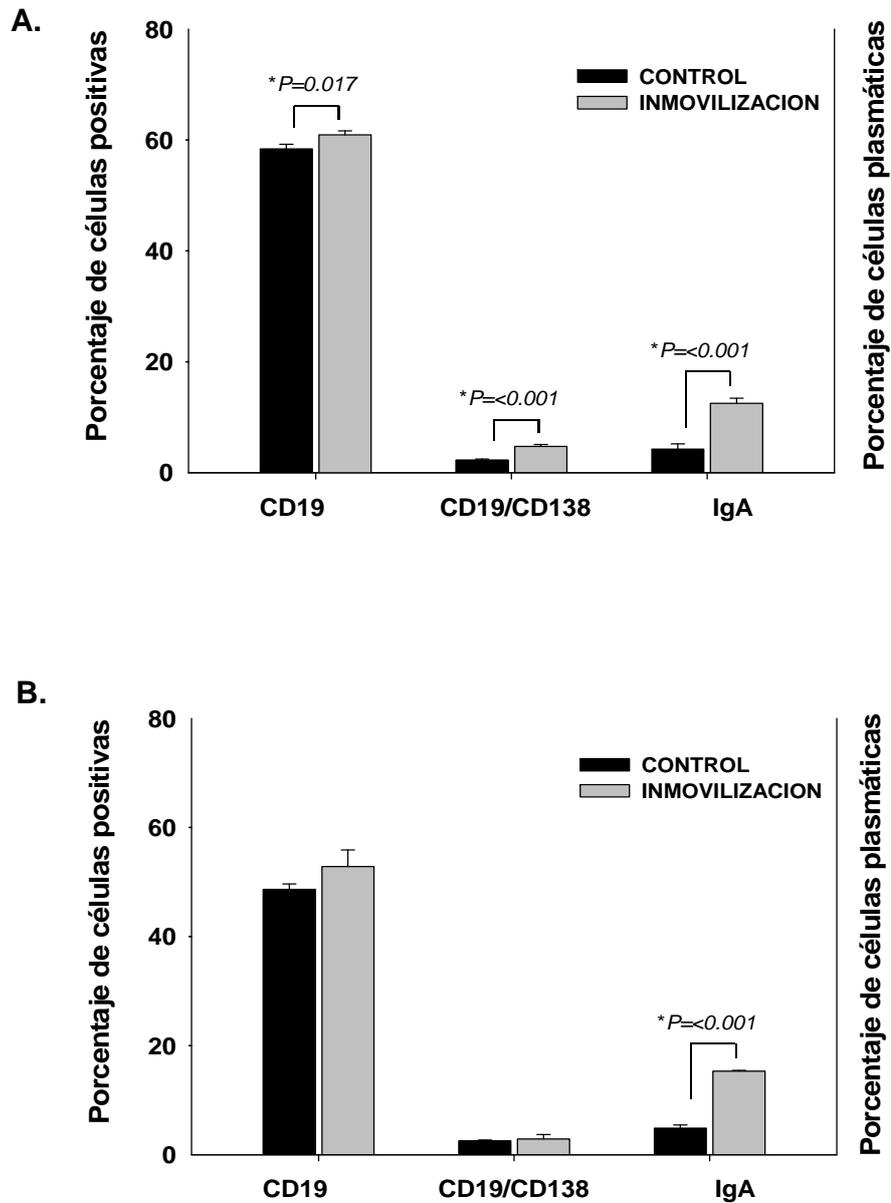


Figura 8. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células linfoides en lámina propia de duodeno (A) e íleon (B). Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes entre sí (n=6 ratones/grupo/experimento). Las poblaciones linfoides estudiadas fueron: linfocitos B, CD19; células plasmáticas, CD19/CD138; y células plasmáticas productoras de IgA, IgA.

7.5 Expresión de plgR en células epiteliales de la mucosa de intestino delgado

La expresión relativa de plgR en células de la mucosa intestinal de duodeno (Figura 9) e íleon (Figura 10), aumento significativamente en los ratones bajo condiciones de estrés ($P=0.009$ y $P=0.0237$, respectivamente) cuando se compararon con los ratones control.

