



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**“Efecto del estrés agudo inducido por
restricción de movimiento sobre la
secreción basal de IgA en intestino
grueso de ratones BALB/c”.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Karina Angélica Méndez Reséndiz



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor
México. D.F.
2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas. Sección de Investigación y Posgrado. Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Bajo la dirección del Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor y la Dra. Ivonne Arciniega Martínez.
Este trabajo fue apoyado por SIP-COFAA I.P.N.

AGRACECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco principalmente a mi familia por su apoyo durante la realización de esta tesis, por su comprensión y cariño en los buenos y malos momentos.

A mi asesor el Doctor Aldo y la Doctora Ivonne por su orientación, conocimientos, paciencia y motivación que han sido fundamentales para mi formación profesional y personal. Gracias no solo por su gran apoyo durante el desarrollo de esta tesis, si no por formar parte de los grandes momentos que pasaron durante el proceso. Sus enseñanzas y consejos siempre formaran parte de mí.

A todos mis compañeros de laboratorio por bríndame su amistad y apoyo, gracias por hacer de esta experiencia algo divertido.

A todas las personas que estuvieron a mi lado, por darme grandes lecciones de vida, y hacerme madurar.

A todos mis amigos, por compartir conmigo todos los buenos y malos momentos y por seguir formando parte de mi vida.

A mi universidad por brindarme la oportunidad de culminar esta licenciatura y por darme una de las mejores etapas de mi vida.

A dios por permitirme llegar hasta aquí.

CONTENIDO

ÍNDICE	II
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	39
PERSPECTIVAS	40
BIBLIOGRAFÍA	41

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.0. Estrés.....	1
1.1. Clasificación de los estresores.....	1
1.2. Fisiología del estrés (Eje- hipotálamo-hipófisis- adrenal)	2
1.3. Catecolaminas.....	4
1.3.1. Receptores α y β adrenérgicos	5
1.4. Glucocorticoides	6
1.4.1. Receptores de los Glucocorticoides	6
1.5. Estrés y sistema inmunológico	7
1.6. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).....	8
1.7. Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)	9
1.8. Sitios inductores y efectores.....	10
2.0. Anatomía del sistema inmune en mucosas.....	11
2.1. IgA secretoria y sistema inmunitario de mucosas	12
2.2. Citocinas	15
2.3. Intestino Grueso.....	16
2.3.1. Fisiología	16
2.3.2. Anatomía	16

II. ANTECEDENTES DIRECTOS	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPOTESIS.....	¡Error! Marcador no definido.
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
VI. OBJETIVO GENERAL.....	22
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	22
VIII. MATERIALES Y METODOS	23
1.0. Animales y grupos de Experimentación.....	23
1.1. Protocolo de Estrés Agudo	23
1.2. Obtención de Muestras	23
1.2.1. Plasma y suero para cuantificación de corticosterona por RIA	23
1.2.2. Líquidos intestinales.....	24
1.2.3. Obtención de Células Epiteliales	24
1.3. Microbradford.....	25
1.4. Cuantificación de IgA por método de ELISA	26
1.5. Citometría de flujo.....	27
1.5.1. Determinación de linfocitos B y T (CD8 ⁺ y CD4 ⁺).....	27
1.5.2. Célula plasmática (CD 138 ⁺).....	27
1.6. Detección de citocinas intracelulares: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.....	28
1.7. Análisis Estadístico.....	29

IX. RESULTADOS.....	30
1.0. Niveles de Corticosterona.....	30
1.1. Efecto del estrés agudo sobre la producción de IgA en intestino grueso.	31
1.2. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células plasmáticas en intestino grueso.....	32
1.3. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de linfocitos B y T (CD8 ⁺ , CD4 ⁺).....	34
1.4. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de citocinas intracelulares.....	35
X. DISCUSIÓN.....	36
XI. CONCLUSIÓN.....	39
XII. PERSPECTIVAS.....	40
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	41

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características Tejido linfoide asociado a mucosas	9
Cuadro 2. Citocinas y sus efectos.	15

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eje hipotálamo- hipófisis- glándula suprarrenal.....	3
Figura 2. Transcitosis de IgA a travez del epitelio	14
Figura 3. Vista anterior del intestino grueso que muestra las regiones principales.	17
Figura 4. Efecto del estrés agudo sobre los niveles de corticosterona sérica.. ..	30
Figura 5. Efecto del estrés agudo sobre la concentración de IgA en intestino grueso	31
Figura 6. Análisis de células plasmáticas IgA ⁺ de la lámina propia del intestino grueso de ratones.	32
Figura 7. Efecto del estrés agudo sobre la secreción de IgA en intestino grueso.	33
Figura 8. Efecto del estrés agudo sobre las poblaciones de linfocitos B y T de la lámina propia del intestino grueso.....	34
Figura 9. Efecto del estrés agudo sobre el porcentaje de citocinas intracelulares IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.....	35

ABREVIATURAS

A	Glándula suprarrenal
ACTH	Adenocorticotropina
APC	Célula presentadora de antígeno
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
CA	Catecolaminas
CBG	Corticosteroides
CCs	Células cromafines
CD	Célula Detrítica
CP	Célula Plasmática
CRF	Factor Liberador de Corticotropina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GR	Receptor Glucocorticoide
H	Hipotálamo
HHA	Eje- Hipotálamo- Hipófisis- Adrenal
HPA	Eje Hipotálamo-Pituitario- Adrenal
IFN-γ	Interferón- <i>gamma</i>
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
LP	Lamina propia
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MR	Mineralocorticoide
NALT	Tejido linfoide asociado a nariz
NK	Natural Killer

NOM	Norma Oficial Mexicana
P	Pituitaria anterior
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
RIA	Radioinmunoensayo
Rpm	Revoluciones por minuto
SC	Componente Secretor
SIgA	Inmunoglobulina A secretoria
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema Nervioso Simpático
TGB-β	Factor de crecimiento transformante β
TGF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
Th	Linfocitos cooperadores

RESUMEN

La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC) y la coordinación que éste ejerce sobre los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis: autónomo, endocrino e inmune. El principal efector de la respuesta al estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HHA). Recientemente se ha demostrado que en condiciones de estrés se modifica la expresión y concentración de SIgA en intestino delgado, lo cual ha sido atribuido a factores como los glucocorticoides y las catecolaminas; sin embargo poco se sabe respecto a la respuesta del estrés en intestino grueso.

En el presente estudio, se propuso determinar el efecto del estrés agudo inducido por inmovilización sobre la producción basal de IgA en intestino grueso en ratones machos BALB/c. Para lo cual se determinó la concentración de corticosterona en suero mediante RIA, la concentración de SIgA en líquido intestinal mediante ELISA, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfocitos B, células plasmáticas productoras de IgA, y la expresión de citocinas intracelulares (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) por citometría de flujo. Se consideraron dos grupos de estudio: 1) ratones a los cuales se les aplicó un protocolo de estrés agudo por inmovilización durante una hora. 2) ratones sin protocolo de estrés, considerado el grupo control.

Los resultados mostraron un aumento considerable en los niveles de corticosterona sérica por efecto directo del estrés al estimular el eje hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal; así como un incremento en la concentración de SIgA en líquido intestinal debido a las citocinas relacionadas con la síntesis de IgA como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Con respecto a las poblaciones celulares estas mostraron un aumento en el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas positivas para IgA; posiblemente por el efecto de los glucocorticoides y las catecolaminas sobre las células del sistema inmune.

Finalmente se concluye que los glucocorticoides y catecolaminas aumentan las concentraciones de SIgA en intestino grueso actuando de forma directa sobre el funcionamiento de las células inmunes, al acoplarse a sus receptores específicos y modificando la producción de citocinas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias.

INTRODUCCIÓN

1.0. Estrés

El término Estrés se deriva del griego *stringere*, que significa provocar tensión. La palabra se usó por primera vez probablemente al rededor del siglo XIV. Aunque el término y sus derivados han existido durante siglos.

El termino estrés se ha descrito como un estímulo aversivo que altera la homeostasis. Las fuerzas que causan esta alteración se conocen como estresores, mientras que los mecanismos que se activan para neutralizar estos efectos y restablecer la homeostasis son conocidos como respuestas adaptativas (Chrousos y Gold, 1992).

La teoría contemporánea en la biología del estrés conceptualiza un mecanismo integrado por estructuras que provocan cambios conductuales, fisiológicos y bioquímicos dirigidos al mantenimiento de la homeostasis. La respuesta del organismo durante el estrés tiene componentes autónomos y endocrinos que involucran al sistema nervioso central, el sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo- hipófisis- corteza suprarrenal, los cuales actúan coordinadamente para regular las funciones de los organismos (Gold *et al*, 1988).

1.1. Clasificación de los estresores

La respuesta al estrés depende de la calidad, de la intensidad y de la duración del estímulo, así como de la constitución y estado del organismo (De Wied, 1980).

Los distintos tipos de estrés pueden asociarse y ordenarse en función a criterios de duración, los cuales podemos clasificar como:

Estrés agudo: surge de un estímulo único, limitado en tiempo, que da como resultado una respuesta intensa y rápida.

Estrés crónico: Aparece a lo largo de periodos prolongados de tiempo, de manera recurrente, continua, y no necesariamente intensa, pero exigiendo una adaptación permanente, surge por una exposición constante a factores estresantes externos o por una prolongada respuesta al estrés (Rabinovich, 2004).

1.2. Fisiología del estrés (Eje- hipotálamo-hipófisis- adrenal)

La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC) y la coordinación que éste ejerce sobre los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis: autónomo, endocrino e inmune. El principal efector de la respuesta al estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HHA).

Inicialmente, en respuesta a distintos agentes estresantes, se producen señales de activación procedentes de distintas estructuras cerebrales, que convergen en un grupo de neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Estas neuronas sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH, del inglés *corticotropin-releasing hormone*). La CRH llega a la adenohipofisis y estimula a las células corticotropicas, que sintetizan y liberan a la circulación sanguínea a la hormona adenocorticotropa o corticotropina (ACTH, del inglés *adrenocorticotropin hormone*).

Por otra parte, junto a la liberación de CRH, también se puede producir la activación de neuronas magnocelulares del hipotálamo. Estas neuronas sintetizan otras hormonas, como la vasopresina y la oxitocina. Una vez secretada la vasopresina y la oxitocina en la neurohipofisis, esta potenciara el efecto de la CRH sobre la hipófisis anterior. Una vez secretada la ACTH a la circulación sanguínea, esta hormona activa la captación de glucosa en el musculo esquelético y al llegar a las glándulas adrenales, estimula la producción y liberación de los glucocorticoides.

Por tanto, la activación del eje HHA tiene como consecuencia final la secreción de glucocorticoides y se considera que estos se encuentran entre los principales mediadores de los efectos inmunosupresores que producen muchas situaciones de estrés como se aprecia en la figura 1 (Sandi *et al.* 2001).

