



---

---

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Efecto de la adrenalectomía sobre la producción  
de plgR y secreción de IgA en el intestino  
delgado de ratones Balb/c sometidos a estrés”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

**M.C. Montserrat Salmonte Esquivel**

DIRECTORES DE TESIS:

DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ  
DRA. JUDITH DEL CARMEN PACHECO YÉPEZ



MÉXICO, D. F.

MARZO 2012.



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

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 15 del mes de Febrero del 2012 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 de la adrenalectomía sobre la producción de plgR y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/C sometidos a estrés”**

Presentada por la alumna:

<b>Salmonte</b> Apellido paterno	<b>Esquivel</b> Apellido materno	<b>Montserrat</b> Nombre(s)
-------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------

Con registro: 

A	1	0	0	6	9	4
---	---	---	---	---	---	---

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. Rafael Campos Rodríguez

Dra. Judith del Carmen Pacheco Yépez

Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna

Dra. Marycarmen Godínez Victoria

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I.P.N.  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN  
▲ CONTROL ESCOLAR ▲

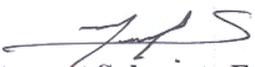


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 15 del mes febrero del año 2012, el que suscribe Salmonte Esquivel Montserrat alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100694 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Rafael Campos Rodríguez, Dra. Judith del Carmen Pacheco Yépez y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto de la adrenalectomía sobre la producción de pIgR y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/C sometidos a estrés”, 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 **myself\_27@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
**Montserrat Salmonte Esquivel**

Nombre y firma

## **RECONOCIMIENTOS**

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. Rafael Campos Rodríguez y la Dra. Judith Pacheco Yépez.

Durante la realización de esta tesis la alumna contó con el apoyo de la Beca-CONACyT (354292) durante el periodo de Enero del 2010-a Diciembre del 2011. Y con el apoyo de la Beca PIFI durante el periodo de Enero del 2010- a Diciembre del 2011.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI MAMÁ**

Gracias mamá por todo el apoyo que siempre me has dado, por siempre estar ahí para mí; por darme todas las herramientas para crecer, todo te lo debo a ti mamá.

### **A MI FAMILIA**

Toli, Caty, Liz; mis bellos hermanos, gracias por siempre creer en mi; por darme su apoyo incondicional; por amarme tanto, me siento muy afortunada por tener a grandes personas como ustedes a mi lado.

A todos mis sobrinos, gracias por darme tanta alegría, vida, aprendizaje; Siempre contarán con mi apoyo y amor para ayudarles a cumplir todos sus sueños.

A Dalila por ser un pilar de inspiración, amor y apoyo en mi vida.

A mi papá por su apoyo y amor.

### **A MIS AMIGOS**

Gracias por ser parte de mí y siempre estar conmigo en cada etapa de mi vida. Paul, Jean y Chela; lejos o cerca, siempre mis hermanas. Gracias a Grace, Robert y Sagrario, por darme tanto amor, perspectiva y apoyo a través del camino.

### **A MI DIRECTOR Y CODIRECTORA DE TESIS**

Gracias por todas sus enseñanzas y apoyo para la realización de este proyecto.

### **A MIS TUTORES**

Gracias Dra. Marycarmen por sus enseñanzas, confianza, apoyo e interés; Dr. Aldo por su apoyo, amabilidad y experiencia compartida; Dra. Jarillo por sus enseñanzas y consejos.

## CONTENIDO

Índice.....	ii
Índice de figuras .....	v
Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
Introducción.....	1
Planteamiento del problema.....	25
Justificación.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
Materiales y métodos.....	28
Resultados.....	38
Discusión.....	50
Conclusiones.....	56
Perspectivas.....	57
Referencias.....	58

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.	Estructura del sistema inmunológico.....	1
1.1	Tejido linfoide asociado a mucosas.....	2
1.2	Tejido linfoide asociado a intestino.....	2
2.	IgA intestinal y receptor de inmunoglobulina polimérica.....	8
2.1	Regulación de la expresión del plgR.....	12
3.	Estrés.....	12
3.1	Definición.....	12
3.2	Clasificación.....	14
4.	Respuesta anatómica y funcional del estrés y su relación con los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico.....	15
4.1	Efecto del estrés mediado por el sistema nervioso sobre el MALT.....	21
4.2	Efectos del estrés sobre la producción de plgR.....	21
5.	Antecedentes Generales.....	23
6.	Antecedentes Directos.....	23
<b>II.</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>25</b>
<b>III.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>V.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>27</b>
1.	Objetivo general.....	27
2.	Objetivos particulares.....	27
<b>VI.</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>

1. Población de estudio.....	28
2. Grupos de experimentación .....	28
3. Diseño experimental .....	29
4. Adrenalectomía bilateral.....	31
5. Protocolo de estrés.....	32
6. Sacrificio y obtención de material biológico.....	32
6.1 Líquido Intestinal.....	32
6.2 Obtención de células epiteliales.....	33
7. Cuantificación de corticosterona sérica por la técnica de EIA.....	34
8. Cuantificación de SIgA en líquido intestinal por la técnica de ELISA.....	34
9. Determinación de pIgR, $\beta$ -actina, IgA y cadena-J en células epiteliales y SIgA en líquido intestinal por la técnica de Western Blot.....	36
10. Análisis estadístico.....	37
<b>VII Resultados.....</b>	<b>38</b>
1. Concentración de corticosterona sérica.....	38
2. Concentración de SIgA en líquido intestinal.....	40
3. Expresión de SIgA en líquido intestinal.....	42
4. Expresión de IgA en células epiteliales.....	44
5. Expresión de cadena J de células epiteliales.....	46
6. Expresión de pIgR en células epiteliales.....	48
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>50</b>
<b>IX. Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>X. Perspectivas.....</b>	<b>57</b>
<b>XI. Referencias.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FÍGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Reconocimiento de antígenos en los sitios inductores y efectores del tejido linfoide asociado a mucosas.	7
<b>Figura 2</b> Estructura del pIgR.	9
<b>Figura 3</b> Transporte de IgA en el epitelio de las mucosas	11
<b>Figura 4</b> Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta al estrés	20
<b>Figura 5</b> Diseño experimental del proyecto de investigación.	30
<b>Figura 6</b> Concentración de corticosterona sérica	39
<b>Figura 7</b> Concentración de SIgA en el líquido intestinal.	41
<b>Figura 8</b> Expresión de SIgA en el líquido intestinal.	43
<b>Figura 9</b> Expresión de IgA en células epiteliales.	45
<b>Figura 10</b> Expresión de Cadena-J en células epiteliales.	47
<b>Figura 11</b> Expresión de pIgR en células epiteliales.	49

## ABREVIATURAS

**ACTH:** Adrenocorticotrofina

**ADX:** Adrenalectomizado

**ADX + E:** Adrenalectomizado sometido a estrés

**APC:** Células presentadoras de antígeno

**BALT:** Tejido linfoide asociado a bronquios

**CDR:** Regiones determinantes de complementariedad

**CRH:** Hormona liberadora de corticotrofina

**FSC:** Componente secretor libre

**GALT:** Tejido linfoide asociado a intestino

**HHA:** Eje hipotálamo hipófisis adrenal

**IEL:** Linfocitos intraepiteliales

**IFN:** Interferon

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IL:** Interleucina

**LALT:** Tejido linfoide asociado a laringe

**Linfocitos Th:** Linfocitos cooperadores

**LPL:** Linfocitos de la lámina propia

**MALT:** Tejido linfoide asociado a mucosas

**NALT:** Tejido linfoide asociado a nariz

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pIgR:** Receptor de inmunoglobulina polimérica

**SHAM:** Ratón sometido a cirugía sin adrenalectomía

**SHAM + E:** Ratón sometido a cirugía sin adrenalectomía estresado

**SIgA:** Inmunoglobulina A secretora

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNS:** Sistema nervioso simpático

**TALT:** Tejido linfóide asociado a trompa de eustaquio

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**WB:** Western Blot

## RESUMEN

Actualmente se sabe el estrés causa importantes modificaciones sobre el sistema inmunológico a través de los glucocorticoides y catecolaminas. Uno de los efectos es el aumento en los niveles de SIgA en la mucosa intestinal mediado por el aumento en la síntesis, transporte y secreción de esta inmunoglobulina. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la adrenalectomía sobre la producción de pIgR y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/c sometidos a estrés agudo por inmovilización 1 h. Se consideraron 5 grupos de estudio: 1) Control; 2) SHAM (Cirugía sin adrenalectomía) 3) SHAM+E (con estrés); 4) Adrenalectomizado (ADX); y 5) Adrenalectomizado con estrés (ADX+E). En todos los grupos se determinaron por EIA los niveles de corticosterona sérica; por la técnica de ELISA la SIgA en líquido intestinal y por Western Blot la expresión de pIgR, IgA y cadena-J en células epiteliales. Los resultados mostraron en el grupo SHAM+E un aumento en los niveles de corticosterona en suero; SIgA en líquido intestinal; IgA, cadena J y pIgR en células epiteliales; En los ratones ADX los niveles de corticosterona fueron cercanos a cero; La expresión de pIgR no mostró diferencia con el control, corroborando que su producción esta directamente relacionada con la estimulación hormonal. Los cambios estructurales y funcionales del epitelio del intestino en los ratones ADX sin estrés, favorecieron el transporte de IgA y cadena J en células epiteliales; En condiciones de estrés el epitelio sufre todavía más cambios, explicando porque en el grupo ADX+E la IgA en células epiteliales no muestra cambios con respecto a los grupos control.

## ABSTRACT

It is known that stress causes significant changes on the immune system through the production of glucocorticoids and catecholamines. One effect is the increase in the levels of SIgA in the intestinal mucosa mediated by increased synthesis, transport and secretion of the immunoglobulin. The objective of this study was to determine the effect of adrenalectomy on production and secretion of IgA pIgR in the small intestine of Balb/c under acute stress by immobilization 1 h. We considered 5 study groups: 1) control, 2) SHAM (surgery without adrenalectomy) 3) SHAM + E (with stress), 4) Adrenalectomized (ADX), and 5) Stressed Adrenalectomized (ADX+E). In all groups were determined the serum corticosterone levels by EIA, SIgA in intestinal fluid by ELISA and pIgR, IgA and J chain in epithelial cells by Western Blot. The results showed in group SHAM + E an increase in serum corticosterone levels, SIgA in intestinal fluid, IgA, J-chain and pIgR in epithelial cells; The corticosterone ADX levels were near zero; pIgR showed no difference from the control and can be directly related their production to hormonal stimulation. The changes in the morphology and physiology of intestinal epithelium in adrenalectomized mice without stress, favored the increase in the transport of IgA and J chain in epithelial cells, in stress conditions adrenalectomy undergoes further changes in the intestine, explaining why ADX+E group shows no change in the expression of IgA in epithelial cells compared to control groups.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. ESTRUCTURA DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

La principal función del sistema inmunológico es distinguir entre las moléculas propias, aceptarlas; y reconocer las no propias, procesarlas y eliminarlas. El sistema inmunológico se divide para su estudio en dos sectores importantes: el sistema inmunológico sistémico, compuesto por médula ósea, bazo y nódulos linfoides; y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), integrado por el tejido linfoide asociado a nariz (NALT) y trompa de Eustaquio (TALT), tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), tejido linfoide asociado a laringe (LALT), tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y el tejido linfoide asociado al tracto genitourinario.<sup>10</sup>

El MALT representa el área más grande del cuerpo, 900 m<sup>2</sup> de superficie corporal y ha desarrollado mecanismos que discriminan entre antígenos inofensivos como la comida, microorganismos comensales y los patógenos peligrosos.

Su función es proporcionar defensa al individuo en las superficies mucosas así como evitar la entrada de antígenos de la mucosa a la circulación sistémica. Existe además una serie de agentes y mecanismos no inmunológicos que participan en la protección junto con el MALT como son la flora bacteriana residente, que inhiben el crecimiento de patógenos potenciales; la actividad motriz de la mucosa, peristalsis y su función ciliar, que disminuye la interacción de

patógenos potenciales con células epiteliales; sustancias como ácido gástrico y sales biliares intestinales que crean en las mucosas un ambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos; secreciones mucosas que forman una barrera en las superficies epiteliales y factores humorales innatos como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima que tienen efectos inhibidores específicos sobre los microorganismos. <sup>1,2,3,</sup>

### **1.1. Tejido linfoide asociado a mucosas**

El MALT funcionalmente se divide en sitios inductores y sitios efectores. Los sitios inductores son tejido linfoide secundario en donde los antígenos son captados desde la superficie de la mucosa (GALT, BALT y NALT) y estimulan a los linfocitos T y B “naive”. Después de la activación los linfocitos T y B migran de los sitios inductores a los sitios efectores. Los sitios efectores están presentes en todo el tejido de las mucosas de manera diseminada y difusa en la lámina propia. Las células de éste sitio son linfocitos T, gran cantidad de células plasmáticas IgA, pocas IgG e IgM; y pocos linfocitos B, dendríticas y macrófagos. <sup>4</sup>

### **1.2 Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)**

Las interacciones inmunológicas en este nivel se llevan a cabo inicialmente en el sitio inductor de la respuesta inmunitaria intestinal constituido por placas de Peyer, folículos linfoides aislados y ganglios linfáticos mesentéricos; Secundariamente se crea el sitio efector de la respuesta inmunitaria integrado por

poblaciones de linfocitos intraepiteliales (IEL) y los linfocitos de la lámina propia (LPL).<sup>5</sup>

Las placas de Peyer están formadas por agregados linfoides situados en la cara anti-mesentérica de la mucosa intestinal, en el humano existen en mayor número en el área del íleon. Difieren del resto del tejido linfoide secundario en que no poseen vasos linfáticos aferentes en su estructura. En ésta estructura, las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos lumbales, carecen de recubrimiento de glicocálix y en su superficie luminal presentan pliegues cortos, irregulares y desorganizados. 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.<sup>6,7</sup>

Los folículos linfoides aislados, son estructuras de tejido linfoide que se encuentran en mayor cantidad en intestino delgado y en menor en el colon; son estructuras que contienen predominantemente linfocitos B en un 70% y linfocitos T en un 30%, que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo en estructuras que contienen un centro germinal.<sup>8</sup>

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 interdigitantes y foliculares. Por el contrario, la paracorteza se caracteriza por una elevada proporción de

linfocitos T. La médula, región más interna del ganglio, está integrada por linfocitos B, linfocitos T y células plasmáticas.

En la corteza, las células dendríticas residentes internalizan y procesan los antígenos que llegan a través de la linfa. Las células dendríticas maduras migran hacia la paracorteza donde presentan el antígeno a los linfocitos Th o T citotóxicos (Tc) vírgenes y de esta forma se originan células T especializadas y se inicia la respuesta inmunitaria adaptativa.<sup>9</sup>

Mientras que los linfocitos efectores abandonan los ganglios linfáticos y migran hacia los tejidos no linfoides; algunos permanecen en el ganglio linfático como células de memoria o migran hacia los centros germinales de los folículos para promover el proceso final de diferenciación de los linfocitos B.