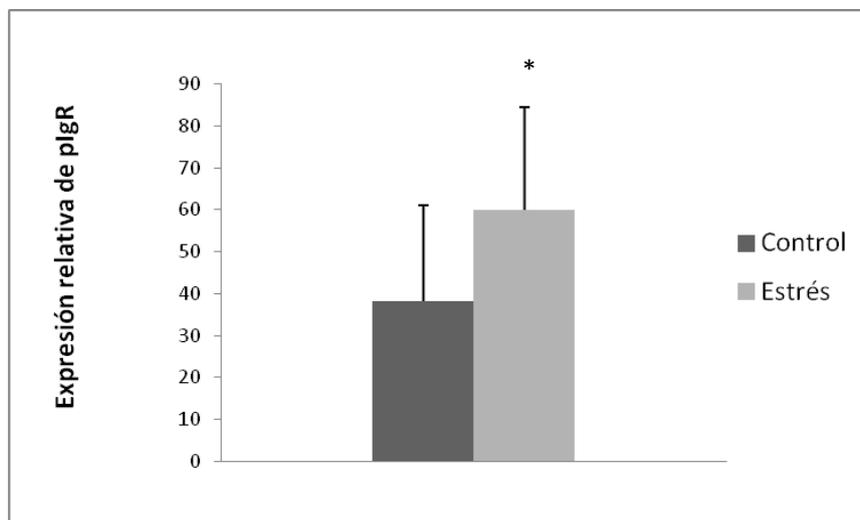


Figura 9. Expresión relativa de plgR en células epiteliales de la mucosa de duodeno de ratones Balb/C bajo condiciones de estrés. Los datos representan la media \pm D.E. de la densidad de la banda dividida de cada extracto proteico del liquido intestinal (N=20 ratones por grupo). Al analizar la expresión de plgR los resultados muestran que hay un aumento significativo de la expresión de plgR en duodeno de ratones Balb/C bajo estrés agudo en comparación con el grupo control (* $P=0.009$).

7.6. Expresión de pIgR en células intraepiteliales de mucosa de intestino delgado.

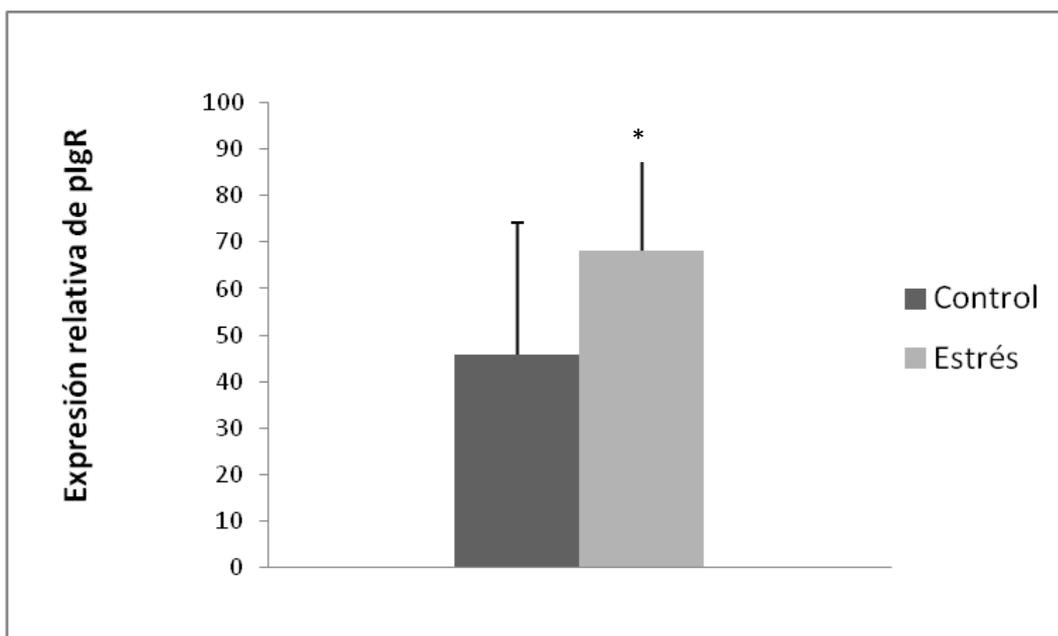


Figura 10. Expresión relativa de pIgR en células epiteliales de la mucosa del íleon de ratones Balb/c bajo condiciones de estrés. Los datos representan la media \pm D.E. de la densidad de la banda de cada extracto proteico del liquido intestinal (n=20 ratones por grupo). Al analizar la expresion de pIgR los resultados muestran que hay un aumento significativo de la expresión de pIgR en íleon de ratones Balb/C bajo estrés agudo en comparación con el grupo control (*P=0.0237)