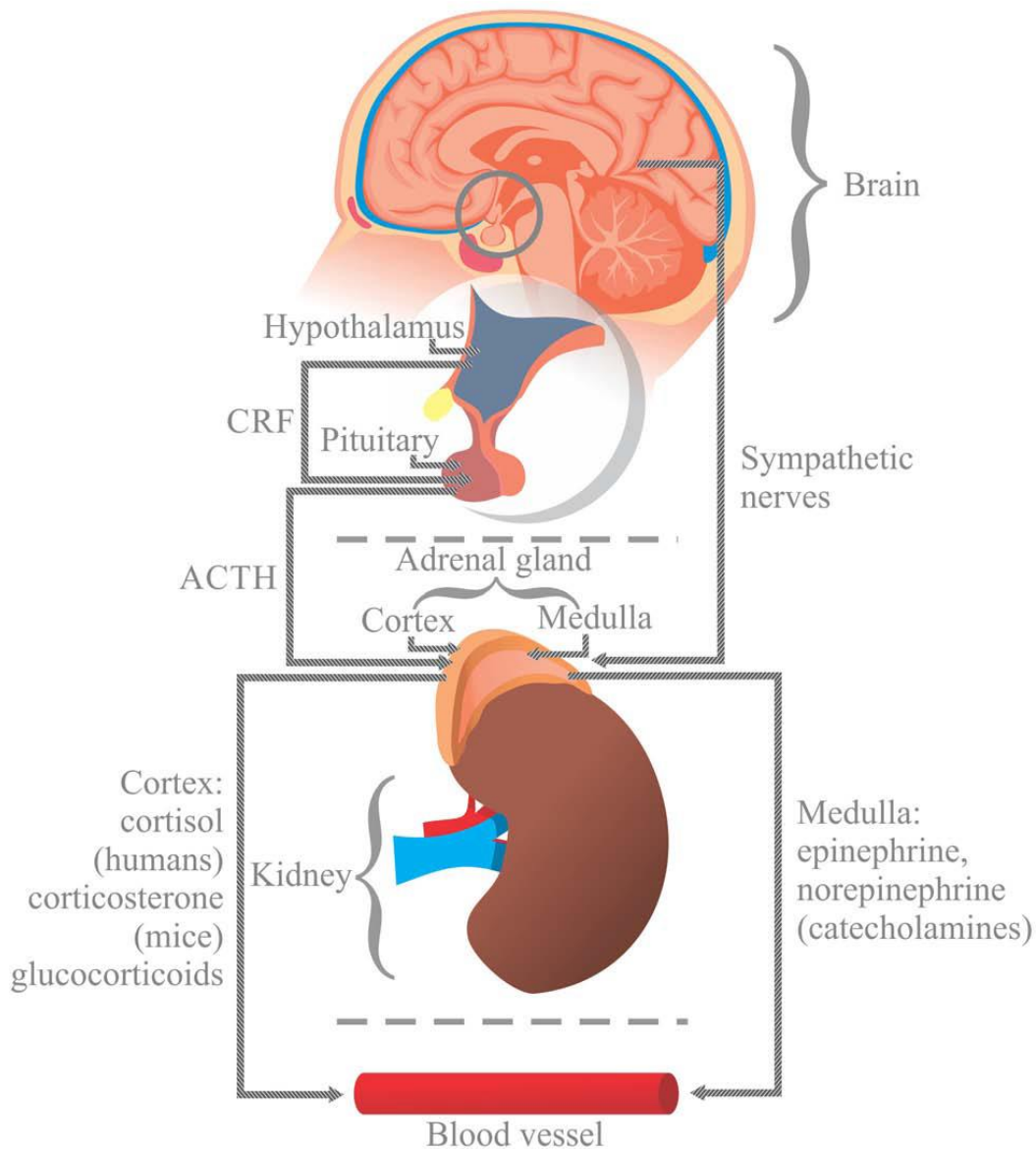


Figura 1. Eje hipotálamo- hipófisis- glándula suprarrenal. En respuesta al estrés, el hipotálamo (H) libera CRF en la pituitaria anterior (P), causando la liberación de la hormona ACTH al torrente sanguíneo. La ACTH estimula la generación de glucocorticoides (cortisol en seres humanos y corticosterona en ratones) en la corteza de la glándula suprarrenal (A). El estrés también activa el sistema nervioso simpático en la médula de la glándula suprarrenal para provocar la producción de catecolaminas, norepinefrina y epinefrina, que son liberadas en sangre. Los Glucocorticoides y catecolaminas influyen en la generación de interleucinas, que están implicadas en la viabilidad y la proliferación de las células inmunocompetentes del intestino (Tomado de Campos-Rodríguez *et al.* 2013).

Las hormonas hipotalámicas e hipofisarias del eje HHA tienen propiedades inmunopotenciadoras y proinflamatorias. Así, los glucocorticoides influyen en el tránsito de leucocitos y otras células del sistema inmune. Citocinas como el factor de necrosis tumoral α , la interleucina-1, interleucina-2 y la interleucina-6, producidas por macrófagos y linfocitos durante el estrés, son conocidos activadores del eje HHA, afectándose en consecuencia la producción de los diferentes mediadores (Arbo y Santos, 2005).

1.3. Catecolaminas.

La medula adrenal forma entre el 10-2% del volumen total de la glándula adrenal, y está constituida principalmente por las células cromafines (CCs). Las CCs son células neuroendocrinas que han sido nombradas así debido a que pueden ser visualizadas por medio de tinciones con sales de cromo. Estas sales oxidan y polimerizan las dos principales catecolaminas (CA) presentes en la medula adrenal (adrenalina y noradrenalina)

La medula adrenal se considera como un ganglio simpático modificado cuyos cuerpos celulares no inervan directamente a un tejido blanco, en cambio, liberan por oxocitosis las CA al torrente sanguíneo en respuesta a la estimulación del Sistema Nervioso Simpático (SNS) (Landsberg y Young 1992).

Las dos principales CA secretadas por las células cromafines de la medula adrenal son la adrenalina y la noradrenalina. La adrenalina es la catecolamina que predomina siendo secretada por la medula adrenal en un 80%, mientras que en un 20% lo constituye la noradrenalina (Young 2003).

Las CA son las responsables de preparar al individuo ante situaciones de emergencia (estrés), siendo responsables de los ajustes homeostáticos rápidos y de corto plazo, sus acciones impactan al nivel cardiovascular, respiratorio y en la secreción hormonal de los otros ejes endocrinos (Guyton, 2006).

El SNS incluye un componente neuronal que regula la inmunidad de forma regional a través de la inervación de los órganos inmunes y la secreción de noradrenalina, y un componente hormonal que regula la inmunidad de forma sistémica a través de la secreción de adrenalina por parte de la médula de la glándula suprarrenal. Algunas características de las CA son las siguientes:

- ✓ Noradrenalina.- Es el neurotransmisor primario del SNS. Es una amina biogénica derivada de la tirosina y su metabolito, la dopamina, es convertida a la noradrenalina por la enzima -hidroxilasa.
- ✓ Adrenalina.- Es un neurotransmisor del SNS. Es una amina biogénica derivada de la tirosina y su metabolito, la dopamina; es convertida a adrenalina por la noradrenalina mediante la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa. (Sternberg, 2006).

1.3.1. Receptores α y β adrenérgicos

Las CA adrenalina y noradrenalina modulan el funcionamiento del sistema inmune a través de sus receptores β localizados en todos los órganos inmunes y en los linfocitos T y B, las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), los monocitos y macrófagos.

Los efectos biológicos de las CA en los órganos efectores son mediados por los receptores adrenérgicos de los cuales existen dos familias: los alfa y los beta. Se ha descrito dos subgrupos de receptores alfa (α_1 y α_2) y los dos subgrupos de beta (β_1 y β_2). Los receptores adrenérgicos están acoplados a receptores de la familia de las proteínas G. la familia de los receptores α son activados de manera no selectiva por adrenalina y noradrenalina produciendo de manera general vasoconstricción, mientras que los receptores β tienen mayor afinidad por la adrenalina y regulan la estimulación cardíaca, la broncodilatación y la vasodilatación (Kvetnansky 2009).

1.4. Glucocorticoides

El eje hipolamo-pituitario adrenal (HPA) se activa en respuesta al estrés liberando CRH por el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), esto estimula a la P para secretar ACTH en la circulación, esto finalmente, induce a las glándulas suprarrenales para sintetizar y secretar glucocorticoides. Los glucocorticoides son un tipo de hormonas esteroides que se sintetizan, principalmente, en la capa fascicular de la corteza de las glándulas adrenales a partir del colesterol, que procede en su mayor parte de la circulación sanguínea. En humanos el principal glucocorticoide es el cortisol, mientras que en distintos animales de experimentación, como la rata, el ratón, o los pollos, es la corticosterona

El cortisol, reúne casi el 95% de la actividad glucocorticoide, aunque también posee una actividad mineralocorticoide mínima (Webster, *et al* 2002).

1.4.1. Receptores de los Glucocorticoides

Existen dos tipos de receptores para los glucocorticoides, uno de alta afinidad llamado receptor de mineralocorticoides (MR) o tipo I. Esta clase de receptor se encuentra mayoritariamente en las acciones del eje HHA. El otro tipo de receptor es el llamado receptor glucocorticoide (GR) o tipo II. Este receptor GR tiene una afinidad por la corticosterona entre 6 y 10 veces menor que el receptor MR, por lo que solo es ocupado en situaciones en las que aumentan mucho los niveles de glucocorticoides, como ocurre en una situación de estrés (Gómez *et al.* 2007).

1.5. Estrés y sistema inmunológico

El sistema nervioso autónomo en su división simpática es otro efector de la respuesta al estrés. La exposición del organismo a condiciones adversas genera activación de las neuronas preganglionares simpáticas y liberación de noradrenalina por las neuronas posganglionares simpáticas. Asimismo, la activación simpática estimula a las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales a que secreten adrenalina al torrente sanguíneo. La adrenalina aumenta las tasas cardíaca y respiratoria y el flujo sanguíneo a los músculos. Ambos tipos hormonales, glucocorticoides y catecolaminas, liberados durante la exposición del organismo al estrés, ejercen funciones inmunomoduladoras, con lo que contribuyen a regular el funcionamiento del tercer efector de la respuesta al estrés, el sistema inmunológico.

Los principales mediadores de los efectos inmunomoduladores del estrés, glucocorticoides y las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, ejercen influencia directa sobre el funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a sus receptores específicos, localizados en el citoplasma y membrana celular, respectivamente; y también ejercen efectos indirectos al alterar la producción de citocinas como la IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, todas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias. Los órganos linfoides primarios y secundarios, así como los siguientes tipos celulares: linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y macrófagos, poseen receptores tipo II-glucocorticoide para las hormonas corticoesteroides.

Los glucocorticoides, al acoplarse a sus receptores citoplásmicos en las células del sistema inmune, se traslocan al núcleo y funcionan como factores de la transcripción para numerosas proteínas sintetizadas por linfocitos, macrófagos y otros tipos celulares del sistema inmune; entre las proteínas, cuyos genes poseen elementos de respuesta a los glucocorticoides, se encuentran las citocinas y los receptores y antígenos de superficie de las células inmunológicas.

Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina modulan el funcionamiento del sistema inmune a través de sus receptores β localizados en todos los órganos inmunes y en los linfocitos T y B, las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), los monocitos y macrófagos. El sistema nervioso autónomo, en su división simpática, inerva la red vascular y parénquima de los órganos linfoides primarios, como la médula ósea y el timo, y

también inerva a los órganos linfoides secundarios, el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a la mucosa pulmonar y al intestino. Las fibras del sistema nervioso simpático arborizan dentro de compartimentos específicos en los órganos linfáticos, en la vaina periarteriolar linfática y seno marginal de la pulpa blanca del bazo y en los cordones medulares, corteza y paracorteza de los ganglios linfáticos; y establecen contactos, similares a sinapsis neurona-neurona, con células inmunes como linfocitos T, granulocitos, macrófagos y NK. La inervación simpática de los órganos del sistema inmune promueve la maduración y movilización de los linfocitos, timocitos, células asesinas naturales y granulocitos en condiciones normales y durante infección del organismo (Gómez y Escobar 2006).