Los IEL residen en los espacios intraepiteliales del intestino, bajo las uniones estrechas y por encima de la membrana basal. Aunque los IEL integran una población muy heterogénea, la mayor parte presenta un fenotipo supresor o citotóxico atípico y específico del compartimento de las mucosas, características que constituyen un fenotipo activado de células efectoras / y de memoria con capacidad inmunorreguladora, y que proporcionan una respuesta inmediata y muy efectiva sobre células epiteliales infectadas.<sup>10</sup>

Por otra parte, la lámina propia, comprendida entre el epitelio y la muscularis de la mucosa, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T y otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Estas poblaciones se encuentran en estado continuo de migración,

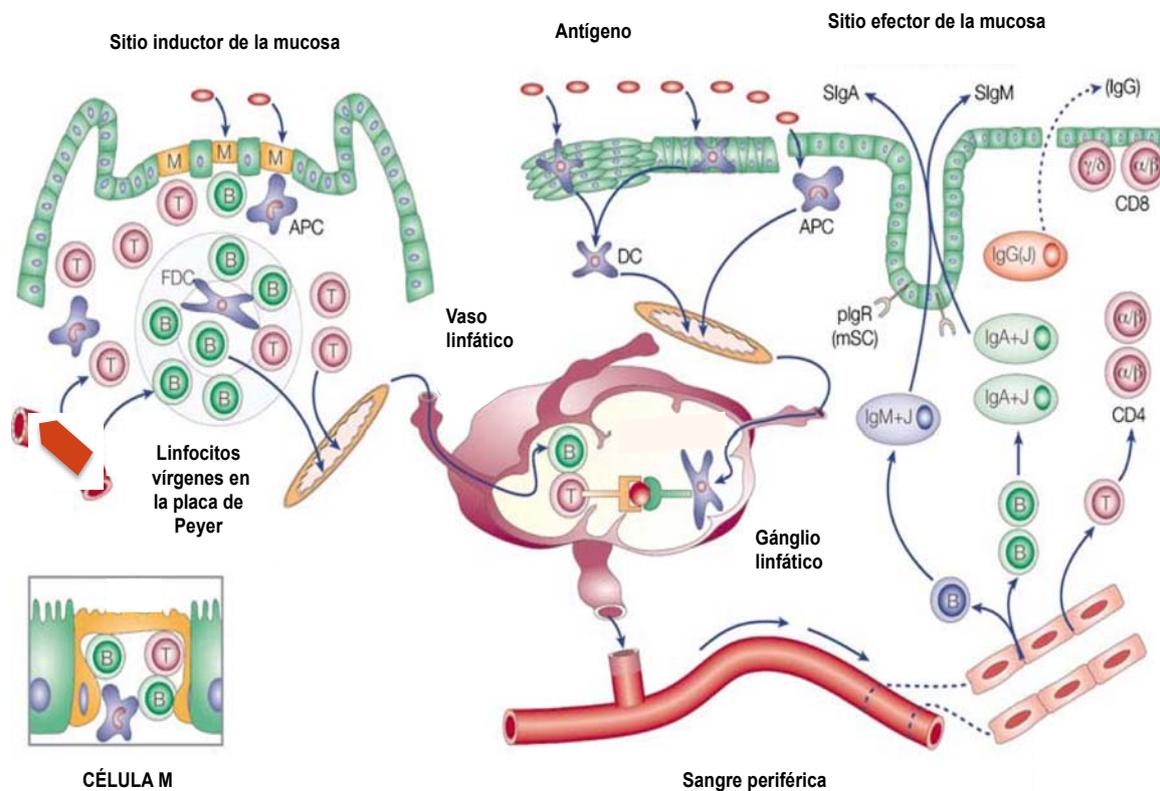
diferenciación y renovación. Las dos poblaciones efectoras a nivel de mucosas, IEL y LPL, se hallan bajo la influencia de bacterias comensales presentes en el intestino, las cuales contribuyen al desarrollo de su función inmunitaria. La flora bacteriana intestinal promueve la expansión y adquisición de la actividad citotóxica de los linfocitos del epitelio intestinal y desarrolla un papel importante en la inducción y mantenimiento de la tolerancia oral frente a antígenos presentes en la dieta, mediante la potenciación de la producción de IgA por parte de los LPL.<sup>11</sup>

Los microorganismos comensales interactúan también con células presentadoras de antígeno (APC) del epitelio y lámina propia, promoviendo una interacción diferente en los linfocitos Th, induciendo así, la activación de células reguladoras y con ello se desarrolla la tolerancia ante estos microorganismos.<sup>12</sup>

En la captación de antígenos luminales. Los antígenos pueden penetrar en la mucosa intestinal y alcanzar el GALT a través de distintas vías. La entrada a través de células M presentes en las Placas de Peyer constituye la vía más conocida. La membrana apical de las células M está diseñada para favorecer la adhesión y captación de antígenos luminales como macromoléculas, partículas adhesivas, virus y bacterias. Las células M también pueden captar ciertas proteínas alimentarias e IgA. Una vez efectuada la captación se inicia el proceso de transcitosis: las células M internalizan los antígenos luminales mediante mecanismos de endocitosis o fagocitosis y los transporta a través de sus vesículas hacia la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular.<sup>10</sup> Una vez ocurrida la transcitosis, la membrana basolateral de las células M presenta una profunda invaginación o bolsillo intraepitelial, que alberga linfocitos,

macrófagos y células dendríticas encargadas de procesar los antígenos para la posterior presentación antigénica. Éstas células captan el material transportado liberado desde las células M y lo procesan para presentarlo a los linfocitos T “naive” de la placa de Peyer o pueden migrar por el vaso linfático eferente hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, donde también encuentran linfocitos T “naive”. Activados los linfocitos B y T, migran del MALT y ganglios linfáticos a la sangre periférica para la subsecuente extravasación a los sitios efectores de la mucosa: el epitelio y la lámina propia. Figura 1<sup>9,14</sup>

Los enterocitos constituyen una segunda posible vía de entrada de antígenos. Presentan menor accesibilidad que las células M debido a su recubrimiento externo de glicocálix rico en enzimas hidrolíticas, hecho que impide la entrada de agregados macromoleculares y microorganismos. Los enterocitos no sólo son capaces de captar los antígenos solubles que llegan a la superficie celular, sino también de procesarlos y presentarlos a los linfocitos T. La captación de antígenos lumbinales también puede producirse mediante un mecanismo paracelular a través de los espacios entre enterocitos, donde células dendríticas de la lámina propia proyectan sus dendritas a la luz intestinal; después de captar los antígenos, los transportan a través de los vasos linfáticos que drenan la pared intestinal hacia las áreas de linfocitos T “naive” de ganglios linfáticos mesentéricos para que una vez activados migren a los sitios efectores.<sup>15</sup>



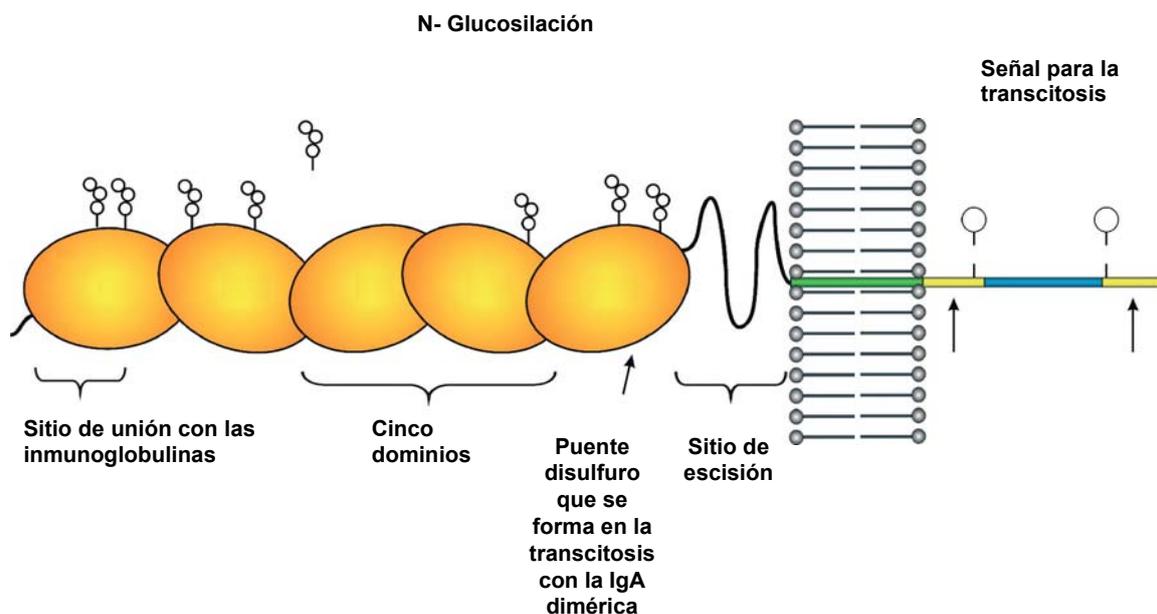
**Figura 1. Reconocimiento de antígenos en los sitios inductores y efectores del tejido linfoide asociado a mucosas.** El antígeno entra por la células M del intestino dónde las células presentadoras de antígeno lo captan y procesan para después llevarlo al nodo linfático más cercano y presentarlo a un linfocito T, el cual estimula al linfocito B naíve a diferenciarse en una célula plasmática, la cual viaja por el torrente sanguíneo y llega a la mucosa intestinal en donde produce anticuerpos específicos. Modificado de Brandtzaeg, et al. 2008.<sup>9</sup>

## **2. IgA INTESTINAL y RECEPTOR DE INMUNOGLOBULINA POLIMÉRICA (pIgR)**

La inmunoglobulina A (IgA) es una glucoproteína bifuncional que tiene un peso molecular (PM) aproximado de 160-165 KDa y representa la clase de anticuerpo más abundante presente en la mucosa intestinal (80-90 %) y en el resto del MALT. Se producen cada día casi 5 g de IgA en las mucosas de los seres humanos. En los humanos existen dos formas isotípicas de IgA; IgA1 e IgA2, difiere generalmente entre los dos compartimientos principales en los cuales se encuentra: la sangre y las secreciones mucosas. En el tejido de las mucosas la IgA se produce de modo exclusivo como un polímero, predominantemente como dímero enlazado por una cadena J.<sup>16</sup> Las células B indiferenciadas precursoras de las células plasmáticas secretoras de IgA se activan en placas de Peyer y en los ganglios linfáticos mesentéricos; las células plasmáticas que secretan IgA<sup>2</sup> migran a la lámina propia del intestino; una vez ahí sintetizan y secretan polímeros de IgA, unidos covalentemente a través de sus regiones constantes y asociadas con una molécula de unión denominada cadena J; hacia el espacio subendotelial.<sup>17,18</sup>

Para alcanzar los antígenos blancos en la luz del intestino, la IgA se tiene que transportar a través del epitelio. Esto es efectuado por células epiteliales inmaduras localizadas en la base de las criptas intestinales, que expresan el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) sobre sus superficies basolaterales; Este receptor es una proteína tipo I integral de membrana con un PM de 80 KDa que se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso de las células epiteliales de las

mucosas. Está constituido por una región extracelular que une a la IgA polimérica. Ésta región contiene 5 dominios con homología a los dominios variables de las inmunoglobulinas; en el dominio 1 se encuentran 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR), que forman un enlace no covalente para la unión de la IgA dimérica. Durante la transcitosis se forma un puente disulfuro entre el dominio 5 del pIgR y la región Fc $\alpha$  de la IgA dimérica. El dominio 5 se conecta a la región transmembranal de 23 a.a. y citoplasmática de 103 a.a. por un péptido que contiene el sitio de escisión del pIgR. Figura 2<sup>21,22</sup>

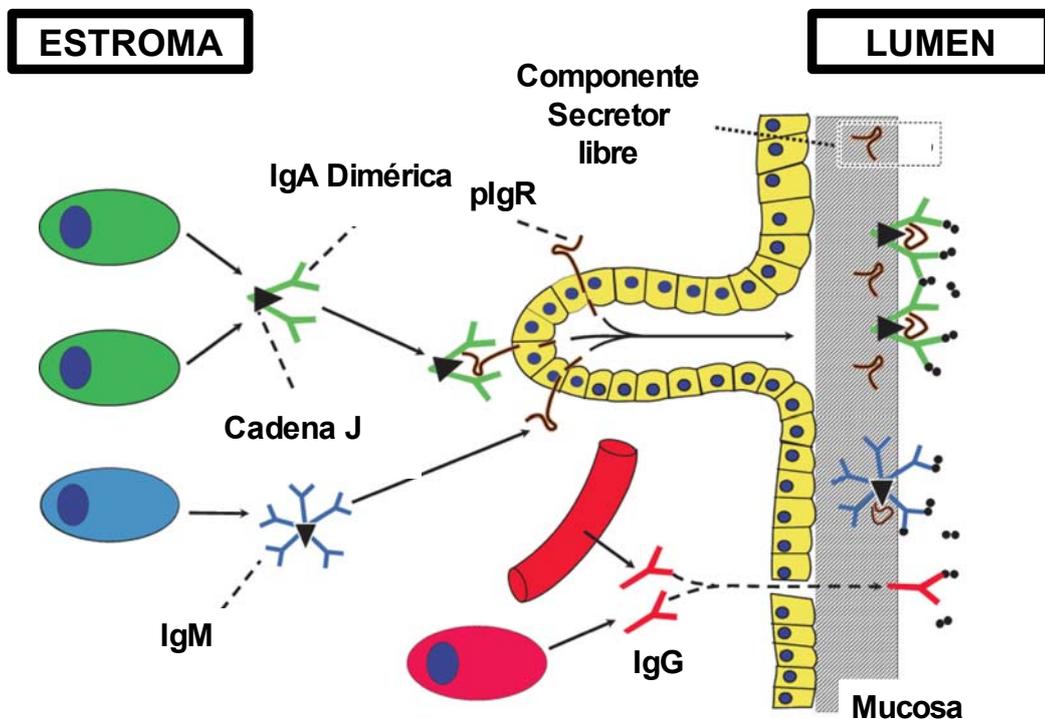


**Figura 2. Estructura del pIgR.** El receptor de inmunoglobulina polimérica posee en su estructura una región extracelular de 5 dominios con homología a los dominios variables de la IgA polimérica, sitio donde se realiza su unión; la región intracelular recibe la señal para la transcitosis a la luz intestinal. Modificado de Kaetzel, 2005.<sup>67</sup>

La parte del dominio extracelular del pIgR tiene alta afinidad por inmunoglobulinas poliméricas y se enlaza a ellas por medio de la cadena-J; que es un polipéptido que contiene entre otros componentes carbohidratos, manosa, galactosa, N-Acetil-Glucosamina, N-Acetil-Galactosamina y ácido siálico, tiene un PM de 15 KDa, es muy hidrofílica y adopta una forma helicoidal. La cadena J es sintetizada por las mismas células plasmáticas que producen IgA e IgM polimérica. El complejo IgA-pIgR es internalizado y transportado mediante transcitosis hacia la superficie luminal del epitelio, donde es liberado por división proteolítica del dominio extracelular. Parte del receptor dividido permanece con la IgA y se conoce como componente secretor (SC) confiriendo resistencia frente a proteasas presentes en el lumen intestinal. El anticuerpo resultante se denomina IgA secretora.<sup>19,20</sup>