7.7. Expresión relativa de IgA en células epiteliales de la mucosa del intestino delgado bajo condiciones de estrés.

En la figura 11 se puede observar que los ratones sometidos a estrés no presentaron cambios significativos en la expresión de IgA en células intraepiteliales de la mucosa intestinal de ambos segmentos intestinales (duodeno e íleon), en comparación con el grupo control

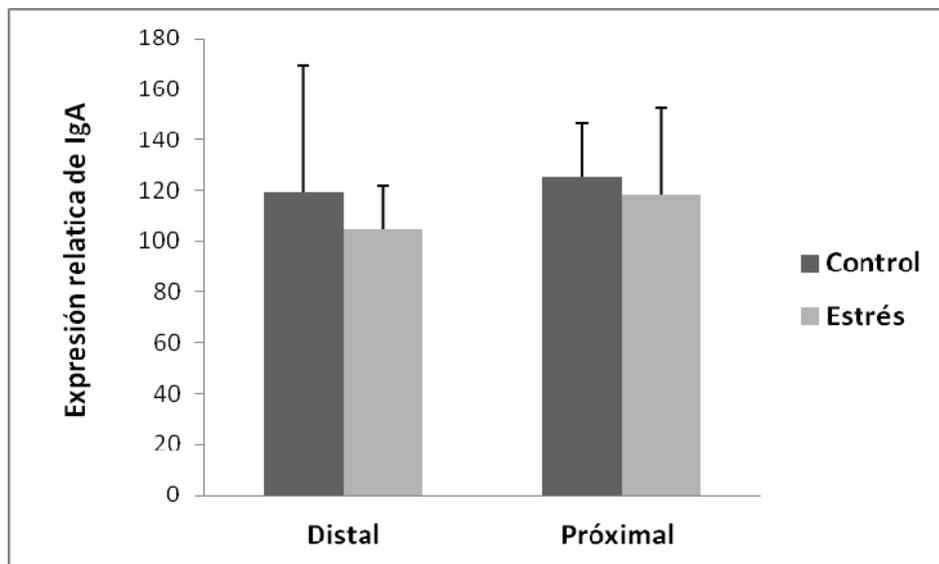


Figura 11. Expresión relativa de IgA en células epiteliales de la mucosa del intestino delgado de ratones Balb/c bajo condiciones de estrés. Los datos representan la media \pm D.E. de la densidad de la banda dividida entre 100,000 de cada extracto proteico del liquido intestinal (n=20 ratones por grupo). Los datos muestran que no hay cambios significativos en la expresión de la IgA en células intraepiteliales de la mucosa del duodeno y del íleon de ratones sometidos a estrés agudo ($P > 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

El estrés se considera como una perturbación de la homeostasis de un organismo constituyendo un problema de salud pública a nivel mundial ya que se ha asociado con un gran número de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes y la hipertensión arterial, enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal^{51,52} o artritis reumatoide, enfermedades infecciosas frecuentes, enfermedades alérgicas como el asma y el cáncer como las leucemias por citar algunas de las innumerables patologías; siendo afectado un gran porcentaje de la población por el estrés a nivel mundial.

Los estresores, externos o internos, pueden actuar de manera aguda o crónica aunque también se pueden generar internamente como parte de la función mental. Se sabe que dependiendo del tipo de estrés físico o psicológico se activan las neuronas del tallo cerebral o las de áreas del sistema límbico, las cuales interactúan sobre las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, para secretar la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que actúa sobre las neuronas llamadas *CRHérgicas hipofisiotrópicas* que tienen proyecciones axónicas hacia la eminencia media donde, en respuesta a un estímulo, liberan la hormona corticotropa a la circulación portal para llegar a la glándula pituitaria y estimular la síntesis y liberación de corticotropina (ACTH), que viaja por el torrente sanguíneo a la glándula suprarrenal, la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en el humano y corticoesterona en otros mamíferos)³⁴. Por otra parte se sabe que el estrés físico o mental aumenta rápidamente la producción de ACTH,

haciendo que la corticosterona se incremente hasta 20 veces su concentración normal³⁵.