1.6. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

Dentro del sistema inmunitario es posible distinguir una serie de compartimentos distintos desde el punto de vista anatómico, cada uno de los cuales está adaptado en general para generar una respuesta a antígenos encontrados en un grupo particular de tejido.

El tejido linfoide asociado a mucosas más comúnmente conocido como MALT por sus siglas en inglés: mucosa-associated lymphoid tissue, es un conjunto de tejidos, similares que se encuentran representados en órganos conformados por superficies mucosas (Murphy *et al.* 2008).

El tejido linfoide asociado a las mucosas representa un sistema altamente compartimentalizado que funciona independientemente del aparato inmune sistémico, incluye el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), al tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) y el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT).

Está constituido por formaciones o microcompartimentos linfoides como:

- placas de Peyer en intestino delgado
- Apéndice
- Folicúlos asociados en el intestino grueso
- Amígdalas
- Gran número de acumulaciones difusas de células linfoides en el parénquima de órganos mucosos y glándulas exóticas (Rabinovich 2004).

Desde el punto de vista fisiológico, y la magnitud de la exposición a antígenos, el sistema inmunitario de las mucosas forma la parte de mayor tamaño de los tejidos inmunitarios del organismo; contiene casi tres cuartas partes de los linfocitos, y produce casi toda la inmunoglobulina en individuos sanos. En comparación con los ganglios linfáticos y el bazo, el sistema inmunitario de las mucosas tiene muchas características diferenciales como:

Cuadro 1. Características MALT (Tomado de Murphy et al 2008)	
Características anatómicas	○ Interacciones íntimas entre epitelios de mucosas y tejidos linfoides.
	○ Compartimentos separados de tejido linfoide difuso y estructuras más organizadas, como placas de Peyer, folículos linfoides aislados y amígdalas.
	○ Mecanismos especializados para la captación de antígenos, como células M en placas de Peyer, adenoides y amígdalas.
Mecanismos efectores	○ Las células T activadas/ de memoria predominan incluso en ausencia de infección.
	○ Células T efectoras/ reguladas “naturales” activadas de manera inespecífica presentes.
Ambiente inmunorregulador	○ Predomina la regulación descendente activa de respuestas inmunitarias (p.ej., a alimentos y otros antígenos inocuos).
	○ Macrófagos inhibidores y células dendríticas inductoras de tolerancia.

El sistema inmunológico de mucosas es un elemento esencial para la inducción y mantenimiento de una apropiada respuesta inmune en las mucosas, está constituida, por sitios inductores y sitios efectores, donde los antígenos son captados, procesados y subsecuentemente representados a células inmunocompetentes de las mucosas, resultando en una producción de IgA secretora (SIgA) en los sitios efectores (Bellanti *et al.* 2008).

1.7. Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)

El intestino se halla expuesto constantemente a una elevada carga antigénica procedente de la dieta y de bacterias comensales. El GALT constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario y es capaz de discriminar de forma eficaz entre patógenos invasivos y antígenos inocuos. El conocimiento de su particular subdivisión en tejidos organizados, como sitios inductores de la respuesta inmunitaria (placas de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos), y tejido difuso, efector de la respuesta inmunitaria (linfocitos intraepiteliales

y linfocitos de lámina propia), nos permite comprender cómo se desarrolla y regula la respuesta inmunitaria en el intestino (Puig y Pérez 2008).

El GALT está formado por cúmulos de linfocitos en diferentes sitios del aparato digestivo como las placas de Peyer (PP) en intestino delgado, que son sitios inductores de linfocitos T y B. Se ha descrito una estructura equivalente en su composición y arquitectura a las PP en intestino grueso: los folículos linfoides solitarios, que son mucho más pequeños que las PP, pues miden aproximadamente 200mm, en comparación a las PP de 3mm de diámetro, sin embargo, al igual que las PP se relacionan con el epitelio asociado a folículos y con grandes áreas de linfocitos B que incluyen centros germinales donde se lleva a cabo la proliferación clonal de los linfocitos B y aunque no posee regiones interfoliculares ricas en linfocitos T, estos últimos si están presentes. Esto sugiere que los folículos linfoides solitarios son sitios alternativos de inducción de respuestas inmunológicas de mucosas (Bellanti *et al.* 2008).

1.8. Sitios inductores y efectores

En la mucosa gastrointestinal existen sitios especiales para la estimulación de la respuesta inmune, llamados sitios inductores, y otros en donde se desarrolla la función inmune, denominados sitios efectores.

Las PP intestinales son los sitios inductores reconocidos del GALT. En el epitelio de esas placas existen células especializadas (células M) que se encargan de “muestrear” el contenido del tracto intestinal. Por debajo de ese epitelio se encuentran abundantes células dendríticas (DC), con capacidad fagocítica, que expresan en su superficie moléculas especiales, denominadas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II), que las capacita como células presentadoras de antígeno (APC). Después de captar los antígenos, esas células los procesan intracelularmente y migran hacia el interior de las PP para interactuar con los linfocitos T (células inductoras de la respuesta inmune) presentándoles esos antígenos, ya procesados en la molécula MHC-II, para iniciar la respuesta inmune. Una vez realizada la activación, los linfocitos T y los B (productores de los anticuerpos), específicos contra el antígeno (Ag), proliferan y abandonan el sitio inductor a través de la linfa llegando a los ganglios linfáticos regionales (mesentéricos). De

ahí viajan a través de la sangre y llegan a las otras mucosas del organismo que les permitirán alcanzar sitios lejanos como la glándula mamaria y los tractos respiratorio y genitourinario.

Finalmente, la mayoría de esas células llegan a la lámina propia (LP) intestinal a través de este mecanismo de recirculación de células, conocido como ecotaxia (homing), mediado por moléculas que se expresan en la superficie de los linfocitos mucosales y el endotelio alto de las vénulas sanguíneas de las mucosas. Las células activadas llegan a las mucosas para su diferenciación final y se convierten en células efectoras, ya sea células plasmáticas productoras de anticuerpos en el caso de los linfocitos B o células productoras de citocinas en el caso de los linfocitos T. Los lugares de la mucosa que alojan a las células efectoras y las de memoria se denominan sitios efectores. La LP en el tracto gastrointestinal son los sitios efectores reconocidos de estas mucosas. Ya que las células de memoria también se alojan en estos sitios, se les considera los lugares de recapitulación de la experiencia inmune del organismo; también se les ha llamado órganos linfáticos terciarios (Vega, 2001).

2.0. Anatomía del sistema inmune en mucosas

La descripción anatómica del sistema inmune de las mucosas es un paso preliminar para la elucidación de su fisiología. Los estudios in vivo realizados en la mucosa intestinal han sido abundantes y detallados. Sin embargo, la descripción de la organización de las células del sistema inmune en la mucosa ha sido relativamente reciente.

Las células del sistema inmune se organizan en nichos particulares, lo que indica que la estructura está directamente relacionada con la función. Existen cuatro compartimientos principales en la mucosa intestinal: el epitelio, la LP de las vellosidades y de las criptas, y la submucosa. En cada uno de ellos se alojan varios tipos de células de manera característica. En el epitelio es posible detectar una gran cantidad de linfocitos, llamados por esta razón intraepiteliales (IEL).

En la zona de la membrana basal del epitelio del intestino delgado se encuentran DC que expresan fuertemente la molécula MHC-II y linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos), que también podrían generar una respuesta inmune contra células infectadas intracelularmente.

Un poco más adentro de la LP de las vellosidades se encuentran principalmente los linfocitos T CD4⁺ (cooperadores) que, al activarse con el antígeno presentado por las DC, secretan citocinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, que producen anticuerpos de isotipo IgA principalmente. Las vellosidades constituyen la zona de absorción del intestino, así que la presencia de todo el equipo inmune para reconocer antígenos, parece lógica y oportuna. En cambio, en las criptas intestinales se tiene la zona secretora de agua y enzimas para la digestión y es ahí donde se encuentra un gran número de células plasmáticas (PC) productoras de anticuerpos (Abs), que son secretados a la luz intestinal. Finalmente, en la submucosa intestinal hay mastocitos y DC en número variable que podrían tener un papel en el eje neuroinmunoendocrinológico (Vega, 2001).

2.1. IgA secretoria y sistema inmunitario de mucosas

La clase dominante de anticuerpo en el sistema inmunitario de mucosas es la IgA, que produce las CP presentes en la pared mucosa, en forma local. Esta clase de anticuerpo se encuentra en seres humanos en dos formas isotípicas, IgA₁ e IgA₂. La naturaleza de la IgA difiere entre los dos compartimentos principales en los cuales se encuentra: la sangre y las secreciones mucosas. En la sangre, la IgA se encuentra principalmente como un monómero, y se produce en la médula ósea por CP derivadas de células B que se han activado en ganglios linfáticos; la proporción entre IgA₁ e IgA₂ de la sangre es de casi 10:1. En los tejidos mucosos, la IgA se produce de modo casi exclusivo como un dímero enlazado por una cadena J, y la proporción entre IgA₁ e IgA₂ en mucosas es de alrededor de 3:2. Cada día se producen casi 5g de IgA en los tejidos de mucosas de seres humanos, una cantidad que excede en forma considerable la producción de todas las otras clases de inmunoglobulinas en el cuerpo.

Las células B indiferenciadas precursoras de las células plasmáticas secretoras de IgA se activan en PP y en los ganglios linfáticos mesentéricos, el cambio de clase de linfocitos B indiferenciados hacia producción de IgA ocurre bajo el control de la citocinas en los tejidos linfoides organizados del GALT usando los mismos mecanismos moleculares que en ganglios linfáticos y en el bazo.

Posterior a la activación y diferenciación de células B, los linfocitos resultantes expresan la integrina de señal de dirección hacia mucosas. Los linfocitos que llegan a la LP

son distribuidos en diferentes compartimentos. Las CP permanecen en la LP donde finalizan su maduración en células plasmáticas productoras de IgA. Mientras que los linfocitos T CD4⁺ permanecen a lo largo de las vellosidades y las criptas; y los linfocitos T CD8⁺ migran al epitelio, convirtiéndose en los linfocitos intraepiteliales. Ambas poblaciones linfocíticas se mantienen como células de memoria (Puig, 2008).

Por lo tanto, la IgA se produce principalmente en la LP en respuesta a la activación de los linfocitos T en las PP, cuya finalidad es alcanzar la circulación, donde puede interactuar con el sistema fagocítico mononuclear. La producción de IgA está regulada por citocinas como IL-5, IL-6 e IL-10 que favorecen la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de IgA. (Puig, 2008 y Robinson 2001).

Una vez en la lámina propia las células plasmáticas sintetizan y secretan dímeros de IgA enlazados a cadena J intactos hacia el espacio subepitelial. Para alcanzar sus antígenos blanco en la luz del intestino, la IgA tiene que transportarse 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 polimérico (pIgR) sobre sus superficies basolaterales, el cual tiene una alta afinidad por inmunoglobulinas poliméricas enlazadas a cadena J (como IgA dimerica), y transporta al anticuerpo mediante trancitosis hacia la superficie luminal del epitelio, donde es liberado por división proteolítica del dominio extracelular del receptor pIgR, como se observa en la figura 2. Parte del receptor dividido permanece asociado con la IgA y se conoce como componente secretorio (SC). El anticuerpo secretado ahora es nombrado IgA secretora (Murphy *et al.* 2008).