Existe una relación 1:1 entre el componente secretor y la IgA en SIgA, una molécula de pIgR debe ser producida por las células epiteliales por cada molécula de IgA que es transportada. La producción de IgA mucosal está regulada por el perfil de citocinas presente. Así, la IL-5, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$  facilitan la fase final de diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas secretoras de IgA. En el lumen, la SIgA se adhiere a la capa de moco que cubre el epitelio donde puede neutralizar a los patógenos, a sus toxinas, inhibir sus funciones y/o formar inmunocomplejos que evitan la penetración de microorganismos intraluminales y antígenos de la dieta. Otra función puede presentarse cuando el antígeno interiorizado por la célula epitelial puede reunirse con la IgA y ser neutralizado. Y finalmente cuando toxinas o patógenos que han llegado a la lámina propia

encuentran a la IgA dimérica específica para patógenos, formándose inmunocomplejos resultantes que se eliminan hacia la luz a través de la célula epitelial. Figura 3<sup>23</sup>



**Figura 3. Transporte de IgA en el epitelio de las mucosas.** En la lámina propia, las células plasmáticas producen la cadena J y la IgA. La cadena J se une a las IgA formando la IgA dimérica (IgA-J). Se transporta a través del epitelio con la ayuda del receptor de inmunoglobulina polimérico (plgR), dando como resultado la liberación de IgA secretora (SIgA) al lumen intestinal. Modificado de Brandtzaeg, 2009.<sup>18</sup>

## **2.1 Regulación de la expresión del pIgR**

El pIgR se expresa exclusivamente en células epiteliales de la piel, pulmones, intestino y aparato reproductor; con la expresión más alta en el intestino delgado y grueso; por lo tanto, su promotor específico son las células epiteliales. El nivel de expresión de pIgR es regulado por una amplia variedad de factores dependiendo del tipo celular. Estos factores incluyen citocinas, hormonas, vitamina A, productos metabólicos y alimenticios; así como cambios en el estado fisiológico del organismo, incluyendo crecimiento bacteriano excesivo, malnutrición y enfermedades inflamatorias de las mucosas, tales como enfermedad celíaca, gastritis por *Helicobacter pylori* y síndrome de Sjögren, pueden alterar la expresión de esta proteína integral de membrana: pIgR.<sup>24</sup>

## **3. ESTRÉS**

### **3.1 Definición**

Es el conjunto de procesos y respuestas neuroendocrinas, inmunológicas, emocionales y conductuales ante situaciones que significan una demanda de adaptación mayor de lo habitual para el organismo, y/o son percibidas por el individuo como amenaza o peligro, ya sea para su integridad biológica o psicológica. La amenaza puede ser objetiva o subjetiva; aguda o crónica. En el caso de estrés psicológico lo crucial es el componente cognoscitivo de la

apreciación que el sujeto hace de la situación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) postula que el estrés “es el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara el organismo para la acción” <sup>29</sup>. El primer concepto de estrés fue formulado por Walter Cannon en 1929, cuando lo definió como una reacción de lucha o huida ante situaciones amenazantes, postulando que su biología dependía de la estimulación del sistema simpático-adrenal. <sup>25</sup>

Posteriormente Hans Selye en 1974, introdujo el término de estrés al campo de las ciencias biológicas para definir estrés biológico a “la respuesta no específica del organismo a cualquier demanda de cambio”; cuya finalidad era promover la adaptación del organismo a su medio cambiante. <sup>26</sup> Este mismo autor definió el síndrome general de adaptación (respuesta al estrés) como la respuesta del organismo a algo perdido, un desequilibrio al que se debe hacer frente y consiste en tres etapas:

a) 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 glándulas suprarrenales (que secretan glucocorticoides y adrenalina, respectivamente) para movilizar los recursos energéticos necesarios que harán frente a la situación.

b) Fase de resistencia o adaptación: en ésta etapa el organismo hace frente al estresor; para ello utiliza los recursos energéticos y al mismo tiempo, los sistemas y órganos innecesarios para sobrevivir a la emergencia.

c) Fase de desgaste: es la última etapa del síndrome; se caracteriza por imposibilidad del organismo para hacer frente al agente estresor debido al enorme requerimiento y desgaste energético. Al organismo le fue imposible llegar a la alostasis.<sup>27</sup>

Alostasis es la habilidad de conseguir a través del cambio, una estabilidad y por medio de ella lograr que el sistema nervioso autónomo (SNA), el eje hipotálamo- hipófisis- adrenal, el sistema cardiovascular, inmunológico y el metabolismo protejan al organismo de los cambios internos y externos producidos por el estrés.<sup>28</sup>

### **3.2 Clasificación**

El estrés se puede clasificar por su su etiología en:

- a) Físico: trauma, cirugía, quemaduras e infecciones.
- b) Psicológico o emocional: problemas interpersonales, disgustos, depresión.
- c) Metabólico: deshidratación, hemorragias, cetoacidosis, hipoglicemia.
- d) Farmacológico: cocaína, anfetaminas, hipoglicemia.

O por su duración y frecuencia en:

- a) Estrés agudo: es la aplicación de un estímulo estresor que dura de minutos a horas (su duración no es prolongada en el tiempo) y se presenta en una sola ocasión.

b) Estrés crónico: estímulos repetitivos, la acción de respuesta y el estímulo estresor se prolongan en el tiempo y la sensación de amenaza es constante.

#### **4. RESPUESTA ANATÓMICA Y FUNCIONAL DEL ESTRÉS Y SU RELACIÓN CON LOS SISTEMAS NERVIOSO, ENDÓCRINO E INMUNOLÓGICO**

El eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HHA) es el principal efector de la respuesta de estrés; ante un estresor el componente nervioso empieza activando las neuronas del tallo cerebral o las áreas del sistema límbico (respectivamente), estimulando a las neuronas de la región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo que poseen axones que se proyectan a la capa externa de la eminencia media donde secretan la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y arginina-vasopresina, llevadas a través de los capilares del sistema circulatorio portahipofisiario al órgano blanco, las células corticotróficas de la adenohipófisis; éstas células liberan a su vez, adrenocorticotrofina (ACTH), que pasa al torrente sanguíneo y alcanza su órgano blanco: las glándulas suprarrenales.<sup>29</sup>

Las glándulas suprarrenales son un órgano par situado en el retroperitoneo, en la cara anterosuperior de los riñones. Anatómica y funcionalmente se divide para su estudio en dos: corteza y médula. La corteza suprarrenal sintetiza dos clases de esteroides: en la zona externa (glomerular) sintetiza aldosterona y la zona interna (fasciculoreticular) los andrógenos y glucocorticoides. En los seres humanos, la hidrocortisona (cortisol) es el principal glucocorticoide, así como la

corticosterona lo es para el ratón; la aldosterona es el mineralocorticoide más importante.<sup>30</sup>

Los esteroides difunden pasivamente a través de la membrana celular y se unen a receptores intracelulares. Existen dos subtipos de esteroides suprarrenales: tipo I, a través del que se ejerce el efecto mineralocorticoide; y el receptor tipo II, a través del que se ejerce el efecto glucocorticoide. El cortisol se une tanto a los receptores tipo I como a los tipo II, mientras que la aldosterona únicamente se une a los tipo I. Las acciones de los corticosteroides son muchas, sus efectos incluyen: alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; conservación del equilibrio de líquidos y electrolitos, y preservación de la función normal de los sistemas cardiovascular, inmunitario, renal, músculo esquelético, así como los sistemas endocrino y nervioso. Además, por mecanismos metabólicos, los corticosteroides permiten al organismo resistir circunstancias que generan estrés, como estímulos nocivos y cambios ambientales. En ausencia de la corteza suprarrenal, la supervivencia sólo es posible al conservar un medio óptimo, alimentación adecuada y regular, ingestión de grandes cantidades de cloruro de sodio y conservación de una temperatura ambiental apropiada. Figura 4<sup>30,31</sup>

El sistema nervioso autónomo en su división simpática es otro efector de la respuesta al estrés, ante un estresor genera la activación de las neuronas preganglionares simpáticas, ubicadas en el asta intermediolateral de los segmentos torácico 1 a lumbar 2 de la médula espinal, y liberación concomitante de noradrenalina por las neuronas posganglionares simpáticas. Así mismo, la

activación simpática estimula a las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales, zona dónde se producen catecolaminas, 90% adrenalina y 10% noradrenalina, liberándose al torrente sanguíneo. La adrenalina aumenta la frecuencia cardíaca y respiratoria, y el flujo sanguíneo a los músculos lo que prepara al organismo a pelear o huir.<sup>31,32</sup>

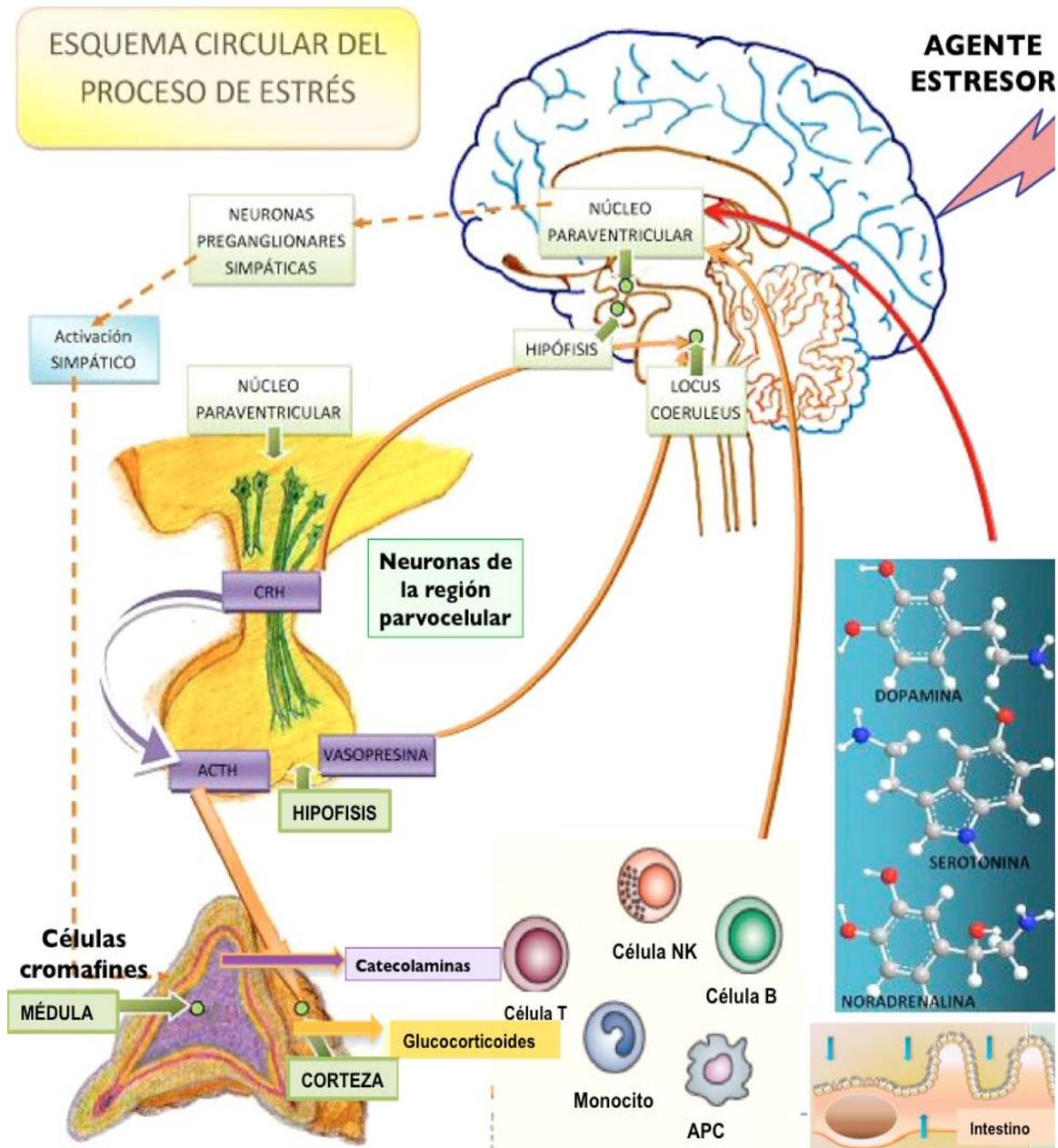
Ambos tipos hormonales, glucocorticoides y catecolaminas, liberados durante la exposición del estrés, ejercen funciones inmunomoduladores, con lo que contribuyen a regular el funcionamiento del sistema inmunológico. Seyle en 1936 describió por primera vez que posterior a la exposición al estrés durante periodos prolongados ocurría lo que denominó, la triada al estrés: hipertrofia suprarrenal, ulceración gástrica e hipotrofia de timo y ganglios linfáticos. Durante las fases de alarma y agotamiento del síndrome general de adaptación ocurre inhibición del sistema inmunológico como respuesta normal del organismo ante el estrés.<sup>33,34</sup> Los glucocorticoides y las neurohormonas por el intento de restablecer la homeostasis, inhiben el funcionamiento de los sistemas de mayor gasto energético como el digestivo, el crecimiento y el sistema inmunológico. Además ejercen influencia directa sobre el funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a sus receptores específicos, localizados en el citoplasma y membrana celular; así como ejercer efectos indirectos al alterar la producción de citocinas como el interferón  $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral y las interleucinas 1, 2 y 6; todas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias.<sup>35,36</sup> Los órganos linfoides primarios y secundarios, así como los linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos/macrófagos, poseen receptores de

esteroides suprarrenales tipo II a través del que se ejerce el efecto glucocorticoide; Al acoplarse con sus receptores citoplasmáticos en las células del sistema inmune, se traslocan al núcleo y funcionan como factores de transcripción para numerosas proteínas sintetizadas por linfocitos, macrófagos y otros tipos de células inmunitarias; algunas de éstas proteínas son citocinas y receptores de superficie de las células.<sup>37,38</sup> El sistema nervioso en su división simpática (SNS), inerva la red vascular y parénquima de los órganos linfoides primarios, como médula ósea y el timo; y a los secundarios como bazo, ganglios linfáticos y MALT.