Otros hallazgos importantes son el incremento en la secreción de S-IgA después de la administración de colecistocinina y pilocarpina,^{53,54} el incremento en la secreción de varios neuropéptidos, como son sustancia P, neurocinina A y péptido vasoactivo intestinal después de la estimulación eléctrica de nervios extrínsecos del intestino^{55,56}; y el incremento en la secreción de IgA en ileon después de la administración de somatostatina y su inhibición con la noradrenalina⁵⁷.

Numerosos estudios han demostrado que el estrés agudo tiene efectos inmunoestimulantes⁵⁸ a diferencia del estrés crónico que genera principalmente efectos inmunosupresores⁴⁷ siendo estas respuestas secundarias a la secreción de catecolaminas y glucocorticoides durante el estrés; aunque estas respuestas dependen también del tipo de estrés. Actualmente existen pocos trabajos que describan el efecto del estrés agudo sobre la inmunidad de la mucosa gastrointestinal. Los estudios publicados sobre el estrés agudo en este sitio del sistema inmune sólo reportan cambios en los niveles de IgA en saliva.⁴¹ Antecedentes de nuestro laboratorio han mostrado un aumento significativo en los niveles de IgA en diferentes segmentos del intestino delgado en ratones sometidos a estrés inducido por restricción de movimiento⁵⁹, por inmovilización y por nado⁴⁹. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual los niveles de IgA aumentaron en los ratones estresados. Una teoría es una estimulación de la

transcitosis de IgA en el epitelio intestinal generado por una mayor secreción de pIgR por las células epiteliales secundario a la unión de catecolaminas y glucocorticoides, secretados durante el estrés agudo, sobre los receptores de estas células y de las células del sistema inmunitario que a su vez secretan citocinas (IFN^{60,61}, TNF α ⁶², IL 4⁵¹) las cuales favorecen la secreción de pIgR en células epiteliales e IgA en células plasmáticas.

La importancia de este estudio fue analizar el efecto del estrés agudo inducido por inmovilización durante 4 h sobre la secreción y transporte de IgA en la mucosa de duodeno e íleon de ratones Balb/C.

Como control interno de calidad y para demostrar que la inmovilización durante 4 h induce estrés en los animales, determinamos la concentración de corticosterona sérica tanto en los ratones control como en los inmovilizados. Observando que los ratones inmovilizados presentaron una concentración significativamente más alta de corticosterona en comparación con el grupo control lo cual nos permite validar el modelo de estrés agudo (Figura 5).

Por otra parte también determinamos la concentración de IgA en líquido intestinal de duodeno e íleon de ratones Balb/C sometidos a estrés agudo inducido por inmovilización encontrando un aumento significativo en ambos segmentos intestinales en comparación con el grupo control (Figura 6) siendo estos resultados concordantes a estudios previos donde también determinaron el efecto del estrés agudo inducido por inmovilización sobre los niveles de IgA en mucosa intestinal⁵⁰

Los niveles de IgA en el lumen intestinal están condicionados por el transporte de esta inmunoglobulina a través del epitelio intestinal. El transporte se lleva a cabo a través de un mecanismo de transcitosis en el cual la IgA se une al receptor de inmunoglobulinas polimérico secretado a nivel de la membrana basolateral de la célula epitelial una vez unidos este complejo es endocitado para ser transportado hacia el lumen intestinal.

En este estudio determinamos la expresión del receptor para inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) para evaluar el efecto del estrés agudo sobre el transporte de IgA en el epitelio intestinal como un posible mecanismo de aumento en la concentración de IgA en el lumen de ambos segmentos del intestino delgado encontrando que el estrés indujo un aumento en la expresión de este receptor en células epiteliales de la mucosa de duodeno e íleon en comparación con el grupo control (Figuras 9 y 10).