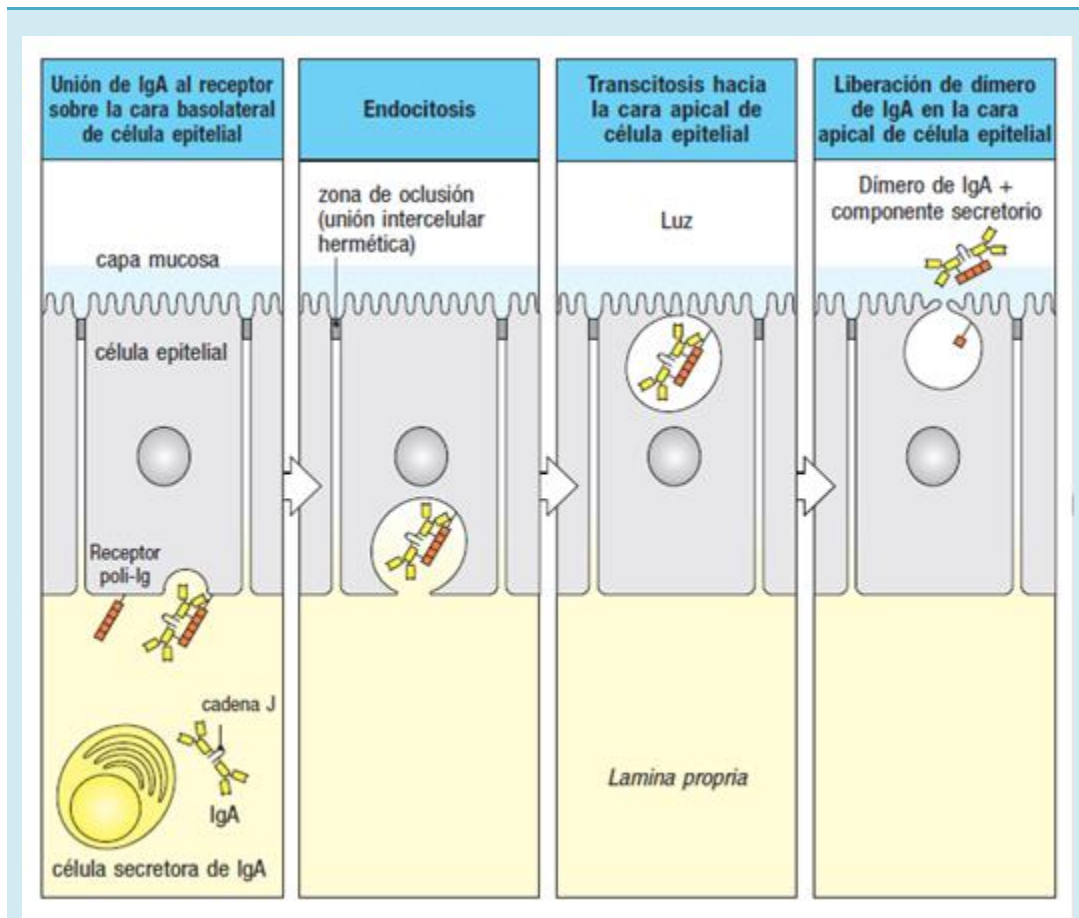


Figura 2. Transcitosis de IgA. La transcitosis de anticuerpos IgA a través de epitelios está mediada por el receptor pIgR, una proteína de transporte especializada. Casi todo el anticuerpo IgA se sintetiza en células plasmáticas que yacen justo por debajo de las membranas basales epiteliales del intestino. El dímero de IgA unido a una cadena J se difunde a través de la membrana basal y es unido por el receptor IgRp en la superficie basolateral de la célula epitelial. El complejo unido es transportado mediante transcitosis en una vesícula a través de la célula hacia la superficie apical, donde el receptor IgRp se divide para abandonar el componente de unión a la IgA extracelular unido a la molécula de IgA como el llamado componente secretorio. El carbohidrato en el componente secretorio se une a mucinas en el moco y mantiene la IgA en la superficie epitelial. El fragmento residual del receptor IgRp no es funcional y se degrada. IgA es transportada a través de epitelios de este modo hacia la luz de varios órganos que están en contacto con el ambiente externo (Tomado de Murphy et al 2008).

2.2. Citocinas

Las citocinas son proteínas secretadas por células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que median muchas de las funciones de las células. Las citocinas se producen en respuesta a los microorganismos y a otros antígenos, y diferentes citocinas estimulan diferentes respuestas en las células que participan en la inmunidad y la inflamación. En la fase de activación de las respuestas inmunitarias adaptativas, las citocinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de linfocitos, y en las fases efectoras de la inmunidad innata y adaptativa activan a diferentes células efectoras para que eliminen los microorganismos u otros antígenos.

En los sitios inductores como el GALT, estas citocinas se encargan de mediar el cambio de isotipo de anticuerpos, mientras que a nivel de los sitios efectoras (PP), se encargan de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Así también, los factores que favorecen la liberación de IgA a nivel intestinal son el TGF- β , que media el cambio de isotipo o clase de inmunoglobulina A durante el desarrollo y la activación de los linfocitos B. La IL-6, que estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos. La IL-5, que estimula la síntesis de IgA y proliferación de linfocitos B. La IL-10 que actúa como supresor de la respuesta innata, inhibiendo macrófagos y células dendríticas activadas. La IL-4 que es el principal estímulo para el desarrollo de la subpoblación Th2 a partir de CD4⁺. El factor de necrosis tumoral (TNF- α), induce la liberación del componente secretor que protegerá a las moléculas dimericas de IgA a nivel intestinal. (Abbas 2009).

CITOCINA	EFFECTOS
Interleucina-4	Linfocitos B: cambio de isotipo a IgE Linfocitos T: diferenciación y proliferación de Th2.
Interleucina-5	Eosinófilos: activación, aumento de la producción Linfocitos B: Proliferación y síntesis de IgA.
Interleucina-6	Linfocitos B: proliferación de los linfocitos productores de anticuerpos
Interleucina-10	Inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas.
Cuadro 2. Citocinas y sus efectos (Tomado de Abbas 2009).	

En presencia de un estímulo estresante, se elevan los niveles circulantes de las citocinas proinflamatorias: TNF- α y el IFN- β además de IL-6, pero existirán bajas cantidades de IL-4 e IL-10. En general, las citocinas son glicoproteínas que se generan en diferentes células del organismo, incluyendo el tejido nervioso. Una de las fuentes principales de las citocinas son los linfocitos T CD4⁺ o linfocitos cooperadores (Th). Estos linfocitos secretan diferentes citocinas y dependiendo de su tipo, se clasifican en Th1 o Th2. Las citocinas proinflamatorias se caracterizan por una respuesta tipo Th1, entre las que se encuentran la IL-1, IL-2 e IL-12 el TNF- β y el IFN- α . Mientras que, 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 se desarrolle (Rengarajan, 2000).

2.3. Intestino Grueso

2.3.1. Fisiología

El colon sirve como un reservorio para los residuos de los alimentos que no pueden digerirse o absorberse. Asimismo, la motilidad de este segmento disminuye su velocidad para permitir que el colon absorba agua, Na⁺ y otros minerales. Al absorber casi 90% del líquido, convierte los 1 000 a 2 000 ml de quimo isotónico que entran en el colon cada día desde el íleon en casi 200 a 250 ml de heces semisólidas. Las bacterias desempeñan una función fundamental en la fisiología del colon metabolizan la bilirrubina, derivada de la descomposición de la hemoglobina, también producen cantidades significativas de vitamina k, y digieren la mucina y la pequeña cantidad de carbohidratos y proteínas que queda en colon (Silverthorn, 2008).

2.3.2. Anatomía

El intestino grueso es la porción terminal del tracto gastrointestinal, es de longitud variable, con un promedio aproximado de 1.5 m de largo y 6.5 cm de diámetro. Se extiende desde el íleon hasta el ano y está unido al intestino delgado por la válvula ileocecal. Esta fija a la pared abdominal posterior por su mesocolon, que es una capa doble del peritoneo. Las diferencias anatómicas entre el intestino delgado y grueso incluyen la presencia de tres características: las tenías cólicas, las haustras y los apéndices epiploicos.

Estructuralmente las regiones principales del intestino grueso son el ciego, el colon, el recto y el canal anal.

El colon se divide en porciones ascendente, trasversal, descendente y sigmoidea.

- 1- El colon ascendente se sitúa en posición vertical derecha del abdomen y llega hasta el borde inferior del hígado.
- 2- El colon transverso es la porción más grande y más móvil del intestino grueso, atraviesa el abdomen desde el ángulo cólico derecho hasta el ángulo cólico izquierdo.
- 3- El colon descendente se encuentra del lado izquierdo del abdomen en dirección vertical, y se extiende por debajo del abdomen hasta el nivel de la cresta ileaca.
- 4- Colon sigmoideos, caracterizado por su asa en forma de S de longitud variable, une el colon descendente con el recto. En general, el colon sigmoideo tiene un mesenterio largo y, por tanto, posee una libertad de movimiento considerable.

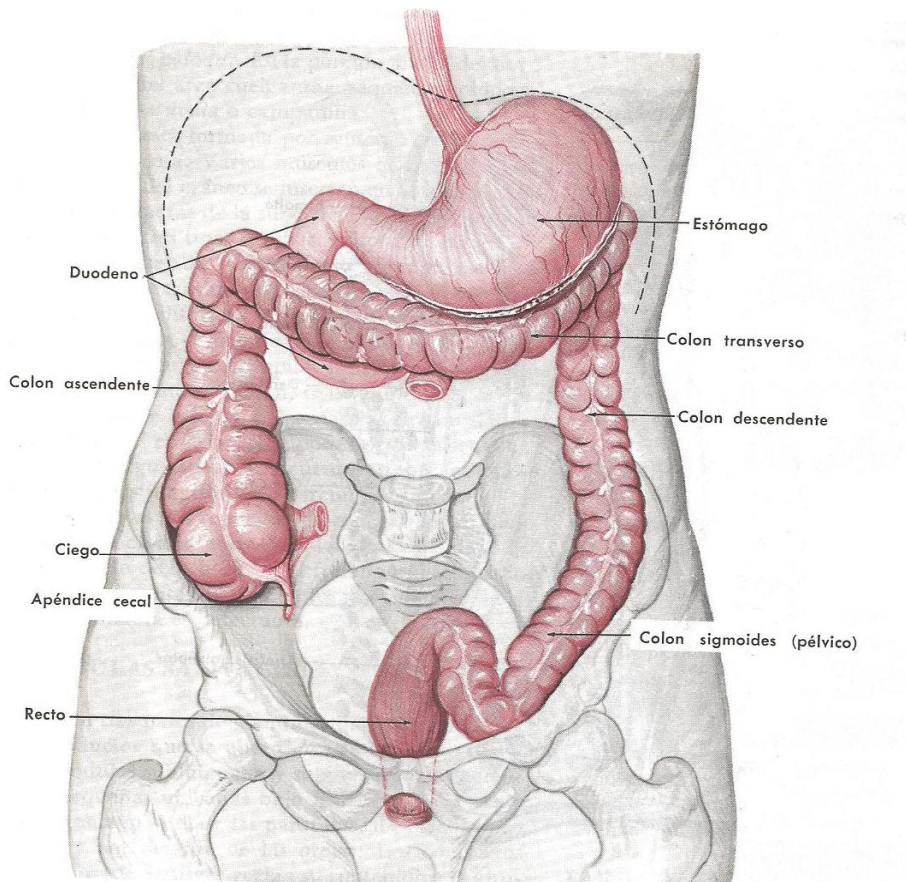


Figura 3. Vista anterior del intestino grueso que muestra las regiones principales (Tomado de Tortora y Derrickson 2007).