Se ha comprobado que el SNS en el intestino tiene influencia en la regulación de ciertas actividades como la producción de mucina producida por las células de Goblet, la absorción de agua por las células intestinales epiteliales, permeabilidad de la mucosa y degranulación de los mastocitos. Los nervios simpáticos productores de noradrenalina tienen inervación en la vasculatura y parénquima de órganos linfoides, (incluyendo el intestino) y establecen contactos similares a sinapsis neurona- neurona con células inmunitarias. La inervación en éstos órganos influye en la función de las células inmunitarias; promoviendo la proliferación, diferenciación, movilización y producción de citocinas de los linfocitos, timocitos, células NK y granulocitos.<sup>39,40,50</sup> La comunicación entre el SNC y el inmunológico es bidireccional. Las citocinas producidas por las células del sistema inmunológico pueden ejercer su acción sobre células del SNC pues estas también poseen receptores específicos para las mismas. Además, las células del sistema inmunológico también son capaces de producir muchos de los mediadores producidos por el tejido nervioso. Por ejemplo, la interleucina 1 (IL-1)

provoca la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por el hipotálamo; induciendo así, la síntesis de más hormonas del estrés. Además, los mismos linfocitos pueden producir hormonas del estrés como ACTH, prolactina y la hormona de crecimiento.<sup>41,42</sup>

En presencia de un estímulo estresante, se elevan los niveles circulantes de las citocinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  además de IL-6, pero bajas cantidades de IL-4 e IL-10.<sup>43-45</sup> En general, las citocinas son glicoproteínas que se generan en diferentes células del organismo, incluido el tejido nervioso. El efecto de las citocinas es dosis-dependiente. Si la concentración está en el nivel de 1 nM, los efectos son locales y, si aumenta a 10 nM, los efectos son sistémicos y conductuales. Una de las fuentes principales de las citocinas son los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, conocidos como linfocitos cooperadores (Th). Estas células secretan diferentes citocinas y, dependiendo de su tipo, se clasifican en linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1) o tipo 2 (Th2). Las citocinas proinflamatorias se caracterizan por una respuesta tipo Th1, se encuentran la IL-1, 2, 12 el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ . Por su parte, la respuesta tipo Th2 se caracteriza por la secreción de citocinas antiinflamatorias como la IL-5 e IL-4. Las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias son antagónicas y, dependiendo del equilibrio que se establezca entre ellas, dependerá la eficiencia de la respuesta inmunológica que desarrolle cada individuo. Figura 4<sup>45-49</sup>



**Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta al estrés.** Se inicia en la corteza cerebral ante un agente estresor, estimula al núcleo paraventricular y a la hipófisis la cual secreta ACTH. Ésta última hormona viaja por el torrente sanguíneo hacia la corteza de las glándulas suprarrenales liberando glucocorticoides y catecolaminas (por estimulación de las neuronas simpáticas a la médula suprarrenal); interaccionan con los sistemas neuro-inmuno-endócrinos, en respuesta al estrés. Modificado de Sirera et al, 2006.<sup>87</sup>

#### **4.1 Efecto del estrés mediado por el sistema nervioso sobre el MALT**

Se ha comprobado que el SNS en el intestino tiene influencia en la regulación de ciertas actividades como la producción de mucina producida por las células de Goblet, la absorción de agua por las células intestinales epiteliales, permeabilidad de la mucosa y degranulación de los mastocitos. Los nervios simpáticos productores de noradrenalina tienen inervación en la vasculatura y parénquima de órganos linfoides, incluyendo el intestino y pueden influir en las funciones de proliferación, diferenciación, movilización y producción de citocinas, de las células inmunitarias.<sup>50</sup>

#### **4.2 Efectos del estrés sobre la producción de plgR**

En estudios de la regulación neuroendocrina con respecto al plgR se ha determinado su síntesis y secreción en sitios como glándulas lagrimales y salivales.<sup>78,79</sup> El sistema nervioso autónomo estimula la expresión de plgR en células epiteliales de glándulas salivales y lagrimales así como en líneas de células epiteliales del intestino delgado de rata y colón humano. El incremento en la expresión de plgR puede contribuir al rápido incremento (< 1 hora) de la secreción de IgA en la glándula salival y en el intestino, que ocurre durante la estimulación directa de los nervios simpáticos y parasimpáticos o con neurotransmisores autonómicos tales como acetilcolina y noradrenalina.<sup>60-62</sup>

La expresión de plgR también es regulada por hormonas esteroides sexuales y glucocorticoides y por hormonas polipeptídicas en tipos celulares y en

sitios específicos. Los estrógenos y la progesterona tienen efectos antagónicos en el endometrio humano y de rata; como consecuencia la expresión plgR varía durante el ciclo estrogénico.<sup>80,81</sup> Por otro lado, los andrógenos aumentan la expresión de plgR en tejido reproductor tanto de machos como de hembras e incrementan la expresión de plgR en glándula lagrimal de ratas macho. Los glucocorticoides incrementan la expresión in vivo del plgR en suero, saliva y bilis de rata. Poco se sabe sobre la regulación por glucocorticoides en la expresión de plgR en humanos, en mucosa intestinal y en situaciones como el estrés. Las hormonas hipofisarias prolactina y vasopresina, modifican la expresión del plgR, aumentado su expresión en la glándula mamaria, pero sus efectos no han sido bien estudiados en humanos u otros roedores, debido a la alta concentración de SC libre y SIgA en el calostro y leche. Finalmente la vasopresina y la restricción de ingesta de agua aumentan la expresión de plgR en células epiteliales del riñón.

En presencia de estrés los glucocorticoides y catecolaminas tienen efectos sobre la regulación de las citocinas.<sup>65</sup> Varias citocinas inmunoreguladoras y proinflamatorias que incluyen IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  aumentan la expresión de plgR en células epiteliales cultivadas. Este efecto depende de la síntesis de proteínas de novo y tiene lugar a nivel de la transcripción en el cual la IL-4 e IFN- $\gamma$  tienen el mayor efecto. El papel de estas citocinas en la expresión plgR in vivo es mucho menos conocido, pero las citocinas producidas por las células epiteliales, linfocitos intraepiteliales y de lámina propia pueden regular su expresión en condiciones normales o durante infección e inflamación.<sup>66-69</sup>

## **5. ANTECEDENTES GENERALES**

Los resultados de los efectos del estrés agudo sobre la producción de IgA en diferentes estudios han sido diversos; Ramal y cols, reportó una disminución en los niveles de IgA en suero inducido por un periodo excesivo de ansiedad<sup>88</sup>; Laidlaw y cols, no observaron cambios en el mismo tipo de estrés<sup>89</sup>. Sin embargo Rehenbinder y cols, demostraron que los niveles disminuyen en sangre y aumentan en heces fecales<sup>90</sup>.

El estudio de los efectos del estrés sobre la inmunidad de mucosas se ha basado principalmente en la determinación de la secreción de IgA en saliva.<sup>47,63,64,76,77</sup> Diversos estudios han analizado la relación entre los niveles de IgA secretora en saliva y diferentes circunstancias de estrés, tales como ejercicio, estados de humor, y exámenes académicos; sin embargo, los resultados han sido contradictorios. En unos se encuentra que el estrés psicológico y físico reduce los niveles de IgA presente en la saliva de individuos humanos, por el contrario, en otros se encontró que los niveles de IgA aumenta como consecuencia del estrés<sup>60,83,84,85</sup>. Lo anterior impide realizar una conclusión acerca del efecto del estrés sobre la respuesta inmune humoral de las mucosas, representada por la SIgA.

## **6. ANTECEDENTES DIRECTOS**

Las investigaciones de los efectos del estrés sobre el GALT se han enfocado principalmente a la mucosa oral siendo muy pocos los estudios

enfocados a la mucosa intestinal; se ha estudiado casi exclusivamente sobre las enfermedades inflamatorias del intestino; la información existente confirma que el estrés psicológico desempeña un papel fundamental en la fisiopatología y presentación clínica de la enfermedad inflamatoria del intestino.<sup>51,52,53,91,92</sup> Estudios en animales confirman que el estrés contribuye a la patogénesis de esa enfermedad<sup>54</sup>.

Los estudios que se relacionan más con éste trabajo son los de Jarillo-Luna, et al 2007; donde se evaluó el efecto del estrés crónico inducido por restricción de movimiento de 1h y 4h por 4 días en ratones Balb/c; se demostró que existe 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, aumentó la SIgA significativamente con respecto al control en el estrés de 4h; sin embargo disminuyó la SIgA en el estrés de 1h.<sup>56,57</sup>

Reyna-Garfías, et al. 2009; en ratas Wistar, aplicó estrés crónico inducido por restricción de movimiento de 3h por 7 días, reportó que las ratas ADX sin estrés no muestran cambios de SIgA; las ratas ADX a las que se les aplicó estrés crónico en comparación a los no ADX muestran decremento de SIgA.<sup>58</sup>

Por todo lo anterior se puede inferir que la respuesta a nivel inmunológico depende tanto del tipo de estrés, como del modelo animal y la duración e intensidad del mismo (agudo y crónico).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El primer problema a estudiar radica en la expresión de los niveles de SIgA de ratones estresados. Estudios previos han mostrado resultados controversiales ya que reportan una disminución en los niveles de SIgA,<sup>57,59,64</sup> y otros que por el contrario, un aumento en los niveles.<sup>55,56</sup> Estos resultados heterogéneos pueden deberse al tipo, a la duración del estrés y al modelo animal empleado en el estudio. Lo que sí se ha demostrado es que puede aumentar el número de células plasmáticas productoras de IgA o el transporte de IgA mediado por el plgR. Existen varios factores que en condiciones de estrés modifican la expresión y la cantidad de SIgA; estos factores son los glucocorticoides y las catecolaminas que se elevan como respuesta al estrés, estas hormonas tienen efectos sobre el sistema inmunológico pero no sabemos el efecto directo que tienen sobre la SIgA. Por esta razón se quitarán las glándulas suprarrenales y se estudiará el efecto con y sin estrés.

El problema que se propone estudiar es el siguiente: ¿Cuál es el efecto de la adrenalectomía sobre la producción de plgR y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones adrenalectomizados sometidos a estrés agudo.

### III. JUSTIFICACIÓN

La mucosa intestinal es sitio de entrada de microorganismos potencialmente patógenos por lo tanto es importante establecer cuáles son los efectos del estrés sobre las respuestas inmunitarias en este sitio anatómico.

La SIgA representa la clase de anticuerpo más abundante presente en la mucosa intestinal y en el resto del MALT; el pIgR desempeña un papel clave en la inmunidad de las mucosas ya que podría no haber SIgA luminal contra patógenos que invaden las mucosas sin la existencia de pIgR, sintetizado en la superficie basolateral de las células epiteliales. Una molécula de pIgR se consume por cada ronda de transporte de IgA a la luz intestinal; por lo tanto, el pIgR al asegurar la eficiente secreción de IgA específica para patógenos y no patógenos, contribuye al mantenimiento de la homeostasis de la mucosa.

Los efectos del estrés mediado por los glucocorticoides y catecolaminas sobre las respuestas inmunitarias en mucosas se han estudiado casi exclusivamente sobre las modificaciones en los niveles de SIgA y prácticamente no existen estudios acerca del efecto del estrés sobre la producción de pIgR y por lo tanto de la secreción de IgA en el lumen intestinal.

Por todo lo anterior es importante analizar los efectos del estrés y de la supresión de las principales hormonas producidas durante éste (glucocorticoides y catecolaminas) sobre la expresión de pIgR y por lo tanto de la SIgA.

## **IV. HIPOTESIS**

Si los efectos del estrés sobre la producción del pIgR y secreción de IgA dependen de la acción de los glucocorticoides y las catecolaminas entonces la remoción de las glándulas suprarrenales eliminará tal efecto.

## **V. OBJETIVOS**

### **A. Objetivo general**

Determinar el efecto de la adrenalectomía sobre la producción de pIgR y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones adrenalectomizados sometidos a estrés.

### **B. Objetivos particulares**

Determinar los niveles de corticosterona séricos en ratones adrenalectomizados.

Determinar el efecto de la supresión de la secreción de glucocorticoides y catecolaminas mediante la adrenalectomía sobre la producción de pIgR, cadena J e IgA en células epiteliales.

Determinar el efecto de la adrenalectomía sobre la producción de SIgA en líquido intestinal.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Población de estudio

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c, machos, de 12 semanas de edad; proporcionados por el bioterio de la Escuela Superior de Medicina, del Instituto Politécnico Nacional; previamente desparasitados con mebendazol y metronidazol. Los procedimientos realizados en los animales cumplieron con los requerimientos que en la materia determinan la norma: NOM-062-ZOO-1999 "*Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*" SAGARPA; y "*La guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio*" National Research Council.

### 2. Grupos de experimentación

Los animales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de estudio:

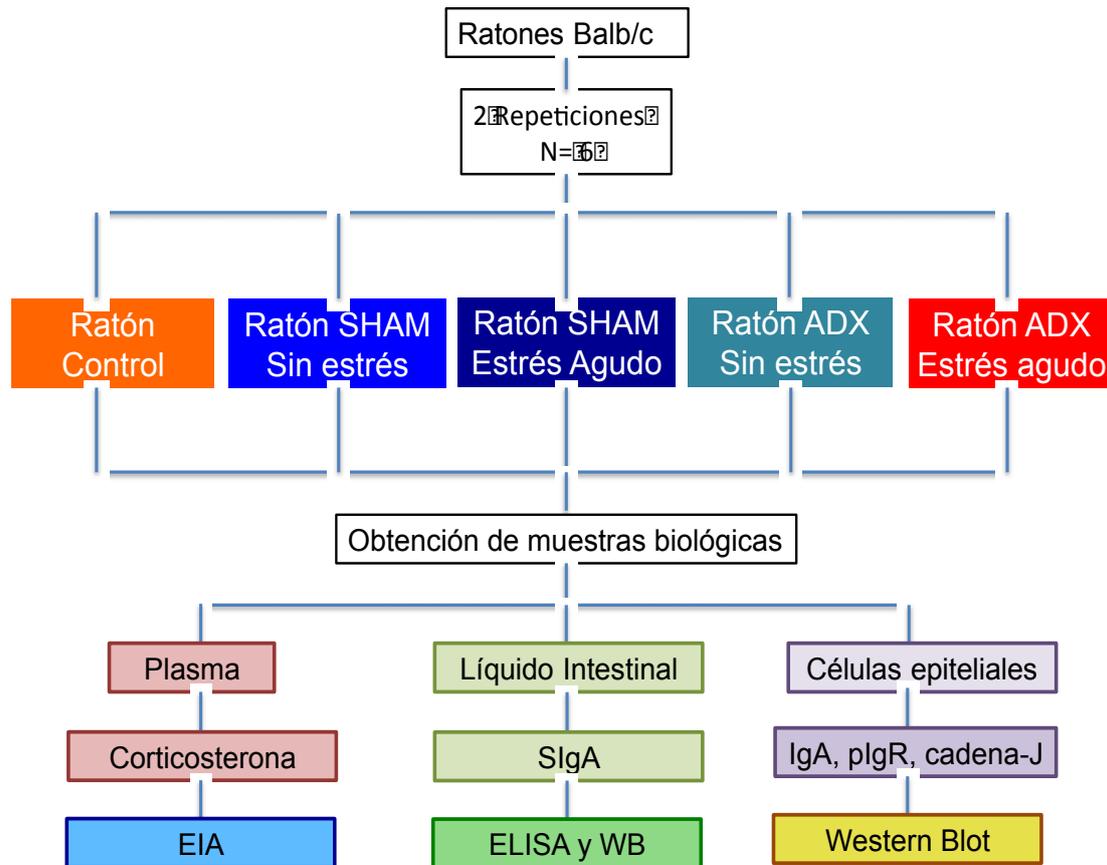
1. Ratones control sin ninguna intervención quirúrgica y mantenidos bajo condiciones libres de estrés. (Control)
2. Ratones sometidos al mismo procedimiento quirúrgico que los adrenalectomizados sin la remoción de las glándulas suprarrenales (SHAM).
3. Ratones bajo el mismo procedimiento quirúrgico que los adrenalectomizados sin la remoción de las glándulas suprarrenales sometidos a estrés agudo (SHAM+E).