Otro factor que determina los niveles de IgA en el lumen intestinal es la secreción de esta inmunoglobulina por las células plasmáticas localizadas tanto en los sitios inductores (placas de Peyer) como en los efectores (lámina propia). Para esto determinamos el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA en placas de Peyer y lámina propia de duodeno e íleon de ratones estresados y controles observando que el estrés aumentó significativamente el porcentaje de estas células tanto en los sitios inductores como en los efectores de ambos segmentos intestinales (Figuras 7A,7B, 8A, 8B).

Estos resultados demuestran que el principal mecanismo por el cual el estrés agudo inducido por inmovilización durante 4 h aumenta la concentración de IgA en el lumen intestinal se debe a un aumento en el transporte de IgA en el epitelio y a un aumento en la secreción de esta inmunoglobulina en las células plasmáticas de los sitios inductores y efectores de la mucosa tanto de duodeno como de íleon. Aunque el efecto fue más importante a nivel de segmento distal del intestino delgado. Consideramos también que el aumento en la permeabilidad intestinal secundario a vasodilatación inducida por las catecolaminas secretadas durante el periodo de estrés no es un mecanismo que explique el aumento de la concentración de IgA en el lumen intestinal en este modelo debido a que los ratones estresados presentaron en algunos casos necrosis de la mucosa intestinal secundaria a una vasoconstricción severa de este tejido (datos no demostrados). Sin embargo hacen falta estudios donde se evalúe el efecto del estrés agudo sobre la permeabilidad intestinal y donde se determine el efecto individual de cada una de las hormonas liberadas durante el estrés sobre la activación, diferenciación y función de las células del sistema inmune que participan en la producción de esta inmunoglobulina.

IX. . CONCLUSIONES

La inmovilización de las extremidades y la cola durante 4 h es un buen modelo para inducir estrés agudo en los ratones lo cual quedó demostrado por el aumento de corticosterona en suero en los animales inmovilizados versus los ratones control.

El estrés agudo inducido por inmovilización aumentó significativamente los niveles de IgA intraluminal en duodeno e íleon. También se observó un aumento significativo en la expresión de pIgR e IgA en células epiteliales y un aumento en el porcentaje de células productoras de IgA (CP-IgA) en placas de Peyer y lámina propia de la mucosa intestinal.

Lo anterior sugiere que el aumento en los niveles de IgA intestinal secundario al estrés agudo se debe probablemente a la estimulación de los sitios inductores y efectores de la mucosa intestinal para aumentar la síntesis de IgA y al aumento en la transitisión de esta inmunoglobulina a nivel de epitelio intestinal (mediado por el pIgR) lo que favorece la secreción de IgA en el lumen de ambos segmentos intestinales y en conjunto todos estos mecanismos permiten explicar por qué los niveles de IgA aumentan durante el estrés.

Otros estudios son necesarios para conocer si las modificaciones de la permeabilidad intestinal secundaria a la liberación de catecolaminas durante el estrés, contribuyen en el aumento de los niveles de IgA intraluminal y para saber el papel de cada una de las hormonas del estrés sobre la síntesis, transporte y secreción de esta inmunoglobulina.

X. . PERSPECTIVAS

1. Analizar el efecto directo sobre los glucocorticoides en células epiteliales y determinar su importancia o relación con la secreción y transporte de IgA.
2. Analizar si existe un mecanismo directo sobre producción de citocinas específicas para el cambio de isotipo a IgA en células plasmáticas de sitios inductores y efectores ante el estímulo de estrés agudo por inmovilización.
3. Valorar la respuesta de permeabilidad intestinal con respecto al mecanismo de secreción de IgA a nivel intestinal relacionado con el péptido vasoactivo intestinal.