La pared del intestino grueso contiene las cuatro tunicas o capas presentes en el resto del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa consiste en un epitelio cilíndrico simple, la lámina propia (tejido conectivo aerolar) y musculo liso. El epitelio contiene en su mayor parte células absortivas y células caliciformes. Las células absortivas participan principalmente en la absorción del agua y constituyen la mayor parte de los elementos celulares del epitelio superficial. Su superficie estriada está formada, al igual que en intestino delgado, por microvellosidades, estas son más cortas y menos numerosas. En las células epiteliales glandulares su longitud es aún menor, y su disposición es más irregular, Las células caliciformes secretan moco que lubrica el paso del contenido cólico, este moco está constituido por glicoproteínas, sialomucinas y mucopolisacaridos sulfatados, estos últimos más abundantes en el epitelio superficial que en las glándulas. En el epitelio superficial las células caliciformes se intercalan entre las epiteliales y constituyen la mayor parte de los elementos celulares de las glándulas.

Tanto las células absortivas como las caliciformes se localizan en glándulas intestinales largas, rectas y tubulares (criptas de Lieberkühn) que se extienden por todo el espesor de la mucosa; estas glándulas son más largas que en el intestino delgado. Se pueden observar ganglios linfáticos solitarios en la lámina propia que se extienden a través de la muscularis mucosae hasta la submucosa. En comparación con el intestino delgado, la mucosa del intestino grueso no tiene tantas adaptaciones estructurales que incrementen el área de superficie. No hay pliegues circulares ni vellosidades; aunque las microvellosidades de las células absortivas están presentes (Tortora y Derrickson 2007).

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

Trabajos previos han demostrado que el estrés agudo inducido por inmovilización aumenta los niveles intestinales de IgA, así como las poblaciones de linfocitos intraepiteliales de la mucosa del intestino en ratones BALB/c. (Sollind *et al.* 1987).

En 2009 se estudió el efecto del estrés inducido por inmovilización en la producción basal de IgA en el intestino delgado de ratones BALB/c, demostrando que el estrés agudo incrementa los niveles intestinales de IgA y las poblaciones de linfocitos B en el segmento proximal y distal del intestino delgado (Chávez, 2009).

Reyna-Garfias en 2010; evaluó el estrés crónico inducido por restricción de movimiento de 3 horas por 7 días en ratas Wistar, reportando que el grupo sometido a estrés, mostraba un aumento de SIgA.

En 2012 Drago- Serrano demostró que en condiciones de estrés continuo, no solo se origina una sobreestimulación en la producción de SIgA, sino también en el porcentaje de células plasmáticas en la región distal y proximal del intestino delgado y también un aumento en la expresión de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TGF- β .

Finalmente en 2014 antecedentes de nuestro grupo de investigación han demostrado que el protocolo de estrés agudo por restricción de movimiento durante una hora, incrementa los niveles de corticosterona, así como las concentraciones de SIgA en líquido intestinal. Con respecto a las poblaciones celulares se encontró un aumento en el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas positivas para IgA (Martínez- Reculez 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios han demostrado la asociación del estrés y el sistema inmune en el desarrollo de enfermedades alérgicas, inflamatorias, infecciosas y autoinmunes, sin embargo poco se sabe sobre el efecto del estrés agudo sobre la respuesta inmune humoral y celular a nivel de la mucosa del intestino grueso.

Es necesario estudiar estas respuestas biológicas para lograr comprender los mecanismos fisiopatológicos a través de los cuales se desarrollan estas enfermedades y proponer nuevas estrategias preventivas y terapéuticas.

IV. HIPOTESIS

El estrés agudo inducido por restricción de movimiento incrementa la secreción de IgA en intestino grueso de ratones BALB/c

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El estrés agudo inducido por restricción de movimiento aumenta la secreción de IgA en intestino grueso de ratones BALB/c?

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés agudo sobre la secreción basal de IgA en intestino grueso de ratones BALB/c.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles séricos de corticosterona en ratones sometidos a estrés agudo.
- Determinar si el estrés agudo modifica los niveles de IgA en intestino grueso de ratones BALB/c.
- Analizar si el estrés agudo modifica las poblaciones de linfocitos B y T (CD8⁺ y CD4⁺).
- Analizar el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA en ratones sometidos a estrés agudo
- Analizar el porcentaje de citocinas intracelulares (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10).

VIII. MATERIALES Y METODOS

1.0. Animales y grupos de Experimentación

Se utilizaron ratones machos, cepa BALB/c, de 8 a 10 semanas de edad con un peso de 25 a 30g; proporcionados por el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. El manejo de los animales se realizó en conformidad con las regulaciones federales de México para la atención y experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999, Secretaria de agricultura, Ciudad de México, México) y aprobado por el comité institucional de uso y cuidado animal de la ESM-IPN.

Se establecieron dos grupos de 5 ratones elegidos aleatoriamente. El primer grupo fue conformado por ratones libres de estrés, al que se le denominó grupo control y el segundo grupo fue sometido a un protocolo de estrés agudo.

Ambos grupos se mantuvieron en cajas de plástico con flujo laminar, aislados de ruido, sin variaciones de temperatura, en ciclos de luz- oscuridad de 12: 12h y con alimento a libre demanda hasta el momento de su sacrificio.

1.1. Protocolo de Estrés Agudo

El protocolo de estrés agudo por inmovilización consistió, en la fijación de las cuatro extremidades y la cola del ratón sobre una superficie plana durante una hora.

1.2. Obtención de Muestras

1.2.1. Plasma y suero para cuantificación de corticosterona por RIA

Una vez concluido el protocolo de estrés, ambos grupos fueron sacrificados en una cámara de éter y el grupo problema se sacrificó al concluir el periodo de estrés. Se obtuvo aproximadamente 1ml de sangre, vía punción cardíaca. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 6 minutos. El suero fue recuperado y almacenado en alícuotas de aproximadamente 100µl a -20°C hasta el momento de su análisis para la determinación de corticosterona.

1.2.2. Líquidos intestinales

Se realizaron lavados intestinales con 5ml de PBS-1X, por medio de una cánula, la cual se introdujo en uno de los polos del intestino grueso. El volumen se transfirió a un tubo cónico de 15ml y se le adicionaron 200 μ l de inhibidor de proteasas (COMPLETE). Durante todo el proceso los líquidos intestinales se mantuvieron a -4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 4500rpm durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron 3 alícuotas de 1ml por intestino y se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su análisis para la determinación de la SIgA por la técnica de ELISA.

1.2.3. Obtención de Células Epiteliales

Posterior a su lavado con PBS-1X el intestino grueso se evertió en un medio de cultivo con RPMI (GIBCO), Suero Fetal Bovino, dithiothreitol (DTT, AMRESCO) 1mM, Colagenasa 60/mL y antibiótico). Esta solución se incubó a 37°C a baño maría en agitación constante durante 30 minutos.

Al finalizar la incubación el intestino se disgregó con el embolo de una jeringa para desprender las células epiteliales. Esta suspensión celular fue filtrada a través de una malla de organiza en un tubo cónico de 15ml y centrifugada a 1500rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 10ml de RPMI-1X para filtrarla y centrifugarla bajo las mismas condiciones. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en 5ml de Percoll al 20%, esta suspensión se transfirió a 5ml de percoll al 40% con la finalidad de formar un gradiente (40:20). Los tubos con percoll fueron centrifugados a 2500rpm durante 25 minutos a 4°C con 0 de aceleración y 0 de desaceleración. Se recuperaron las células epiteliales obtenidas en la interface, se realizó un lavado con 10ml de RPMI-1X (pH 7.3) y se centrifugaron a 1500 rpm, durante 10 minutos a 4°C para eliminar el excedente de percoll.

1.3. Microbradford

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por la técnica de microbradford (Bradford 1976), esta se realizó en placas de cultivo de 96 pozos.

Se estableció previamente una curva patrón, teniendo una solución madre con $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina sérica bovina (BSA) diluida en un buffer de fosfatos (PBS).

Se colocó en el primer pozo $10\mu\text{l}$ de la solución madre (BSA) y $310\mu\text{l}$ de PBS, para completar $320\mu\text{l}$, en los siguientes 5 pozos (2 a 6) se colocaron $160\mu\text{l}$ de PBS. A partir del primer pozo se hicieron diluciones seriadas dobles hasta llegar al sexto pozo, teniendo un volumen final de $160\mu\text{l}$ por cada pozo, con: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y $0.056\mu\text{g}$ de BSA. En el séptimo pozo se agregaron $160\mu\text{l}$ de PBS, como blanco, todo esto se realizó por triplicado.

Se agregaron $40\mu\text{l}$ de reactivo de Bradford 5X (Azul de Coomassie G-250, Etanol absoluto, Acido Ortofosforico 85% y agua destilada) en cada pozo homogenizando la muestra.

Posteriormente la lectura se obtuvo a una absorbancia de 595 nm en un lector de ELISA. Se graficó las absorbancias contra la concentración en Excel para formar la curva patrón. Para las muestras control y problema se utilizaron diluciones 1:10, se tomaron $10\mu\text{l}$ de estas diluciones y se adiciono $150\mu\text{l}$ de PBS y $40\mu\text{L}$ de reactivo de Bradford. En el último pozo se añadió el blanco agregando $160\mu\text{l}$ de PBS y $40\mu\text{l}$ de Bradford. Todas las muestras se realizaron por triplicado. La absorbancia se obtuvo en un lector de ELISA a 595nm.

Con los resultados obtenidos se hizo una regresión lineal en Excel y se interpolaron los datos con la curva patrón de BSA previamente graficada, para obtener la concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas en las muestras.

1.4. Cuantificación de IgA por método de ELISA

La técnica de ELISA se realizó en una placa de cultivo de 96 pozos. La placa se cubrió con un buffer de carbonatos y α -IgA de mieloma de ratón a una concentración de 1:100, se adicionaron 100 μ l de esta dilución por pozo y se mantuvo en refrigeración a 4°C durante 24 horas. Una vez encubado el primer anticuerpo en la placa, se realizaron 6 lavados. 3 con PBS Tween y 3 con PBS 1x (intervalos de 2 minutos entre cada lavado), el motivo de los lavado fue para remover el exceso de buffer de carbonatos.

Al finalizar los lavados, se bloqueó la placa con leche (Svelty) al 6% diluida en PBS Tween, se encubo la placa a 37°C durante 2 horas en un horno. Al concluir la incubación, se repitieron los 6 lavados. Cumplido el tiempo de incubación se le adiciono a cada pozo 100 μ l de muestra de líquidos intestinales, previamente obtenidos. Posteriormente la placa se mantuvo en refrigeración a 4°C durante 24 horas.

Después de las 24 horas de incubación se realizaron nuevamente los 6 lavados para remover el exceso de muestra en los pozos. Al concluir los lavados se agregó un segundo anticuerpo α IgA de mieloma peroxidado diluido a 1:5000, cada pozo de la placa se le adiciono 100 μ l de este anticuerpo y se encubo a 37°C durante 2 horas, al terminar la incubación, se lavó la placa nuevamente . Posteriormente se adicionaron 100 μ l a cada pozo de una solución reveladora, la cual se dejó en reacción durante 7 minutos en oscuridad total. Al culminar los 7 minutos se le añadió 50 μ l de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2.5N para detener la reacción y obtener la lectura por medio de un lector de ELISA BIORAD Microplate Reader Benchmark.