4. Ratones adrenalectomizados sin estrés (ADX).
5. Ratones adrenalectomizados sometidos a estrés agudo (ADX+E).

### **3. Diseño experimental**

Los ratones utilizados en el proyecto se dividieron aleatoriamente en 5 grupos: 1) Ratones control; 2) Ratones SHAM; 3) Ratones SHAM+E; 4) Ratones ADX; y 5) ADX+E. El tamaño de muestra fue de seis ratones por grupo y el ensayo se llevó a cabo por duplicado siendo los experimentos independientes entre sí.

De cada grupo se obtuvieron suero para la determinación de corticosterona por EIA, líquido intestinal para determinar los niveles de SIgA por la técnica de ELISA y Western Blot. Y finalmente se obtuvieron células epiteliales para determinar la expresión de IgA, cadena J y pIgR por la técnica de Western Blot, Figura 5.



**Figura 5. Diseño experimental del proyecto de investigación.** Los ratones del proyecto de investigación se dividieron en 5 grupos: 1. Ratón control; 2. Ratón SHAM (cirugía sin adrenalectomía); 3. Ratón SHAM + E (cirugía sin adrenalectomía sometido a estrés agudo); 4. Ratón ADX (adrenalectomizado); y 5. Ratón ADX +E (adrenalectomizado + Estrés agudo). Se obtuvo plasma, líquido intestinal y células epiteliales para su procesamiento por las técnicas de EIA, ELISA y Western Blot.

La cirugía se realizó en horario matutino (9:00 am). La anestesia general se administró con pentobarbital sódico a una dosis de 4 mg/100 g de peso vía intraperitoneal. El procedimiento se inició afeitando con cuidado el área de incisión quirúrgica, tratando de no provocar soluciones de continuidad y se realizó asepsia y antisepsia del área con benzal y yodopovidona.

Por medio de un abordaje posterior en el área lumbar, se realizó sobre la línea media una incisión de 1 cm aproximadamente, disecando los tejidos por debajo de ambos bordes costales. En el mismo sitio, paralelo a la columna vertebral, de manera bilateral, se realizó una segunda y tercera incisión en el polo superior de ambos riñones; se procedió a ubicar las glándulas suprarrenales separando y disecando los tejidos, posteriormente se retiraron cada una de ellas mediante tracción con una pinza de disección curva de uso oftalmológico; se aplicó hemostasia por compresión y se cerraron en dos planos. En el postquirúrgico inmediato, se les administró corticosterona intraperitoneal a una dosis de 5 mg/kg. En el periodo de recuperación (15 días), se les administró por vía oral solución mixta (glucosada al 10% y NaCl 0.9 %); y su dieta habitual "The Rat Chow" (humedad 12 %, proteína 22 %, grasa 4 %, calcio 1 %, fibra 5 %, cenizas 8 %, fósforo 0.74 %) y cambio de cama cada dos días.<sup>71,72</sup>

Los ratones se colocaron en cajas medianas con dos ratones cada una, en un ambiente con poco ruido, sin movimiento y sin manipulación de los animales al momento de la limpieza.

## **5. Protocolo de estrés agudo**

Como modelo de estrés que se utilizó la inmovilización durante una hora. El modelo consiste en la fijación de las cuatro extremidades y la cola sobre una superficie plana. Este protocolo se aplicó 15 días después del procedimiento quirúrgico.

## **6. Sacrificio y obtención del material biológico**

Al término del protocolo de estrés; cada grupo de ratones se anestesió con ketamina a una dosis de 100 UI, por vía intraperitoneal y se obtuvieron de 0.5 a 1 mL de sangre por punción cardiaca. La sangre se centrifugó para la obtención de suero el cual fue almacenado en alicotas de 600 $\mu$ L a -70°C hasta el momento de sus análisis para la cuantificación de corticosterona. Se continuó con la disección sobre la línea media abdominal para disecar el intestino delgado para la obtención de líquido intestinal y células epiteliales.

### **6.1 Líquido intestinal**

El líquido intestinal se obtuvo por medio de un lavado de la luz intestinal realizado con 5 mL de PBS 1X el cual fue transfundido con ayuda de una cánula la cual fue introducida 0.5 cm por uno de los polos del intestino delgado. Al líquido intestinal colectado se le agregaron 100  $\mu$ L de inhibidor de proteasas (Complete Mini, Roche) y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación fue almacenado en alícuotas de 500  $\mu$ L a -

70 °C hasta el momento de su análisis para la determinación de SIgA por la técnica de ELISA y Western Blot.

## **6.2 Obtención de células epiteliales**

Una vez lavado el intestino, fue evertido e incubado en 50 mL de EDTA disódico 1.5 mM en medio de cultivo RPMI (Sigma Chemical); 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) 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, compuesto

por 900  $\mu$ L de solución homogenizadora (Trisma base) y 100  $\mu$ L de inhibidor de proteasas; posteriormente se homogenizaron con un homogenizador de mano (Tissue Ruptor 230 V, 50/60 Hz EU/CH; 9001272). Se centrifugó 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y almacenado en alícuotas de 200  $\mu$ L a -70 °C hasta el momento de su análisis para la detección de la expresión de pIgR, IgA, SIgA,  $\beta$ -actina y cadena-J por la técnica de Western Blot.<sup>73</sup>

## **7. Cuantificación de corticosterona sérica por la técnica de EIA**

La concentración de corticosterona fue determinada en suero por medio de inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés *enzyme immunoassay*) utilizando un kit de la marca Stressgen (catálogo 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), con una longitud de onda de 405nm. Se realizó una curva estándar para conocer la concentración de corticosterona en ng/ml.

## **8. Cuantificación de SIgA en líquido intestinal por la técnica de ELISA**

Los niveles de SIgA en líquido intestinal se determinaron por la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) en todos los grupos de experimentación.

Se realizó una curva estándar con IgA de mieloma de ratón para conocer la concentración de IgA en las muestras biológicas. El ensayo se llevo acabo por duplicado de la muestra en una placa de ELISA de 96 pozos de fondo plano, la placa fue cubierta con 100  $\mu$ L/ pozo de una solución 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 incubo toda la noche en refrigeración a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con una solución de Tween al 0.05 % en PBS a pH 7.4 (PBS-T) de 2 min por cada lavado y otros 3 lavados con PBS 1X de 2 min por cada lavado.

La placa se bloqueo con 100  $\mu$ L/pozo de leche libre de grasas al 6 % en PBS-T al 0.05%. Se realizaron 3 lavados con PBS-T de 2 min y 3 lavados con PBS 1X de 2 min. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ 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-T y 3 veces con PBS 1X. Se agregaron 100  $\mu$ L de un anticuerpo anti-IgA peroxidado de ratón (Sigma) diluido 1:3000 en una solución de PBS-T e incubada 2 h a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 2 min con PBS-T y se agregaron 100  $\mu$ L de una solución de sustrato/pozo (acido cítrico 0.1 M, difosfato disodico 0.2 M, peróxido de hidrógeno al 30 % y *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  $\mu$ L por pozo de una disolución de acido sulfúrico 2.5 M. La absorbancia fue determinada en un lector de placas de ELISA utilizando un filtro de 492 nm.

## **9. Determinación de pIgR, $\beta$ -actina, IgA y cadena J en células epiteliales SIgA en líquido intestinal, por la técnica de Western Blot**

La concentración proteica en el homogenizado de células epiteliales se determinó por el método de Bradford.<sup>74</sup> Se utilizaron 50  $\mu$ g de cada extracto proteico/pozo de células epiteliales y 30  $\mu$ g de líquidos intestinales. Previo a la electroforesis cada muestra se incubó con  $\beta$ -mercaptoetanol y buffer de carga a baño María a 80 °C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se separaron por peso molecular en un gel de poliacrilamida al 10 %. La electroforesis se llevo a cabo a 88 V durante 2 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana a 20 V para SIgA, IgA, pIgR y  $\beta$ -actina, durante 60 min; y 15 V durante 45 min para cadena J, en una cámara de transferencia semi-seca.

Para la determinación de IgA, SIgA,  $\beta$ -actina y cadena J las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche al 5% (w/v) en búfer PBS-T durante 2h a agitación constante. Fueron incubadas con una solución 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 solución PBS-T de 10 min cada uno en agitación constante.

Para la determinación de pIgR las membranas fueron bloqueadas con una solución de gelatina de pescado al 1% (w/v) diluida en búfer PBS-T durante 2 h en agitación constante. Posteriormente las membranas fueron incubadas con una solución de anticuerpo primario policlonal anti-componente secretor (SC) a una

dilución 1:10 000, durante toda la noche en refrigeración y en agitación continua. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución PBS-T y las membranas se incubaron con una solución de anticuerpo secundario anti conejo a una dilución 1:10 000 en gelatina de pescado durante 2 h a TA en agitación constante. Se realizaron 3 lavados de las membranas de 10 min cada uno con solución PBS-T.

Después de realizar los lavados, en ausencia de luz, las membranas fueron incubadas durante 1 min con luminol; las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia usando una película fotográfica con una exposición de 30 segundos para la IgA, SIgA y cadena-J; y 2 min para el pIgR. La densitometría de las bandas de proteínas fueron determinadas con el software Quantity One 1-D.<sup>75</sup>

## **10. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Sigma Plot versión 11.0. Se considero como estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0.05$ . Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Para la comparación de la media entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student. La comparación de más de dos grupos se determinó con la prueba de ANOVA de una vía.

## VII. RESULTADOS

### 1. Concentración de corticosterona sérica

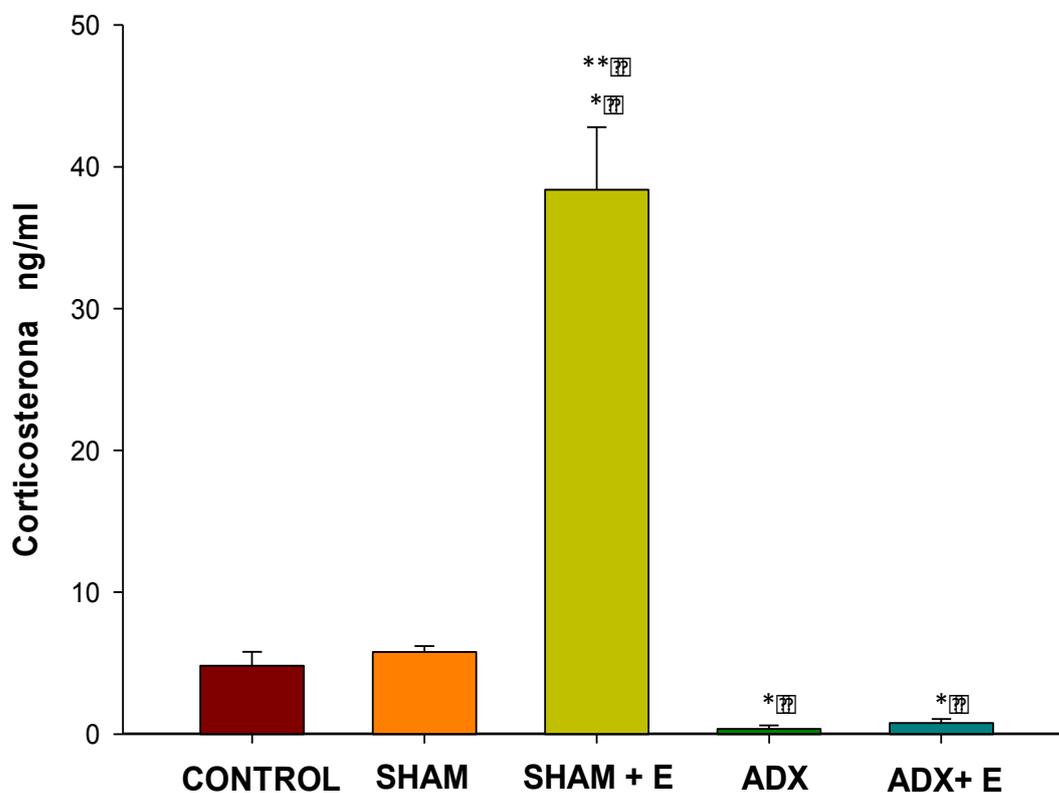
La concentración de corticosterona sérica fue determinada en todos los grupos de estudio por la técnica de inmunoensayo enzimático.

La Figura 6 muestra la concentración de corticosterona en suero en los diferentes grupos de estudio.

En el grupo SHAM+E las concentraciones de corticosterona en suero ( $39.07 \pm 3.78$  ng/mL), aumentó significativamente en comparación con el grupo control ( $5.4 \pm 2.5$  ng/mL) ( $p < 0.001$ ),

Entre el SHAM sin estrés ( $6.5 \pm 1.2$  ng/mL) y el control ( $5.4 \pm 2.5$  ng/mL) no existen diferencias significativas, sin embargo, se puede observar una clara diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon con el grupo de animales adrenalectomizados, cuyos niveles de corticosterona ( $1.3 \pm 0.6$  ng/mL) no se elevaron en respuesta al estrés manteniéndose significativamente por debajo de los ratones control ( $p < 0.001$ ).

La comparación de los grupos estresados es significativa, el grupo SHAM+E ( $39.07 \pm 3.78$  ng/mL), presentó mayor concentración de corticosterona en comparación al grupo ADX+E. ( $1.9 \pm 0.7$  ng/mL) ( $p < 0.001$ ).