XI. REFERENCIAS

-
- ¹ Bradzaget P, Fastad I.N., Haraldsen G., Regional specialization in the mucosal immune: primed cells do not always home along the same track. *Immunology Today* 1999;20: 267-277
- ² Julia I. M. et al. *Alergia. Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos. Medica panamericana*. 1ª ed. 2008:60-63.
- ³ Mowat A. M. Anatomical basics of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev Immunol.* 2003; 331-341
- ⁴ Biewenga J., van Rees E. P. and Sminia T. Induction and regulation of IgA responses in the microenvironment of the gut. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993; 67:1-7.
- ⁵ Tristram G Parslow et al. *Inmunología básica y clínica. Edit. Manual. Moderno*. 10ª ed; 231-238, Merck.
- ⁶ Salami L, Jalkanen S; Molecules controlling lymphocytes binding to the mucosal vascular addressin. MAdCAM-1. *Cell* 1993; 74: 185-195
- ⁷ Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology Edit. Panamericana*, 5ª ed. London, Mosby, .
- ⁸ Wershil B, Furuta G. Gastrointestinal mucosal. *Immunology. J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121:380-3
- ⁹ Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005; 206: 32-63
- ¹⁰ Kunisawa J, Kiyono H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defence. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1308-21
- ¹¹ Natvig IB, et al. Mechanism for enhanced external transfer of dimeric IgA over pentameric IgM: Studies of diffusion, binding to the human polymeric Ig receptor, and epithelial transcytosis. *J Immunol* 1997; 159: 4330-40.
- ¹² Corthesy B, Spertin F. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 1999 ; 380:1251-62
- ¹³ Salvi S, Holgate ST. Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production. *Cin Exp Allergy* 1999 ;29:1597-605.

-
- ¹⁴ Gavilanes PS y cols: Inmunoprotección por leche humana. *Rev Mex Pediatr.* 2002; 69; 111-119
- ¹⁵ Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 71-109.
- ¹⁶ Yoo EM, Morrison SL. IgA: An immune glycoprotein. *Clinical Immunology* 2005;116:3-1
- ¹⁷ Woof JM, Ken MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology* 2006;208:270-82
- ¹⁸ CS Kaetzel, et al. El receptor polimérico de la inmunoglobulina (componente secretor) media el transporte de complejos inmunes a través de las células epiteliales: una función local de la defensa para IgA. *Proc Acad nacional Sci los E.E.U.U.* 1991; 88: 8796-8800.
- ¹⁹ Royle L, et al. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem.* 2003; 278: 20140-53
- ²⁰ Lorton D, Lubahn C, Bellinger DL. Potential use of drugs that target neural-immune pathways in the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2:1-30.
- ²¹ Dantzer R, Wollman EE. Relationship between the brain and the immune system. *J Soc Biol* 2003; 197:81-8.
- ²² Webster JI, Stenberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Ann Rev Immunol* 2002; 20:125-63.
- ²³ Chelmicka-Schorr E, Amason BG. Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease. New York: Raven Press; 1988; 67-90.
- ²⁴ Dunn AJ. Nervous system- immune system interactions: An overview. *J Recept Rev* 1988; 8: 589-607
- ²⁵ Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science* 1984;224: 452-9
- ²⁶ Hucklebridge F, Clow A, Evans P. The relationship between salivary immunoglobulin A and cortisol: Neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. *Int J Psychophysiol* 1998;31:69-76

-
- ²⁷ Moynihan JA, et al. The Effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain Behav Immun* 1990; 4:1-2.
- ²⁸ Nagi E, Berczi I, Friesen HG. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol* 1983; 102:351-7.
- ²⁹ Basedovsky H, Sorkin E. Network of immune neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 1977; 27:1-12.
- ³⁰ Blalock JE, Harbour-Mc Menamin D, Smith EM. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic system. *J Immunol* 1985;135:858-61
- ³¹ Croiset G, et al. Modulation of the immune response by emotional stress. *Life Sci* 1987;40:775-82
- ³² Von HL. Role of persistent infection in the control and severity of asthma: Focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Respir* 2002;19:546-56
- ³³ Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. Tumor necrosis factor is an endogenous pyrogen and inducer production of interleukin-1. *J Exp Med* 1986;163:1433-50
- ³⁴ Breder CD, Dinarello CA, Saper CB. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* 1988; 240:321-4.
- ³⁵ Weiss JM, et al. Behavioral and neural influences on cellular immune responses: Effects of stress and interleukin-1. *J Clin Psychiatry* 1989;50:43-53
- ³⁶ Czerkinsky C., et al. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* 1989; 57:1072-1077
- ³⁷ Julio C. Klinder y cols. La psiconeuroinmunología en el proceso salud enfermedad. *Colombia médica*, 2005; 2: 120-129.
- ³⁸ Ehler U, Gaab J, Heinrichs M. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, *Biol, Psychol* 2001;57:141-152.
- ³⁹ Covelli V. What is the stress? How does it correlate with the immune system? *Neuroimmunomodulation. Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;741:212-215