1.5. Citometría de flujo

1.5.1. Determinación de linfocitos B y T (CD8+ y CD4+)

Los linfocitos B y T del grupo control y el grupo sometido a estrés agudo se determinaron por citometría de flujo. Todos los ensayos fenotípicos para la caracterización de los linfocitos se realizaron en paralelo. Los linfocitos totales aislados fueron ajustados a una concentración de 1×10^6 células/mL en PBS 1x. Posteriormente se incubaron con 10 μ L de los cocteles de anticuerpos diluidos 1:100 durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Las células se lavaron por centrifugación con 500 μ L de PBS durante 5 min a 3000 rpm y se fijaron con 400 μ L de *p*-formaldehído al 1%, finalmente se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su análisis.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD19/PE (BD Pharmigen, catálogo SC21714), anti- B220/PE (BD Pharmigen, catálogo 553093), anti-CD3+/APC (BD Pharmigen, catálogo 553063), anti-CD4+/PE (BD Pharmigen, catálogo 553052) y anti CD8+/FITC (BD Pharmigen, catálogo 553035). La tinción de las células se llevaron a cabo utilizando el protocolo de tinción intracelular de Beckton Dickinson.

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

1.5.2. Célula plasmática (CD 138+)

Las células fueron ajustadas a una concentración de 1×10^6 células/mL en PBS 1x. Posteriormente se incubaron con 10 μ L de los cocteles de anticuerpos diluidos 1:100 durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Las células se lavaron por centrifugación con 500 μ L de PBS durante 5 min a 3000 rpm y se fijaron con 200 μ L de Citofix (BECTON, número de catálogo 554722) por 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad a 4°. Posteriormente se permeabilizaron con

500µl de Perm/Wash (BECTON, numero de catálogo 51-2091KZ), por 20 minutos a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti- CD138/ APC (BD Pharmigen, catálogo 558626). La tinción de las células se llevaron a cabo utilizando el protocolo de tinción intracelular de Beckton Dickinson.

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

1.6. Detección de citocinas intracelulares: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

La producción de citocinas se midió a través de una tinción intracelular. Se utilizaron tubos Falcon (Becton Dickinson) recubiertos con poliestireno, para incubar los linfocitos del intestino grueso, que se ajustaron 2×10^6 cells/ml, y se estimularon con 25 ng/ml de PMA (Sigma), 1 µg/ml de ionomicina (Sigma) y 10 µg/ml de Brefeldina A (BFA) (Sigma) por 4 h a 37° C y 5% CO₂. Como marcador de superficie celular se utilizó anti-CD4 PerCP que se adicionó (20 µl) a las alícuotas de linfocitos estimulados y no estimulados y se incubaron por 30 min a 4° C en oscuridad. Después de la incubación, las células se centrifugaron por 5 min a 500 *x g* y se aspiraron los sobrenadantes sin remover las pastillas. Posteriormente se les adicionaron 100 µl de solución permeabilizadora (FACS Becton Dickinson) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las suspensiones celulares se lavaron con PBA por centrifugación durante 5 min a 500 *x g*.

Para realizar la tinción intracelular, se adicionaron 10 µl de los anticuerpos monoclonales anti-citocinas y la suspensión celular se incubó a 4°C por 30 min en la oscuridad. Las muestras se lavaron con PBA y se fijaron con 500 µl de p-formaldehído al 1%.

Para realizar el análisis por citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia relativa se midió en un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson San Jose, Ca) equipado con un láser de 15 mW ion-argón y filtros para analizar FITC (530 nm), PE (585 nm) y PerCP (>650nm). Se adquirieron un total de 20,000 eventos y se separaron a partir de la

población de linfocitos CD4⁺. El análisis de la población se realizó utilizando el software CellQuest® (Becton Dickinson). Se midieron las siguientes citocinas: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

1.7. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Sigma Plot versión 11.0. En todos los casos se compararon las medias de los resultados obtenidos entre el grupo control y el grupo estresado.

IX. RESULTADOS

1.0. Niveles de Corticosterona

Se determinaron los niveles de corticosterona en suero en condiciones fisiológicas y de estrés por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

En la gráfica 4 se muestra que el estrés agudo inducido por restricción de movimiento, aumenta significativamente la concentración de corticosterona (39.07 ± 6.78) en comparación con el grupo control (5.483 ± 4.55) ($p < 0.001$).

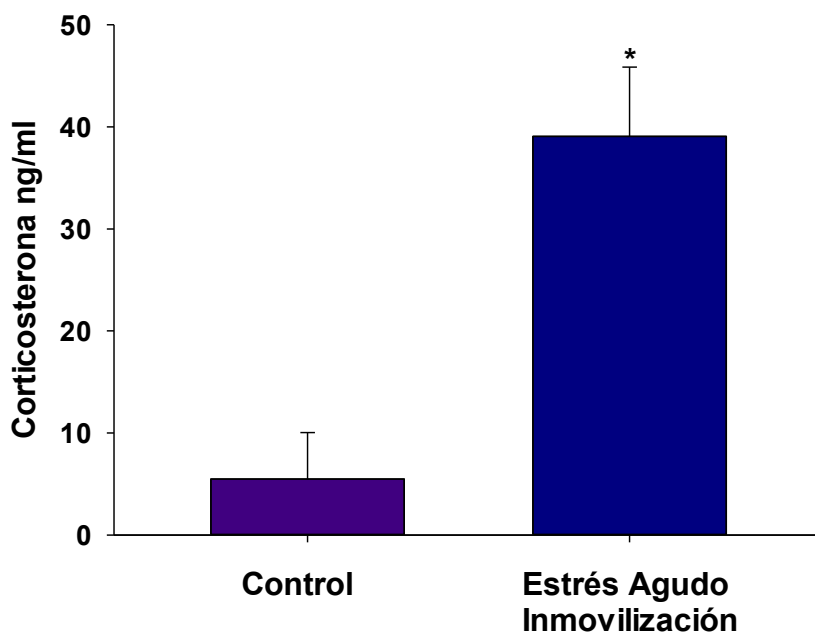


Figura 4. Efecto del estrés agudo sobre los niveles de corticosterona sérica. Se utilizaron ratones BALB/c machos sometidos a estrés agudo inducido por restricción de movimiento por 1 hr. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

1.1. Efecto del estrés agudo sobre la producción de IgA en intestino grueso

Mediante la técnica de ELISA se determinaron los niveles de IgA, con la finalidad de evaluar el efecto del estrés sobre la secreción de IgA a nivel de la mucosa del intestino grueso. Las concentraciones de IgA en el intestino grueso aumentaron significativamente bajo las condiciones de estrés (73.01 ± 2.5) en comparación con el grupo control (9.86 ± 1.5) ($p < 0.001$) (Figura 5).

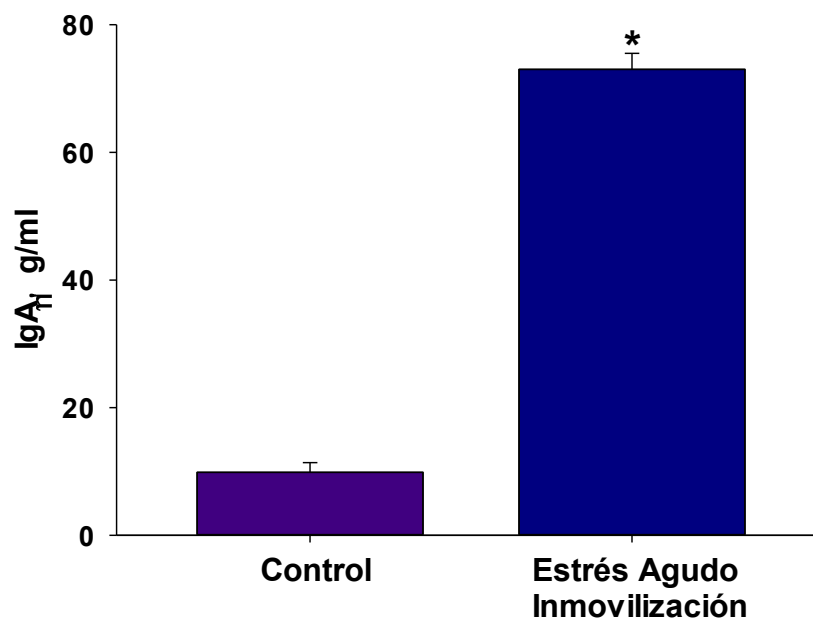


Figura 5. Efecto del estrés agudo sobre la concentración de IgA en intestino grueso. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes entre sí. Los niveles de IgA aumentaron significativamente en los ratones sometidos a estrés en comparación al grupo control ($p < 0.001$).

1.2. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de células plasmáticas en intestino grueso.

El porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA se analizó por citometría de flujo, con la finalidad de determinar si el estrés agudo modifica la secreción de IgA en el intestino grueso. En la figura 6 se muestra la región donde se ubican las células plasmáticas ($CD19^+/CD138^+$) y se observa un aumento en el porcentaje de IgA intracelular por efecto del estrés agudo, respecto al grupo control. En la figura 7 se muestra un aumento en el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA respecto al grupo control

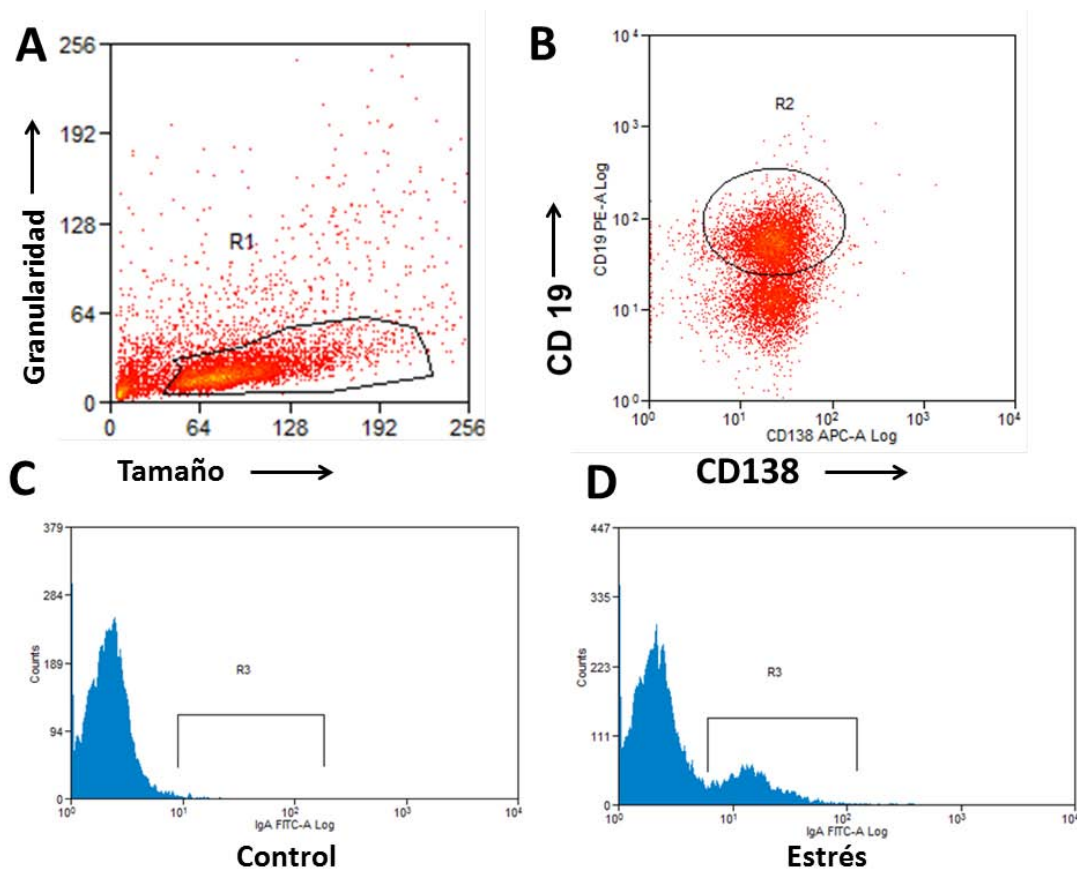


Figura 6. Análisis de células plasmáticas IgA⁺ de la lámina propia del intestino grueso de ratones. Se grafica granularidad y tamaño, y se observa la región R1 que corresponde a los linfocitos (A), a partir de la región R1 se detectaron CD19⁺/CD138⁺ para determinar la región de células plasmáticas (B) y mediante un histograma para IgA⁺ analizar el porcentaje de IgA intracelular por efecto del estrés (D) y del grupo control (C).