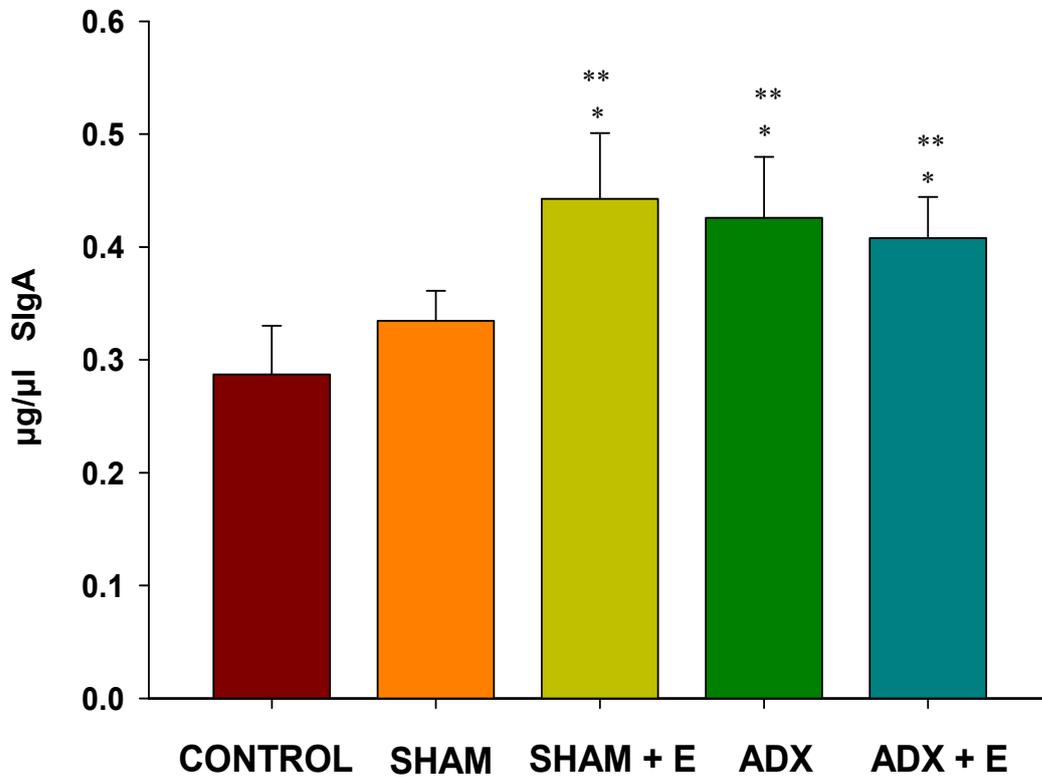
**Figura 6. Concentración de corticosterona sérica.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. Se muestran los 5 grupos de estudio descritos en materiales y métodos. El grupo SHAM+E tiene un aumento significativo de los niveles de corticosterona con respecto a los demás. En el grupo adrenalectomizado no se elevaron los niveles de corticosterona en respuesta al estrés, manteniéndose por de bajo de los ratones control.; \*p < 0.001 VS Control; \*\*p < 0.01 VS ADX+E

## 2. Concentración de SIgA en líquido intestinal

La concentración de SIgA en líquido intestinal fue determinado por la técnica de ELISA. En la Figura 7 se muestra las concentraciones de SIgA en los diferentes grupos de estudio.

Los grupos SHAM+E ( $0.442 \pm 0.058 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), ADX+E ( $0.407 \pm 0.036 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y ADX ( $0.425 \pm 0.053 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) presentaron una mayor concentración de SIgA con respecto al grupo control ( $0.287 \pm 0.0432 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

El grupo SHAM+E ( $0.442 \pm 0.058 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mostró un aumento significativo en la producción de SIgA con respecto al grupo SHAM ( $0.334 \pm 0.043 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ( $p < 0.001$ ). Del mismo modo los grupos adrenalectomizados sin estrés ( $0.425 \pm 0.053 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y con estrés ( $0.407 \pm 0.036 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) también mostraron un aumento significativo en comparación al grupo SHAM ( $0.334 \pm 0.043 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (SHAM VS ADX,  $p < 0.001$ ; SHAM VS ADX+E,  $p = 0.003$ ). Figura 7



**Figura 7. Concentración de SIgA en el líquido intestinal.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar, de dos experimentos independientes entre sí, n=6 ratones por grupo. Los grupos SHAM+E, ADX+E y ADX presentan una mayor concentración de SIgA, siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo control y al grupo SHAM. \*p<0.001 VS Control; \*\*p<0.001 VS SHAM.

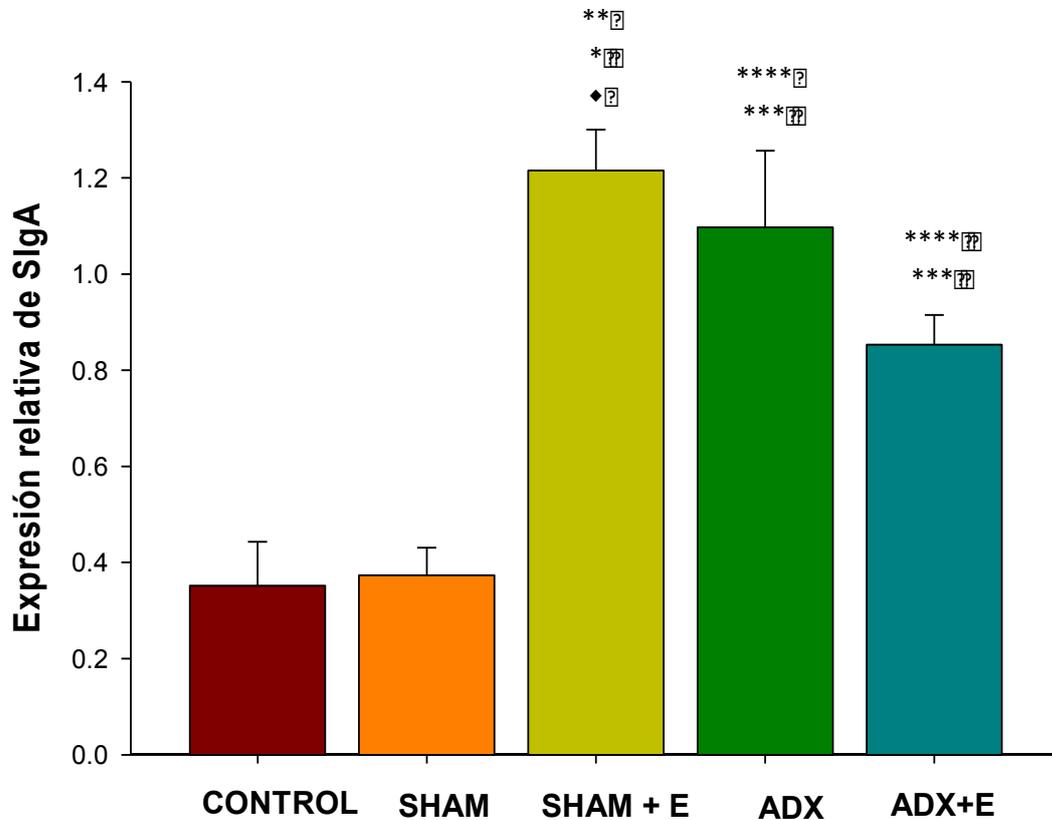
### 3. Expresión de SIgA en líquido intestinal

La expresión relativa de SIgA existente en el líquido intestinal fue determinado por medio de la técnica de Western Blot. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Los ratones SHAM+E ( $1.215 \pm 0.085$ ) presentaron una mayor expresión de SIgA y esta fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al grupo control ( $0.351 \pm 0.067$ ). Del mismo modo los ratones adrenalectomizados mostraron un aumento significativo ( $p < 0.01$ ).

Al comparar estos grupos con el grupo SHAM ( $0.373 \pm 0.057$ ), de igual manera el grupo SHAM+E ( $1.215 \pm 0.085$ ) mostró un aumento significativo en la producción de SIgA ( $p < 0.001$ ). Los grupos adrenalectomizados sin estrés ( $1.097 \pm 0.161$ ) y con estrés ( $0.853 \pm 0.061$ ) también mostraron un aumento significativo ( $p < 0.01$ ).

La comparación de los grupos estresados es significativa, el grupo SHAM+E ( $1.215 \pm 0.085$ ) presentó mayor expresión de SIgA ( $p < 0.01$ ), en comparación al grupo ADX+E ( $0.853 \pm 0.061$ ). Figura 8



**Figura 8. Expresión de SIgA en el líquido intestinal.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar, de dos experimentos independientes entre sí, n=6 ratones por grupo. Los grupos SHAM+E, ADX y ADX+E presentan una mayor concentración de SIgA, siendo estadísticamente significativa con respecto al control y al grupo SHAM. \*p<0.001 VS Control; \*\*p<0.001 VS SHAM; \*\*\* p<0.01 VS Control; \*\*\*\*p<0.01 VS SHAM; ♦p<0.01 VS ADX+E

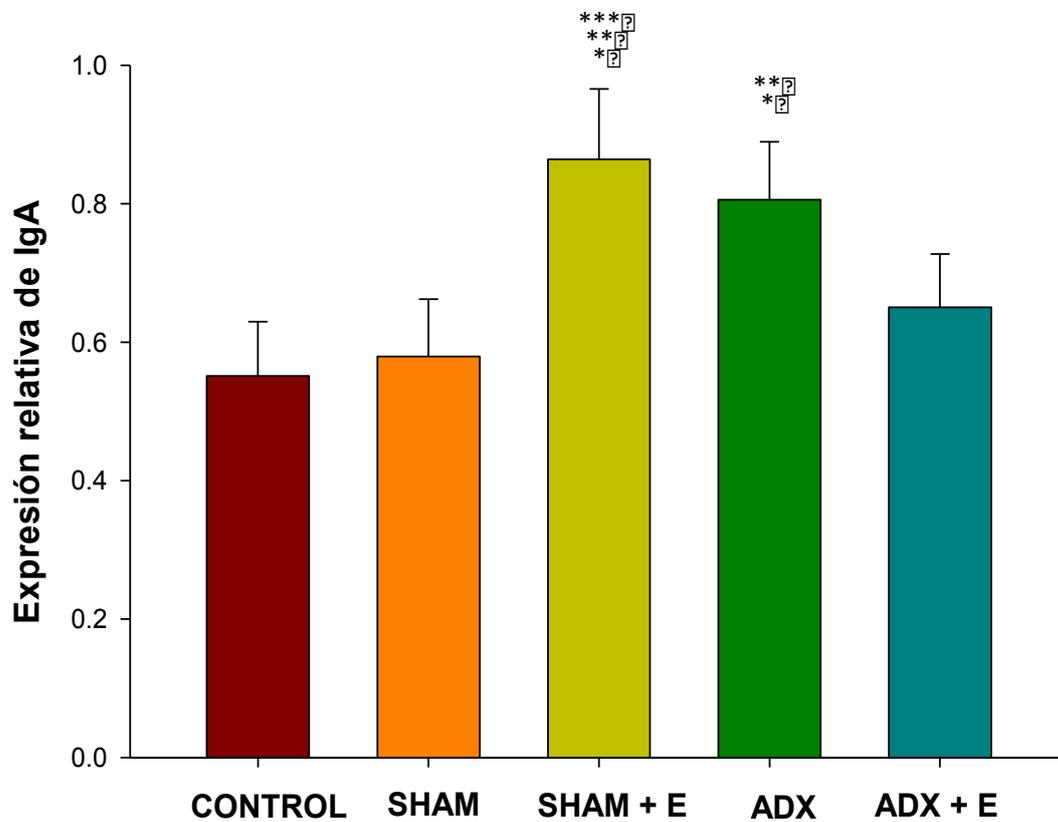
#### 4. Expresión de IgA en células epiteliales

La expresión de IgA en células epiteliales fue determinada por medio de la técnica de Western Blot. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Los grupos SHAM+E ( $0.863 \pm 0.101$ ) y ADX ( $0.805 \pm 0.137$ ) fueron los que presentaron una mayor producción de IgA siendo ésta diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ( $0.551 \pm 0.078$ ) y SHAM ( $0.605 \pm 0.076$ ) ( $p < 0.001$ ).

El grupo SHAM+E ( $0.863 \pm 0.101$ ) además presentó un aumento significativo de IgA en comparación al grupo ADX+E ( $0.623 \pm 0.029$ ) ( $p = 0.01$ ).

Figura 9



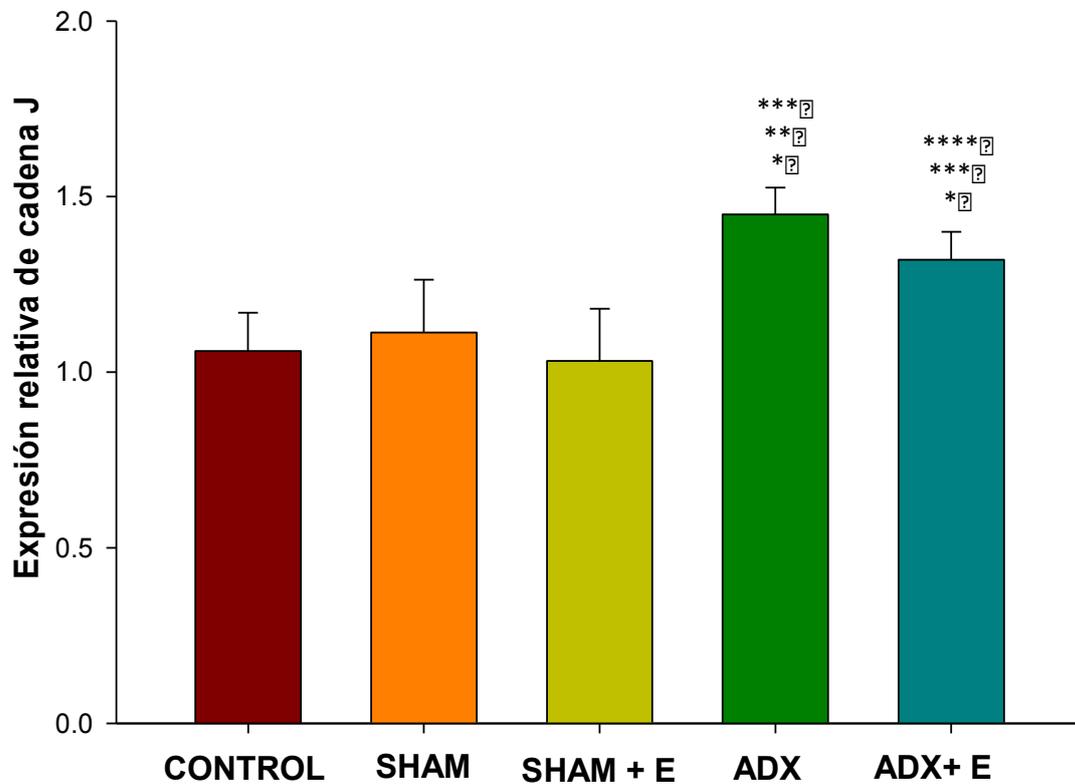
**Figura 9. Expresión de IgA en células epiteliales.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar, de dos experimentos independientes entre sí, n=6 ratones por grupo. Existe una mayor producción en los grupos SHAM+E y ADX, siendo significativa con respecto al resto de los grupos. \*p<0.001 VS Control; \*\*p<0.001 VS SHAM; \*\*\*p=0.01 VS ADX+E.

## 5. Expresión de cadena J en células epiteliales

La producción de cadena J en las células del epitelio intestinal fue determinada por medio de la técnica de Western Blot. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Los dos grupos de ratones adrenalectomizados con ( $1.220 \pm 0.193$ ) y sin estrés tuvieron una mayor producción de cadena J, dónde el ADX fue el más destacado por su mayor producción ( $1.249 \pm 0.143$ ), la cual es significativamente más alta en comparación al grupo control ( $1.059 \pm 0.109$ ) ( $p < 0.001$ ). De igual forma presentó un aumento significativo en comparación con el grupo SHAM ( $1.112 \pm 0.134$ ) y el grupo SHAM+E ( $1.032 \pm 0.148$ ) ( $p < 0.001$ ).