-
- ⁴⁰ Selye H, *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress. A Treatise Based on the Concepts of the General Adaptation Syndrome and the Diseases of Adaptation*, Montreal, Acta Inc 1950;2-13
- ⁴¹ Schedlowski M. Tewes U. *Psychoneuroimmunology*. ISBN. 0-306-45976-0.
- ⁴² Levine S, Ursin H. *What is the stress? Neurobiology and Endocrinology of Stress*, New York, Marcel Dekker 1991;212-215
- ⁴³ . Newberry R. D. Lorenz R. G. organizing a mucosal defence. *Immunol Rev.* 2005; 206:6-21
- ⁴⁴ De Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?, *Trends Neuro.* 1999; 22:422-426.
- ⁴⁵ Teeuw, W., et al., Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: implications for oral health. *Biol Chem*, 2004. 385:1137-46.
- ⁴⁶ Pyne, D.B., et al., Mucosal immunity, respiratory illness, and competitive performance in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33:348-53
- ⁴⁷ Jarillo L. A. et al. *Psychoneuroendocrinology*. El Sevier. 2007; 32:681-692.
- ⁴⁸ M. en C. León Chavez Haydee Irais (2009). Efecto del estrés agudo por restricción de movimiento en la producción de IgA y en el número de linfocitos T y B del NALT de ratones Balb/C. (Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional)
- ⁴⁹ M. en C. Chávez Ramírez Ricardo (2009). Efecto del estrés agudo por nado en la producción de IgA y en las poblaciones de linfocitos T y B de la lámina propia y placa de Peyer del intestino delgado de ratones Balb/C. (Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional)
- ⁵⁰ M. en C. Ramírez Jiménez Karla (2009). Efecto del estrés agudo por inmovilización en la producción basal de IgA en intestino delgado de ratones Balb/C. (Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional)
- ⁵¹ Mayer, E.A., Psychological stress and colitis. *Gut*, 2000. 46:595-6
- ⁵² Mawdsley, J.E. and D.S. Rampton, Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 2005. 54:1481-91.

-
- ⁵³ Freier, S., M. Eran, and A. Abrahamov, Cholecystokinin-induced release of IgA antibodies in rat intestine. *Adv Exp Med Biol*, 1987; 216: 413-7.
- ⁵⁴ Freier, S., M. Eran, and J. Faber, Effect of cholecystokinin and of its antagonist, of atropine, and of food on the release of immunoglobulin A and immunoglobulin G specific antibodies in the rat intestine. *Gastroenterology*, 1987; 93:1242-6.
- ⁵⁵ Wilson, I.D., et al., Cholinergic stimulation of immunoglobulin A secretion in rat intestine. *Gastroenterology*, 1982; 83:881-8.
- ⁵⁶ Messell, T., et al., Extrinsic control of the release of galanin and VIP from intrinsic nerves of isolated, perfused, porcine ileum. *Regul Pept*, 1992; 38: 179-98.
- ⁵⁷ Schmidt, P.T., et al., Fast acting nervous regulation of immunoglobulin A secretion from isolated perfused porcine ileum. *Gut*, 1999; 45:679-85.
- ⁵⁸ M. en C. Gómez Anzurez Antonio (2009) Efecto del estrés agudo por nado en las poblaciones de linfocitos T y B en el Tejido Linfoide Asociado a la Nariz en ratones Balb/C. (Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional)
- ⁵⁹ M. en C. Martínez Becerril Elia Marcela (2009). Efecto del estrés agudo inducido por restricción de movimientos en órganos linfoides primarios y secundarios en ratones Balb/C. (Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional).
- ⁶⁰ Brandtzaeg, P., et al. Interferon-gamma enhances expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins. *J Immunol* 1987; 138:4303-4306
- ⁶¹ Phillips JO, et al. Synergistic effect of IL-4 and IFN-gamma on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 1990; 145:1740-1744.
- ⁶² Kvale D, et al. Tumor necrosis factor-alpha up-regulates expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric Ig. *The Journal of Immunology*, 1988; 140: 3086-3089.