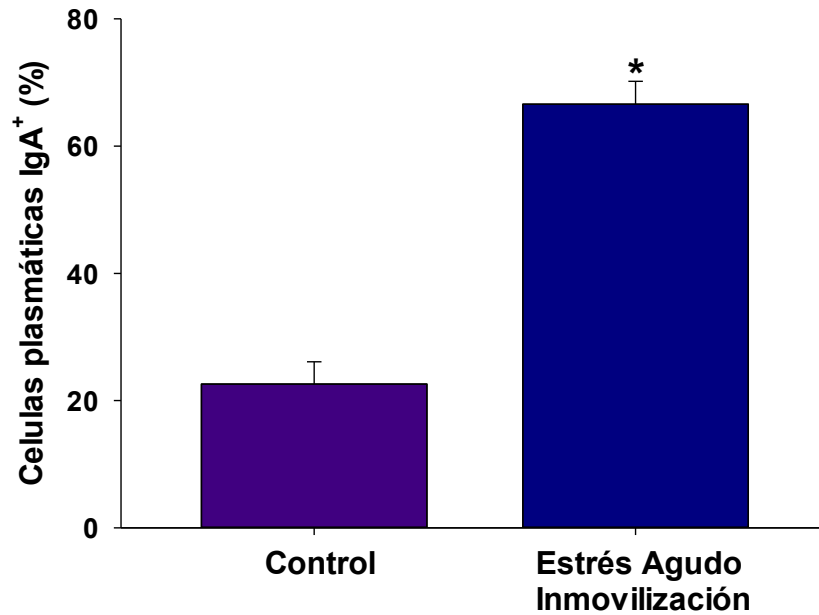


Figura 7. Efecto del estrés agudo sobre la secreción de IgA en intestino grueso. Se realizaron tinciones para determinar células plasmáticas productoras de IgA (CD19/CD138/IgA) por citometría de flujo. Los resultados muestran que bajo condiciones de estrés agudo (66.60 ± 3.6) se incrementa significativamente el porcentaje de células plasmáticas productoras de IgA respecto al grupo control (22.59 ± 3.5). Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

1.3. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de linfocitos B y T (CD8⁺, CD4⁺).

El porcentaje de linfocitos B y T se determinó por citometría de flujo. Los resultados muestran que bajo condiciones de estrés agudo las poblaciones de linfocitos CD4⁺ se incrementaron significativamente (25.76 ± 2.5) respecto al grupo control (18.07 ± 0.5). Por otra parte en las poblaciones de linfocitos CD8⁺ no se observaron diferencias significativas comparando el grupo control y estresado.

Finalmente en el porcentaje de linfocitos B se muestra que en los ratones sometidos a estrés agudo inducido por restricción de movimiento, aumento significativamente el porcentaje de linfocitos B (67.46 ± 2.8) en comparación con los ratones del grupo control (58.65 ± 0.5).

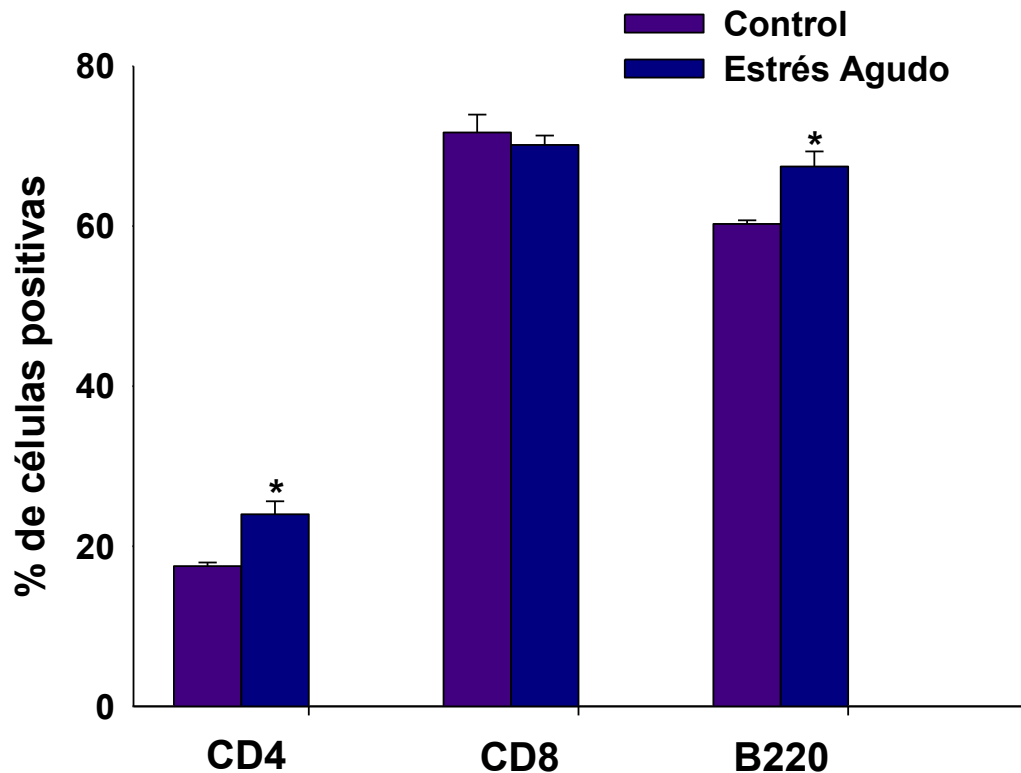


Figura 8. Efecto del estrés agudo sobre las poblaciones de linfocitos B y T de la lámina propia del intestino grueso. Se realizaron tinciones para determinar el fenotipo de linfocitos T y B por citometría de flujo. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. . * $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

1.4. Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el porcentaje de citocinas intracelulares.

Se analizaron las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por citometría de flujo encontrando diferencias significativas en todas respecto al grupo control.

La IL-4 que participa en la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ a Th2, aumento (2.7%±0.05), respecto al grupo control (1.43%±0.05).

La IL-5 (4.76%±0.05) y la IL-6 (4.65%±0.05) que actúan como factores de estimulación para que el linfocito B secrete inmunoglobulinas, también se incrementaron respecto al grupo control: IL-5 (3.81%±0.05) IL-6 (2.74%±0.05%).

Finalmente con respecto a la IL-10, que es una citocina que juega un papel fundamental en la diferenciación de las células plasmáticas, se observó un aumento significativo en su producción en los grupos sometidos a estrés (5.21%±0.05%) en comparación con el grupo control (3.39%±0.05%).

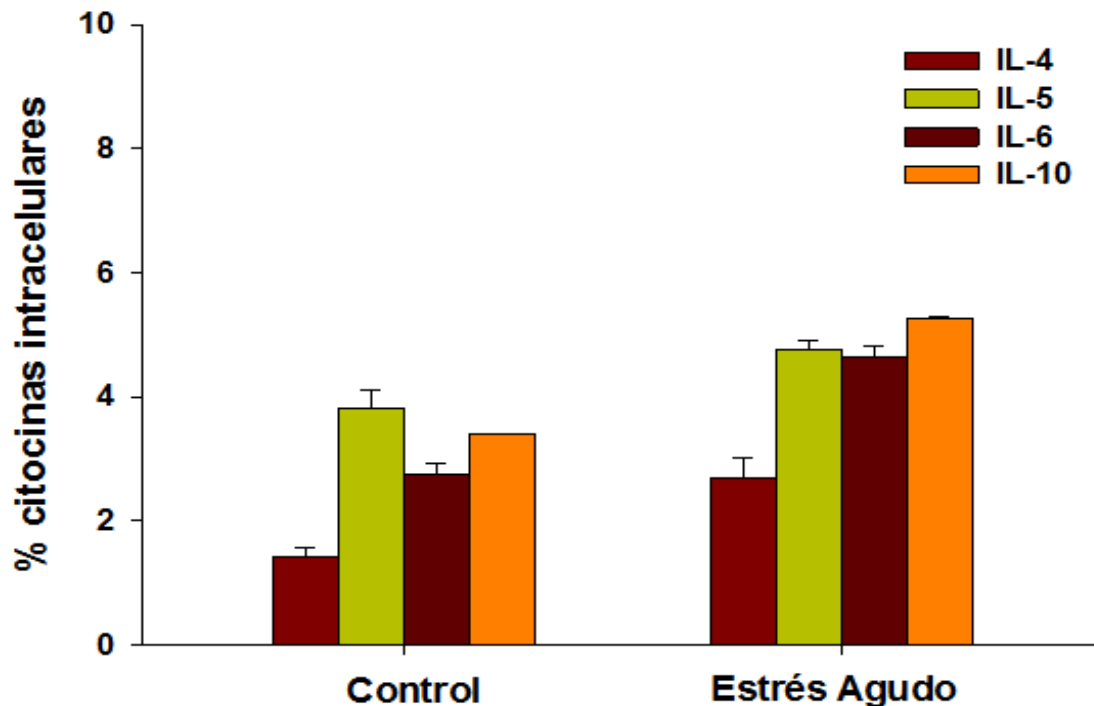


Figura 9. Efecto del estrés agudo sobre el porcentaje de citocinas intracelulares IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Se observa en los resultados obtenidos que existen diferencias significativas respecto al grupo control en todas las citocinas.

X. DISCUSIÓN

En consecuencia al estrés se activan señales neuroendocrinas liberadas por el cerebro que afectan la función inmune. Los dos caminos neuroendocrinos activados en respuesta al estrés que controlan el sistema inmune son el eje hipotálamo- pituitario-adrenal (HPA) que resulta en la liberación de glucocorticoides, y el sistema nervioso simpático (SNS) que resulta en la liberación de catecolaminas (epinefrina y noradrenalina) (Glaser 2005).

Durante las situaciones de estrés la norepinefrina estimula la secreción de IgA, esto aumenta la defensa de las mucosas (Schmidt et al., 2007), mientras que los glucocorticoides influyen en el tránsito de leucocitos y otras células del sistema inmune (Munck *et al.* 1984). En general ambos tienen un rol en la regulación, producción y secreción de IgA en intestino delgado.

Estudios experimentales previos demuestran que el estrés agudo provoca un aumento en los niveles de SIgA en intestino delgado. Existe sin embargo escasa evidencia en la literatura acerca de los efectos del estrés agudo en la producción de IgA en intestino grueso (Corthesy 2007).

Reportes actuales sugieren que las hormonas adrenales (catecolaminas y glucocorticoides) son responsables de los aumentos inducidos en los niveles de IgA en duodeno e íleon en intestino delgado, parece posible que estas hormonas induzcan la producción de IgA por medio de células plasmáticas (Reyna *et al.*, 2010).