Los ratones adrenalectomizados sometidos a estrés ( $1.220 \pm 0.193$ ), mostraron de igual forma un aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo SHAM+ E ( $1.032 \pm 0.148$ ) ( $p = 0.01$ ). Figura 10



**Figura 10. Expresión de cadena J en células epiteliales.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar, de dos experimentos independientes entre sí, n=6 ratones por grupo. Los grupos de ratones adrenalectomizados (ADX+E y ADX) mostraron un aumento significativo de la expresión de la cadena J con respecto a los grupos control y SHAM. \*p<0.001 VS Control; \*\*p<0.001 VS SHAM; \*\*\*p<0.001 VS SHAM+E; \*\*\*\*p=0.01 VS SHAM+E.

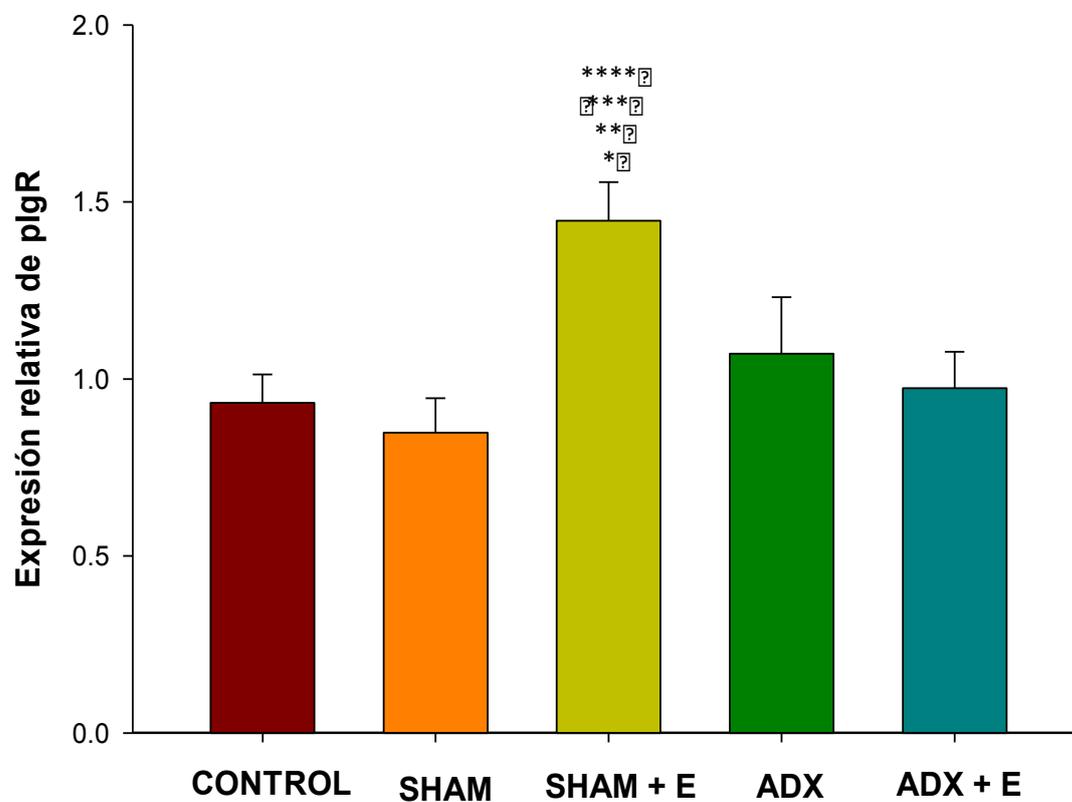
## 6. Expresión de plgR en células epiteliales

La expresión de plgR en células epiteliales fue determinada por medio de la técnica de Western Blot en los diferentes grupos de estudio; Los resultados se muestran en la Figura 11.

La expresión de plgR en células epiteliales se mantuvo constante en los ratones SHAM ( $0.847 \pm 0.097$ ) con respecto a los ratones control ( $0.932 \pm 0.080$ ).

La expresión de plgR en células epiteliales aumentó significativamente en respuesta al estrés (SHAM+E) ( $1.456 \pm 0.248$ ) en comparación a los ratones control ( $0.932 \pm 0.080$ ) ( $p < 0.001$ ).

En los ratones adrenalectomizados ( $0.973 \pm 0.103$ ) se perdió esta respuesta ante el estrés, observándose en estos grupos una expresión de plgR muy similar al grupo control ( $0.932 \pm 0.080$ ). Figura 11



**Figura 11. Expresión de plgR en células epiteliales.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar, de dos experimentos independientes entre sí, n=12 ratones por grupo. La producción de plgR aumentó significativamente en los ratones SHAM+E con respecto a los grupos control; sin embargo, esta respuesta se perdió tras la adrenalectomía. \* $p < 0.001$  VS Control; \*\* $p < 0.001$  VS SHAM; \*\*\* $p < 0.001$  VS ADX; \*\*\*\* $p < 0.001$  VS ADX+E.

## VIII. DISCUSIÓN

Las respuestas fisiológicas inducidas por el estrés involucran al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal así como al sistema nervioso autónomo; esta respuesta está mediada de manera importante por la liberación de glucocorticoides y las catecolaminas.<sup>28,29</sup> Se sabe que el estrés físico o mental aumenta rápidamente la producción de ACTH, haciendo que la corticosterona se incremente hasta en 20 veces su concentración normal.<sup>78</sup> El modelo de estrés agudo inducido por inmovilización durante 1 h empleado en la presente investigación causó un aumento significativo en la concentración sérica de corticosterona en el grupo estresado (SHAM+E), en comparación con el grupo control corroborándose así, el estímulo del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, lo que permite validar el modelo de estrés empleado en este protocolo (Figura 6).

Por otra parte, los ratones que fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico sin remoción de las glándulas suprarrenales y sin estrés (SHAM) no aumentaron la concentración sérica de corticosterona demostrando que el procedimiento quirúrgico por sí mismo, no modifica este parámetro.

Considerando que las glándulas suprarrenales son la principal fuente de corticosterona, se demostró la eficacia del procedimiento quirúrgico con la determinación de la concentración sérica de esta hormona en los ratones adrenalectomizados; los resultados demostraron que la concentración de corticosterona disminuyó significativamente en comparación con el grupo control lo

que permite aseverar que el procedimiento quirúrgico fue correcto (Figura 6). Otro resultado que permite confirmar esta aseveración, fue la concentración de corticosterona en los ratones adrenalectomizados sometidos a estrés, donde se perdió totalmente la respuesta hormonal ante este estímulo (ADX+E).

Los efectos del estrés sobre las respuestas inmunitarias en mucosas, han sido investigados en diversos estudios. El sistema neuroendocrino está estrechamente relacionado con éstas respuestas inmunitarias; la comunicación bidireccional entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrino dentro del intestino esta mediada en gran parte, por hormonas (glucocorticoides), neurotransmisores (noradrenalina, acetilcolina), neuropéptidos (sustancia P, somatostatina, VIP, etc.) y receptores (receptor glucocorticoide tipo I y tipo II, etc.) que son comunes en ambos sistemas.<sup>22</sup>

La barrera epitelial intestinal posee una función importante en la respuesta inmunitaria del intestino, restringiendo tanto la permeación transcelular como paracelular de moléculas, constituyendo una barrera de defensa fisiológica.

Trabajos previos reportan que el estrés agudo induce cambios estructurales en el epitelio intestinal provocando una mayor permeabilidad molecular,<sup>102</sup> además posee efectos inmunoestimulantes,<sup>93</sup> favoreciendo el aumento de los niveles de SIgA en líquido intestinal con respecto al control en modelos de estrés agudo inducidos por inmovilización.<sup>94,95,96,97</sup>

En el presente estudio la concentración de SIgA en líquido intestinal medida por la técnica de ELISA aumentó significativamente en los ratones SHAM

sometidos a estrés, observándose este mismo efecto en los ratones adrenalectomizados en comparación con los grupos control y SHAM; mostrando así que el estrés agudo empleado en esta investigación así como la adrenalectomía estimuló la producción de SIgA (Figura 7). Estos resultados fueron confirmados por la técnica de Western Blot, donde se observó el mismo comportamiento de la SIgA en todos los grupos (Figura 8).

Los resultados de IgA evaluada en células epiteliales por la técnica de Western Blot, mostraron un mayor aumento en la expresión de esta proteína en los grupos SHAM+E y adrenalectomizado sin estrés (ADX); corroborándose que en condiciones de respuesta al estrés agudo (SHAM+E) y en ausencia de glándulas suprarrenales, se estimula una mayor producción de IgA.

La cadena J es esencial para la capacidad de los polímeros de IgA de transportarse en forma activa a través de las células epiteliales, uniéndose al receptor de inmunoglobulinas polimérica (pIgR), al lumen intestinal; su producción se genera en el retículo endoplásmico de las células plasmáticas.<sup>22</sup> En éste estudio se determinó la cadena J por Western Blot en células epiteliales, en dónde los adrenalectomizados mostraron una mayor producción de cadena J, en comparación con los grupos SHAM y control que no mostraron cambios significativos.

Estudios recientes, enfatizan el efecto de los glucocorticoides sobre las funciones inmunológicas de la mucosa intestinal, ejerciendo un efecto regulador a través de la apoptosis celular y de la conservación de la integridad del epitelio.<sup>73,103</sup> La adrenalectomía favorece cambios funcionales y estructurales en el

epitelio, provocando desaorganización en el epitelio y un aumento en la permeabilidad intestinal<sup>100,104</sup> y deteniendo el desarrollo normal estructural a través de una disminución de la renovación y crecimiento de las vellosidades intestinales.<sup>99</sup> Es importante mencionar que las células epiteliales del intestino poseen receptores para glucocorticoides,<sup>99,103</sup> y representan un elemento importante en muchas funciones tanto inmunológicas como digestivas.

La ausencia hormonal y por lo tanto el cambio en la fisiología y morfología normal del epitelio en los ratones adrenalectomizados sin estrés, pudo haber favorecido un aumento en el transporte de IgA y cadena J en células epiteliales, se menciona además, que la adrenalectomía ante un evento de estrés, sufre todavía más cambios a nivel intestinal en estructura y función,<sup>102</sup> además de que no previene la apoptosis y la disminución de células del sistema inmunitario en el epitelio,<sup>72,86</sup> explicando los resultados de la presente investigación, donde el grupo ADX+E no mostró cambios en la expresión de IgA en células epiteliales con respecto a los grupos control.

Es importante puntualizar que los niveles de IgA secretora también dependen de factores como la cadena J y el pIgR; sobre todo del receptor de inmunoglobulina polimérica, que hace posible el transporte de un polímero de IgA desde la célula epitelial hasta la luz intestinal. Los resultados del pIgR en el presente estudio mostraron un aumento significativo en el grupo estresado (SHAM+E) con respecto a los otros grupos, corroborando que existe una mayor producción de la molécula en presencia del estrés agudo; coincidiendo con trabajos anteriores donde reportan un incremento significativo en la expresión de

pIgR en células epiteliales de ratones Balb/c ante un estrés agudo inducido por inmovilización 1 h.<sup>96,97</sup>

En contraste, los grupos adrenalectomizados no mostraron cambios significativos con respecto al control, lo que nos permite corroborar que la producción del pIgR está directamente relacionada con la estimulación hormonal inducida por el estrés, especialmente por los glucocorticoides.<sup>101</sup>

El grupo SHAM sin estrés mostró una expresión de pIgR similar a la observada en el grupo control, validando que los efectos observados sobre este receptor, fueron secundarios al estrés y no al procedimiento quirúrgico.

Finalmente los resultados de la expresión de SIgA en el líquido intestinal en los grupos SHAM+E, ADX y ADX+E, correlacionaron con la mayor producción de IgA en células epiteliales de éstos grupos.

La concentración significativamente mayor en el grupo SHAM+E de SIgA en líquido intestinal y de pIgR e IgA en células epiteliales, con respecto al control, nos permite corroborar que el estrés agudo, estimula la producción de éstas moléculas.

Aún cuando el pIgR no aumentó su expresión en el grupo adrenalectomizado (por ausencia de estimulación hormonal), existe un aumento de SIgA en líquido intestinal; este aumento pudo ser favorecido por un aumento en la permeabilidad intestinal a consecuencia de los cambios estructurales y funcionales que se inducen en esta condición<sup>99,100,104</sup>, y también ocasionada por la fuga de IgA de otros órganos (vía biliar) hacia la luz intestinal, lo cual coincide con estudios reportados previamente.<sup>98</sup> Otra explicación importante de mencionar son

los efectos que tienen las catecolaminas sobre el sistema inmunológico, que a pesar de la remoción de las glándulas suprarrenales (fuente principal de adrenalina); el sistema nervioso simpático comúnmente secreta noradrenalina como neurotransmisor local, directamente a los órganos blanco y en condiciones de estrés también aumenta su secreción. Las catecolaminas estimulan los receptores adrenérgicos (AR)  $\alpha$  y  $\beta$ , presentes en la superficie celular de varios tipos celulares, incluyendo a las células epiteliales; su estímulo directo pudo favorecer de igual forma, el aumento de SIgA en el lumen intestinal.<sup>97</sup>

## IX. CONCLUSIONES

- El aumento significativo de corticosterona sérica y de pIgR e IgA en las células epiteliales así como de SIgA en líquidos intestinales en el grupo SHAM+E en comparación a los otros grupos, muestra que existe una mayor producción de estas moléculas en respuesta al estrés agudo.
- La adrenalectomía con o sin estrés, en relación a la expresión del pIgR, no mostraron ninguna diferencia con respecto al control, lo cual nos permite concluir que la producción del pIgR está directamente relacionado con la estimulación hormonal.
- Probablemente por los cambios estructurales y funcionales en el intestino de los ratones adrenalectomizados, como son la desaorganización en el epitelio, el aumento de la permeabilidad intestinal, así como la alteración de la renovación y crecimiento de las células y vellosidades intestinales; pudo haber favorecido el aumento en el transporte de IgA y cadena J en células epiteliales; Además bajo condiciones de estrés la adrenalectomía induce más cambios morfológicos y funcionales, pudiendo explicar porque el grupo ADX+E no mostró cambios en la expresión de IgA en células epiteliales con respecto a los grupos control.

## **X. PERSPECTIVAS**

1. Al grupo de ratones adrenalectomizados administrar dosis bajas y altas de corticosterona y adrenalina para definir de manera independiente y específica que hormona esta directamente relacionada con la producción de pIgR
2. Analizar los niveles de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en plasma de los grupos IADX, ADX, ISHAM y SHAM
3. Correlacionar los niveles de IgA en líquidos intestinales con el porcentaje de linfocitos B y células productoras de anticuerpos localizadas en tanto en los sitios inductores (placas de Peyer) y sitios efectores (lámina propia) de los segmentos proximal y distal del intestino delgado de ratones control y estresados.
4. Correlacionar los resultados de SIgA, IgA y pIgR de los ratones adrenalectomizados con el estudio inmunohistoquímico de su epitelio intestinal.

## XI. REFERENCIAS

1. **Janeway.** Inmunobiología; Ed. Mac Graw Hill; séptima edición, 2009; cap 11 organización del sistema inmunitario de las mucosas, págs: 459-495.
2. **Zaldívar.** El sistema inmunológico de las mucosas. Rev Cubana Med Gen Integr 2002; 5: 5-12.
- 3 **MacDonald.** The mucosal immune system. Parasite Immunol 2003; 25: 235–246.
- 4 **Cesta.** Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol Pathol 2006; 34: 599.
- 5 **Bailey, Plunkett, Rothkötter, Vega-Lopez, Haverson y Stokes.** Regulation of mucosal immune responses in effector sites. Proc Nutr Soc 2001; 60: 427–435.
- 6 **Crivellato, Vacca and Ribatti.** Setting the stage: An anatomist's view of the immune system. Trends immunol 2004; 25: 210-217.
- 7 **Lebman, Foxx-Orenstein y Lebman.** The Germinal Center Reaction in CD38 Expression Associated with Peyer's Patches Inhibits the Increase the Microenvironment of Human. J Immunol 2001; 166: 2179-2185.
- 8 **Newberry y Lorenz.** Organizing a mucosal defence. Immunol Rev 2005; 206: 6-21.
- 9 **Brandtzaeg, Kiyono, Pabst y Russell.** Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. Mucosal Immunol 2008; 1: 12-23.

- 10 **Mowat.** Anatomical basics of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev Immunol* 2003; 1: 331-341.
- 11 **Brandtzaeg, Farstad y Haraldsen.** Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Mucosal Immunol* 1999; 20: 267-277.
- 12 **Ramiro-Puig, Pérez-Cano, Castellote, Franch and Castell.** The bowel: A key component of the immune system. *Rev Esp Enf Digest* 2008; 100: 29-34.
- 13 **Hayday and Gibbons.** Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. *Mucosal Immunol* 2008 1: 172-174.
- 14 **Cerutti.** Location, location, location: B cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 8- 10.
- 15 **Brandtzaeg.** Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 2007; 25: 5467–5484.
- 16 **Macpherson, McCoy, Johansen y Brandtzaeg.** The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 11-22.
- 17 **Robinson, et al.** Immune System In Vivo A Mucosal IgA-Mediated. *J. Immunol* 2001; 166: 3688-3692.
- 18 **Brandtzaeg.** Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scand J Immunol* 2009; 70: 505–51.
- 19 **Honjo.** Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces; *J. Immunol* 2004; 16: 277–283.
- 20 **Favre, Spertini y Corthe'sy.** Responses Mucosal and Systemic Immune Modulatory Properties Stimulating Secretory IgA Possesses Intrinsic. *J. Immunol.* 2005; 175: 2793-2800.

- 21 **Johansen y Brandtzaeg.** Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends Immunol* 2004; 25: 150-157.
- 22 **Johansen, Braathen y Brandtzaeg.** Role of J Chain in Secretory Immunoglobulin Formation. *Scand. J. Immunol.* 2000; 52: 240-248.
- 23 **Brandtzaeg.** Current Understanding of Gastrointestinal Immunoregulation and Its Relation to Food Allergy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964: 13–45.
- 24 **Phalipon y Corthésy.** Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol* 2003; 24: 55-58.
- 25 **Molina.** Psiconeuroinmunoendocrinología, emociones y enfermedad. *Rev Med ULA* 18: 155-163.
- 26 **Szabo.** Hans Selye and the development of the stress concept. In stress of life from molecules to man. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 85: 19.
- 27 **Mc Ewen.** Stress, adaption and disease: Allostasis and Allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 1: 33-44
- 28 **Glaser y Kiecolt.** Stress-induced immune dysfunction : Implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005 ; 5: 243-251.
- 29 **Gómez González y Escobar.** Estrés y sistema inmune. *Rev Mex Neuroci* 2006; 7: 30-38.
- 30 **Joseph-Bravo y de Gortari.** El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotechnologia* 2007; 3: 65- 76
- 31 **Pacak y Palkovits.** Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocr Rev* 2001; 22: 502–548
- 32 **Torres y Aguilar.** Relación anatómica, clínica y neurofisiológica entre los

sistemas nervioso, endocrino e inmune. *Plasticidad y Restauración Neurológica*. 2006, 5: 1- 20.

33 **Klinger, Herrera, Díaz, Jhann, Ávila y Tobar.** La psiconeuroinmunología en el proceso salud enfermedad. *Colomb Med* 2005; 36: 120- 129.

34 **Sirera, Sánchez y Camps.** Inmunología, estrés, depresión y cáncer. *Rev Psicooncología* 2006; 3: 35-48.

35 **Ayala.** Psiconeuroinmunología, interrelación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario. *Of* 2009; 28: 110-116.

36 **Gómez González y Escobar.** Neuroanatomía del estrés. *Rev Mex Neuroci* 2002; 3: 273-282.

37 **Anisman.** Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2009; 34: 4-20.

38 **Bao, Meynen y Swaaba.** The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. *Elsevier, Brain Res Rev* 2008; 57: 531– 553.

39 **Eskandari y Sternberg.** Neural Immune Interactions in Health and Disease. *N Y Acad Scien* 2002; 966: 20–27.

40 **Salak-Johnson y McGlone.** Stress and immunity in swine and cattle. *J Anim Sci* 2007; 85: 81–88.

41 **Hernández, Becerril, Alvarez y Pavón-Romero.** Vías de neuroinmunomodulación. primera parte. *Salud Mental* 2007; 30: 13- 19.

42 **Hernández, Becerril, Alvarez y Pavón-Romero.** Vías de neuroinmunomodulación; Segunda parte. *Salud Mental* 2008; 31: 29-36.

- 43 **Pavón-Romero, Hernández, Loría y Sandoval.** Interacciones neuroendocrinoinmunológicas. *Salud Mental* 2004; 27: 19-25.
- 44 **Segerstrom y Miller.** Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta- Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychol Bull* 2004; 4: 601–630.
- 45 **Moynihan.** Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 2003; 17: 11–16.
- 46 **Dhabhar.** Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Skin Immunity. The Role of Stress Hormones and Leukocyte Trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 1: 1210-1241.
- 47 **Takatsuji.** The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin A, and chromogranin A in nursing students. *Biomed Research* 2008; 29: 221- 224.
- 48 **Elenkov y Chrousos.** Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory, Cytokines and Autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 6: 290–303.
- 49 **Maes, Song, Lin, Jongh, Van Gastel, Kenis, Bosman, De Meester, Benoy, Neels, Demedts, Janca, Scharpe y Smith.** The effects of psychological stress on humans increased production of pro inflammatory cytokines and a th0 like response in stress induced anxiety. *Cytokine* 1998; 10: 313- 318.
- 50 **Stengel y Taché.** Neuroendocrine Control of the Gut During Stress: Corticotropin- Releasing Factor Signaling Pathways in the Spotlight. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 219–239.
- 51 **Mayer.** The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000;

47: 861-869.

52 **Mayer.** Stress and the Gastrointestinal Tract V. Stress and irritable bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 519-524.

53 **Kaser y Blumberg.** Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2010; 3: 11-16.

54 **Cohen Miller y Rabin.** Psychological Stress and Antibody Response to Immunization: A Critical Review of the Human Literature. *Psychosom Med* 2001; 63: 7–18.

55 **Gleeson y Pyne.** Special Feature: Exercise effects on mucosal immunity *Immunol Cell Biol*, 2000; 78: 536–544.

56 **Jarillo-Luna, Rivera-Aguilar, Martínez-Carrillo, Barbosa-Cabrera, Reyna Garfias y Campos-Rodríguez.** Effect of repeated restraint stress on the levels of intestinal IgA in mice. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32: 681–692.

57 **Jarillo-Luna, Rivera-Aguilar, Reyna Garfias, Lara-Padilla, Kormanovskyc y Campos-Rodríguez.** Effect of restraint stress on the population of intestinal intraepithelial lymphocytes in mice. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 265–275.

58 **Reyna-Garfias, Miliar, Jarillo-Luna, Rivera-Aguilar, Pacheco-Yopez, Baeza y Campos-Rodríguez.** Repeated restraint stress increases IgA concentration in rat small intestine. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 110–118.

59 **Mora y Von-Andrian.** Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Nature* 2008; 1: 96- 109.

60 **Bosch.** Stress and Secretory Immunity. *Int. Rev. Neurobiol.* 2002; 52: 213-253.

- 61 **Rehbinder y Hau.** Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer. *Can J Vet Res* 2006; 70: 151–154.
- 62 **Tsujita.** Secretory IgA in Saliva can be a Useful Stress Marker. *Environ Health Perspect* 1999; 4: 1-8.
- 63 **Burns, Ring, Harrison, Carroll y Drayson.** Reductions in secretory immunoglobulin A to cold pressor stress are not influenced by timing of saliva sampling. *Biol Psychol* 2004; 66: 91–98.
- 64 **Yang, Koh, Lee, Chan, Dong, Goh, Anantharaman y Chia.** Self perceived work related stress and the relation with salivary IgA and lysozyme among emergency department nurses. *Occup Environ Med* 2002; 59: 836–84.
- 65 **Donn y Broderick.** Cytokines, stressors, and clinical depression: Augmented adaptation responses underlie depression pathogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2005; 29: 793 – 807.
- 66 **Parth, Diebel y Liberati.** T-cell cytokines affect mucosal immunoglobulin A transport. *Am J Surg* 2007; 194: 128–133.
- 67 **Kaetzel.** The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 2005; 206: 83–99.
- 68 **Cox, Ebersole, Carpenter y Proctor.** Effects of autonomic agonists and immunomodulatory cytokines on polymeric immunoglobulin receptor expression by cultured rat and human salivary and colonic cell lines. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 411– 416.
- 69 **Kaetzel, Blanch y Piskurich.** Coordinate Regulation of IFN Regulatory Factor-1 and the Polymeric Ig Receptor by Proinflammatory Cytokines. *J. Immunol*

1999; 162: 1232-1235.

70 **Olfe, Domanska, Schuett y Kiank.** Different stress-related phenotypes of Balb/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HHA axis responsiveness. *BMC Physiol* 2010; 10: 2-3.

71 **Hoffman-Goetz y Quadrilatero.** N-acetyl-l-cysteine protects intestinal lymphocytes from apoptotic death alter acute exercise in adrenalectomized mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 1664–1672.

72 **Hoffman-Goetz y Quadrilatero.** Adrenalectomy in mice does not prevent loss of intestinal lymphocytes after exercise. *J Appl Physiol* 2004; 96: 2073–2081.

73 **Reséndiz-Albor, Esquivel, López-Revillab, Verdína y Moreno-Fierros.** Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice. *Life Sci* 2005; 76: 2783–2803.

74 **Kurien y Scofiel.** Protein blotting: a review. *J Immunol Methods* 2003; 274: 1–15.

75 **Chow Wang, Pang y Selsted.** Semidry Electroblotting of Peptides and Proteins from Acid–Urea Polyacrylamide Gels. *Anal Biochem* 1997; 253: 225–230.

76 **Proctor y Carpenter.** Neural control of salivary S-IgA secretion. *Int Rev Neurobiol*, 2002; 52: 187-212.

77 **Carpenter, Garrett y Hartley.** The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. *J Physiol* 1998; 512: 567-73.

78 **Ramon.** Sistema neuroendocrino y actividad física. *Conocimiento Corporal* 2008; 1: 3-39.

79 **Kelleher, Hann, Edwards y Sullivan.** Endocrine, neural, and immune control of secretory component output by lacrimal gland acinar cells. *J*

Immunol 1991; 146: 3405-12.

80 **Lambert, Gao, Kelleher, Wickham y Sullivan.** Neural, endocrine and immune regulation of secretory component production by lacrimal gland acinar cells. *Adv Exp Med Biol* 1995; 371: 221-4.

81 **Sullivan, Richardson, MacLaughlin y Wira.** Variations in the levels of secretory component in human uterine fluid during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem* 1984; 20: 509-13.

82 **Wira and Sullivan.** Estradiol and progesterone regulation of immunoglobulin A and G and secretory component in cervicovaginal secretions of the rat. *Biol Reprod* 1985; 32: 90-5.

83 **Teeuw, Bosch, Veerman y Amerongen.** Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: implications for oral health. *Biol Chem* 2004; 385: 1137-46.

84 **Pedersen y Hoffman-Goetz.** Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80: 1055-81.

85 **Pyne, McDonald, Gleeson, Flanagan, Clancy y Fricker.** Mucosal immunity, respiratory illness, and competitive performance in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 348-53.

86 **Quadrilatero y Hoffman-Goetz.** In vivo corticosterone administration at levels occurring with intense exercise does not induce intestinal lymphocyte apoptosis in mice. *J Neuroimmunol* 2005; 162: 137– 148

87 **Sirera, Sánchez, Peiró y Palmero.** Estrés, depresión, inflamación y dolor. *Reme* 2008; 11: 1-28

88 **Rammal, Bouayed, Falla, Boujedaini y Soulimani.** The impact of high

anxiety level on cellular and humoral immunity in mice. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17: 1-8.

89 **Laidlaw, Naito, Dwivedi, Hansi, Henderson y Gruzelier.** The influence of 10 min of the Johrei healing method on laboratory stress. *Complement Ther Med* 2006; 14:127-32

90 **Rehbinder y Hau.** Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer Division of Comparative Medicine, Department Neurosci 2006; 70: 151-4.

91 **Mayer.** Psychological stress and colitis. *Gut* 2000; 46: 595-6.

92 **Mawdsley y Rampton.** Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-91.

93 **Gómez Anzurez Antonio.** 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, 2009.

94 **Ramírez Jiménez Karla.** 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, 2009.

95 **Chávez Ramírez Ricardo.** 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, 2009.

96 **Negrete González Juan Pablo.** Efecto del estrés agudo inducido por inmovilización en la secreción y transporte de IgA en duodeno e ileon de ratones

Balb/C. Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional, 2012.

97 **Mejía Coria José Martín.** Efecto del sistema nervioso simpático en el transporte y secreción de IGA en la mucosa intestinal de ratones Balb/C. Tesis de Maestría – Instituto Politécnico Nacional, 2012.

98 **Bagloli, Davidson y Meddings.** Epithelial distribution of neural receptors in the guinea pig small intestine. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; 83: 389-395.

99 **Miyata, Minai y Haga.** Impaired Growth of Small Intestinal Epithelium by Adrenalectomy in Weaning Rats. *Histochem Cytochem* 2008; 41: 83- 88.

100 **Možeš, Sefčíková, Lenhardt y Raček.** Effect of Adrenalectomy on the Activity of Small Intestine Enzymes in Monosodium Glutamate Obese Rats. *Physiol Res* 2004; 53: 415-422

101 **Li, Wang, Lam, Gutierrez, Solorzano-Vargus, Tsai y Martin.** Transcriptional control of the murine polymeric IgA receptor promoter by glucocorticoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 276: 1425-1434.

102 **Söderholm y Perdue.** Stress and the Gastrointestinal Tract II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 7-13.

103 **Quaroni, Tian, Göke y Podolsky.** Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 277: 1027-1040.

104 **Drozdowski y Thomson.** Intestinal hormones and growth factors: Effects on the small intestine. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 385-406.