El posible rol de los glucocorticoides se ha evidenciado ya que al administrar dosis bajas de corticosterona aumenta significativamente la concentración de SIgA en íleon. Estos resultados muestran que los glucocorticoides modulan la producción de SIgA en secreciones y suero (Griffin y Thomson, 1998).

Los glucocorticoides ejercen influencia directa sobre el funcionamiento de las células inmunes, al acoplarse a sus receptores específicos, localizados en el citoplasma y membrana celular; sin embargo también ejercen efectos sobre la producción de citocinas

necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias.. Los glucocorticoides, al acoplarse a sus receptores citoplásmicos en las células del sistema inmune, se traslocan al núcleo y funcionan como factores de la transcripción para numerosas proteínas sintetizadas por linfocitos, macrófagos y otros tipos celulares del sistema inmune; entre las proteínas, cuyos genes poseen elementos de respuesta a los glucocorticoides, se encuentran las citocinas, los receptores y antígenos de superficie de las células inmunológicas (Gomez y Escobar 2006).

Otro papel de los glucocorticoides es su efecto regulador a través de la apoptosis celular y de la conservación de la integridad del epitelio. (Hoffman-Goetz, 2005).

Se ha reportado que bajo condiciones de estrés agudo se producen cambios en el epitelio intestinal, mediante el incremento en la permeabilidad molecular, favoreciendo de esta forma los niveles de SIgA en el líquido intestinal en modelos de estrés agudo con protocolo de inmovilización (Chávez, 2009; Ramírez, 2009). Además, se ha concluido que dicha permeabilidad intestinal es debida a la existencia de receptores para glucocorticoides ubicados a nivel de las células epiteliales del intestino, donde se lleva a cabo la producción de glucocorticoides (Söderholm, 2001).

El protocolo de estrés agudo inducido por restricción de movimiento usado en el presente estudio encontró efectos sobrerreguladores no solo en la producción de SIgA sino también en el porcentaje de células plasmáticas, este mecanismo de aumento en la producción de células plasmáticas productoras de IgA puede asociarse al homing de los linfocitos B intestinales por mecanismos adrenérgicos (Kruger *et al* 2008).

Otro factor determinante para el aumento en los niveles de IgA son las citocinas: IL-4, IL-6, IL-10. Estas citocinas con carácter antiinflamatorio crean una complicada red de señales con un rol esencial en la regulación de linfocitos B en diferentes estados de maduración (Keatzel et al 2005).

La diferenciación y maduración de linfocitos B a plasmáticas es favorecida por las interleucinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Cerutt, 2008). La IL-4 junto con IL-10 están envueltos en la diferenciación y maduración de precursores de linfocitos B (Suzuki y Fagarasan, 2009). El incremento en la IL-4 es importante para realizar el cambio de linfocito T CD4⁺ a subpoblación Th2 y denota que ante la percepción del agente estresor, se

establecen mecanismos a fin de producir anticuerpos. La IL-10 es importante para la diferenciación del linfocito B y para la permeabilidad celular (Strober *et al.*, 2005). Así mismo la IL-5 estimula la síntesis de IgA y la proliferación de linfocitos B por lo que su aumento coincide con el incremento de células plasmáticas y linfocitos B. Finalmente el aumento en la concentración de IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos ya que actúa como factor de crecimiento de las células plasmáticas.

Por otra parte se ha reportado que bajo efectos inmunoestimulantes como el estrés, aumentan las poblaciones celulares involucradas en la producción de IgA, lo cual se explica en parte por la producción de glucocorticoides, ya que los órganos linfoides primarios y secundarios, así como los linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, monocitos y macrófagos, poseen receptores de esteroides suprarrenales tipo II. Así mismo, existe inervación simpática de los órganos del sistema inmune que promueven la maduración y movilización de linfocitos. (Gómez *et al.*, 2006).

Finalmente, los glucocorticoides y las catecolaminas poseen un papel bimodal en la estimulación de las células inmunes que es importante para mantener el equilibrio ante la respuesta que se ejerza ante un agente estresor y desencadenan la proliferación de poblaciones celulares y en consecuencia un aumento en la concentración de IgA, así como de citocinas relacionadas con su síntesis.

Por último, es fundamental enfatizar que en la respuesta endocrina al estrés participan además otras hormonas, tales como: catecolaminas, prolactina, el glucagón, la arginina vasopresina, la somatostatina, las endorfinas y encefalinas, la oxitocina, la colecistoquinina, la galanina, el péptido intestinal vasoactivo, la angiotensina II y la neurotensina que facilitan la liberación de ACTH (Torres *et al.*, 2006). Las cuales pudieran contribuir a los cambios observados en el presente trabajo.

XI. CONCLUSIÓN

- Los efectos del estrés agudo inducido por restricción de movimiento se validan con el aumento de las concentraciones de corticosterona sérica.
- El HHA activa una respuesta inmunológica, ya que al tener receptores para las hormonas adrenales (glucocorticoides y catecolaminas) las células inmunes, tales como linfocitos T (CD4⁺ y CD8^{*}) y linfocitos B aumentan sus porcentajes por efecto del estrés agudo.
- La producción de IgA intestinal aumento como respuesta al estrés agudo, y probablemente por el aumento en el porcentaje de citocinas intracelulares IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 que estimulan la proliferación de linfocitos B y la síntesis de IgA en la lámina propia del intestino grueso.
- El aumento en el porcentaje de citocinas intracelulares (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) bajo condiciones de estrés puede deberse a la acción indirecta que ejercen sobre los T CD4⁺ las hormonas adrenales alterando su producción.

XII. PERSPECTIVAS

- Medir la concentración de catecolaminas en suero (adrenalina y noradrenalina).
- Analizar el transporte de IgA a través de la expresión de pIgR.
- Determinar la expresión relativa del gen pIgR por RT-PCR.
- Analizar el porcentaje de TGB- β por citometría de flujo.
- Estudiar a fondo los efectos del estrés y los mecanismos de acción en los folículos linfoides solitarios y ganglio mesentérico como sitios inductores de la respuesta inmune en intestino grueso.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Abbas., 2009.** Inmunología Celular y Molecular; Ed: Elsevier Saunders; sexta edición,; cap 1 Propiedades Generales de las Respuestas Inmunitarias, págs: 3-17.
- **Arbo. A., Santos. J.I., 2005.** Las hormonas el sistema inmune y la respuesta a la infección en los últimos 100 años. Vol. 62. Medigraphic. Mexico.
- **Bellanti. J., Méndez. I., Huerta. L., Martínez., Escobar. G., 2008.** Alergia enfermedad multisistémica. Fundamentos Básicos y Clínicos. Panamericana. 2 edición. págs: 61-62.
- **Campos R., Godínez V., Abarca R., Pacheco Y., Reyna G., Barbosa C., 2013.** Stress modulates in testinal secretory immunoglobulin A. *Frontiers in Integrative Neuroscience.*, 7: 86.
- **Chavez Ramirez Ricardo., 2009.** Efecto del estrés agudo por nado en la producción de IgA y en las poblaciones de linfocitos B y T de la lámina propia y placa de Peyer del intestino delgado de ratones Balb/c. (Tesis de Maestría- Instituto Politécnico Nacional).
- **Chrousos, G. P., y Gold, P. W., 1992.** The concept of stress and stress system disorders. *Journal of the American Medical Association.* 267, págs: 1244-1252.
- **De Wied D., 1980.** Pituitary- adrenal system hormones and behavior. In: Selye, H. *Selye guide to stress research.* Vol 1 Van Nostrand Reinhold, New York, págs: 252-279.
- **Gold, P. W., Goodwin, F. K., y Chrousos, G. P., 1988.** Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. *New England Journal of Medicine* 3 19: 413-420.
- **Gómez-González B, Escobar A., 2006.** Condicionamiento de la respuesta inmune. *Revista Mexicana de Neurociencias.* 4: 83-90.

- **Glaser R., J.K. Kiecolt-Glaser., 2005.** Stress-induced immune dysfunction: implications for health, *Nat. Rev. Immunol.* 5: 243–251.
- **Griffin, J.F., Thomson, A.J., 1998.** Farmed deer: a large animal model for stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15: 445–456.
- **Guyton., 2006.** *Tratado de Fisiología Médica*; Ed. Mc Graw Hill; décima edición; cap 77 Hormonas de la corteza suprarrenal, págs: 1045-1053.
- **Hoffman-Goetz L., 2005.** N-acetyl-l-cysteine protects intestinal lymphocytes from apoptotic death after acute exercise in adrenalectomized mice. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288:R1664-72.
- **Kvetnansky Richard., 2009.** Catecholaminergic system in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89, págs: 535-606.
- **Landsberg L, Young J B., 1992.** Catecholamines and the adrenal medulla. En *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th edición. Wilson J D. Saunders Company, Philadelphia, Pwnnsylvania, USA.
- **Martínez Reculez María Guadalupe Carmen.** Efecto de la adrenalectomía sobre la producción de citocinas y células plasmáticas productoras de IgA en el intestino delgado de ratones balb/c sometidos a estrés. 2014 (Tesis de Maestría-Instituto Politécnico Nacional).
- **Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ., 1984.** Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.*; 5: 25-44.
- **Murphy. K., Travers. P., Walport. M., 2008.** *Inmunobiología de Janeway*. Mc Graw Hill. 7 edición. Mexico.
- **Puig, Pérez-Cano, Castellote, Franch and Castell., 2008.** The bowel: a key component of the immune system. *Rev Esp Enf Digest* ; 100: 29-34.
- **Rabinovich G.A., 2004.** *Inmunopatología Molecular*. Nuevas fronteras de la medicina. Editorial Medica Panamericana, 1 edición, págs: 578-580.

- **Rengarajan, Szabo y Glimcher., 2000.** Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*; 21(10): 479-483
- **Reyna-Garfias, Miliar, Jarillo-Luna, Rivera-Aguilar, Pacheco-Yepez, Baeza y Campos-Rodríguez., 2010.** Repeated restraint stress increases IgA concentration in rat small intestine. *Brain Behav Immun*; 24: 110–118.
- **Sandi. C., Venero. C., y Cordero. I. 2001.** Estrés, memoria y trastornos asociados: implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento. Ariel. 1 edición. España, págs: 44-48.
- **Silverthorn. D., 2008.** Fisiología Humana; Ed: Panamericana; cuarta edición, capítulo 21 Aparato Digestivo, págs: 678-679.
- **Soderhom, J.D y Perdue, M. H., 2001.** Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- **Sollid, D Kvale, PBrandtzaeg, G Markussen and E Thorsby., 1987.** Interferon- gamma enhances expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins. *L immunol*; 138: 4303-4306.
- **Sternberg E. M., 2006.** Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 6(4): 318–328.
- **Strober W., 2005.** Downstream effector functions of T-cell activation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Apr; 40 Suppl 1:S26.
- **Suzuki K., Fagarasan S., 2009.** Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. *Mucosal Immunol*. Nov; 2(6):468-71.
- **Torres A., 2006.** Relación anatómica, clínica y neurofisiológica entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. *Plasticidad y Restauración Neurológica.*, 5: 1-20.
- **Tortora J G., Derrickson B., 2007.** Principios de Anatomía y Fisiología. Ed panamericana. México. 937-944.

- **Vega L., Arenas C., Bailey M., González P., Ortega M G y Mondragon F, R., 2001.** Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev.Immunol.* 8, 147-158.
- **Young W. F., 2003.** Endocrine Hypertension.10th edition. Williams textbook of Endocrinology, Philadelphia, PA: Saunders.
- **Webster J.I., L. Tonelli, E.M. Sternberg., 2002.** Neuroendocrine regulation of immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 20 ,125–163.