

29
2 Ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRES Y RESPUESTA DE
ANTICUERPOS EN EL INTESTINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

PATRICIA FRANCISCA CISNEROS MORALES

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL CAMPOS RODRIGUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



1999

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

276400



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.

29
2Ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVÉNMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"ESTRES Y RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN EL INTESTINO"

realizado por PATRICIA FRANCISCA CISNEROS MORALES

con número de cuenta 8327547-6 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario DR. RAFAEL CAMPOS RODRIGUEZ

Propietario DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Propietario DRA. REGINA MONTERO MONTOYA

Suplente DRA. MA. LUISA FANJUL PEÑA

Suplente BIOLOGO JULIO PRIETO SAGREDO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS

Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS

A la Dra. Ma. EUGENIA GONSEBAT BONAPARTE,
A la Dra. REGINA MONTERO MONTOYA,
A la Dra. Ma. LUISA FANJUL PEÑA y al
Biólogo JULIO PRIETO SAGREDO por la revisión del
Texto y sus sugerencias

A:

JORGE Y ALEJANDRA BUHLER-GARCIA

ANTONIO Y ALBALUZ MORALES-GARCIA

CESAR Y LAURA MINOR-GARDUÑO

MIGUEL ANGEL CASTAÑON LINARES

ANTONIO GARCIA VARGAS

Por sus palabras de motivación y apoyo constante

INDICE GENERAL

	PAGINAS
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION	2
1.1 Estrés.....	2
1.2 Mediadores Químicos.....	4
1.2.1 Glucocorticoides.....	4
1.2.2 Catecolaminas	6
1.3 Regulación Neuroendocrina de la inmunidad en la mucosa intestinal	7
1.3.1 Relaciones anatomofuncionales entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso	7
1.3.1.1 Relaciones Anatómicas.....	7
1.3.1.1.1 Nervios en el intestino.....	8
1.3.1.1.2 Linfocitos y fibras nerviosas en los compartimientos mucosos.....	8
1.3.1.1.3 Tejido linfoide asociado al intestino(GALT).....	9
1.3.1.2 Interacciones de linfocitos con neuropeptidos.....	9
1.3.1.2.1 Estudios de unión ("binding").....	9
1.3.1.2.2 Estudios funcionales	10
1.4 Efecto del estrés en las respuestas inmunitarias en mucosas.....	11
1.4.1 Producción de anticuerpos de IgA.....	11
1.4.2 Efectos sobre funciones de las placas de Peyer.....	11
1.5 Producción de anticuerpos en placas de Peyer.....	11
II Planteamiento del problema.....	14
III Hipótesis.....	14
IV Objetivos.....	14
V MATERIAL Y METODO.....	15
VI RESULTADOS.....	18
VII DISCUSIÓN.....	26
VIII CONCLUSIONES.....	29
IX BIBLIOGRAFIA.....	30

RESUMEN

Los sistemas nervioso, endocrino e inmune se encuentran íntimamente relacionados principalmente a través de mediadores bioquímicos comunes (hormonas, neurotransmisores, linfocinas). Diversas enfermedades humanas (depresión, ansiedad) en donde ocurren alteraciones inmunológicas han confirmado esta interrelación. En relación con el estrés se han hecho diversos estudios analizando las alteraciones existentes en algunos componentes del sistema inmune, pero no se ha explorado cuales pueden ser los efectos del estrés en la respuesta inmune del intestino, a pesar de que muchas enfermedades sicosomáticas o por estrés afectan en forma importante la función del tubo digestivo: úlcera péptica, colitis ulcerosa, colon irritable, etc.

En consecuencia, el principal objetivo de este estudio fue investigar los efectos del estrés físico y los glucocorticoides: hidrocortisona y dexametasona -ya que los glucocorticoides participan en la respuesta fisiológica del hospedero a los estresores-, sobre la función de los linfocitos productores de anticuerpos en placas de Peyer de ratón. El procedimiento experimental consistió básicamente en someter a grupos de ratones BALB/c a estrés físico por inmovilización y tratamiento con diferentes dosis de glucocorticoides para comparar la respuesta de anticuerpos en placas de Peyer con los ratones testigo empleando un ensayo de placa hemolítica inversa.

I INTRODUCCIÓN

I.1 ESTRÉS

El estrés, o síndrome de adaptación general descrito por Seyle en 1946⁽¹⁾, es la respuesta del organismo a las condiciones estresantes o estresoras (físicos, químicos, psicológicos) del medio ambiente y consiste en un patrón de respuestas fisiológicas y psicológicas, inmediatas y tardías. El estrés, como la ansiedad, como concepto general y amplio describe las reacciones del organismo a las demandas del medio ambiente. Por más de 2,000 años los médicos han observado que los estados de ánimo pueden afectar la susceptibilidad a las enfermedades físicas. En 1919, *Ishigami*, estudiando la opsonización del bacilo tuberculoso en pacientes con tuberculosis crónica, durante las fases activa e inactiva, encontró que la actividad fagocítica disminuía durante los episodios de *estrés emocional* y *postuló que la vida estresante conducía a inmunodepresión* y consecuentemente a incremento en la susceptibilidad a la tuberculosis⁽²⁾. A partir de estos estudios se ha acumulado gran cantidad de información que demuestra que el estrés psicológico y las enfermedades psiquiátricas pueden alterar las funciones del sistema inmune, de manera que en estas situaciones son más frecuentes padecimientos como el cáncer, las enfermedades infecciosas, autoinmunes y alérgicas. En un estudio prospectivo⁽³⁾, se analizó la actividad de los linfocitos de cónyuges en luto durante las seis semanas siguientes a la muerte del cónyuge. A las seis semanas de la pérdida la respuesta proliferativa de células T a la Fitohemaglutinina (PHA) y Conavalina A (Con A) fue significativamente menor en los viudos que en los sujetos testigo. No hubo diferencias en los números absolutos de células T, B, niveles de cortisol y prolactina. Sin embargo, no se menciona si los pacientes estaban bajo tratamiento con drogas o sufrían de alguna enfermedad que afectara por sí sola la función del sistema inmune.

Los linfocitos de sangre periférica de pacientes adultos con depresión (leve a severa), sin enfermedad que altere la reactividad de los linfocitos y sin tratamiento con drogas, tienen respuestas proliferativas significativamente menores que los linfocitos de

sujetos sanos, cuando se exponen in vitro a mitógenos (fitohemaglutinina, concanavalina o mitógeno de la fitolaca).

Esta depresión de la respuesta celular puede depender de los altos niveles de cortisol, presente en los pacientes deprimidos. En un estudio similar en pacientes hospitalizados por depresión severa se observó *reducción significativa* en la respuesta proliferativa a tres mitógenos, linfocitopenia e hipercorticosterolemia relativa en comparación con los testigos no deprimidos. Tampoco hubo diferencias en el número relativo de linfocitos T y B.

El estrés se asocia con disminución en las respuestas proliferativas a mitógenos, menor citotoxicidad, y respuesta a la estimulación por antígenos. La menor actividad de las células T se refleja en retraso en el rechazo de injerto de piel, menor respuesta y menor respuesta de hipersensibilidad tardía. Sin embargo, en algunos estudios se ha observado que *el estrés aumenta las funciones inmunes celulares*. En animales el estrés se asocia con mayor susceptibilidad a numerosas enfermedades virales. Por ejemplo, Jonhsson y Cols (4), encontraron que ratones sometidos a *estrés físico (choques eléctricos repetidos)* la infección por virus Coxsackie B fue más severa que en los ratones no estresados, manifestada por la mayor pérdida de peso, mortalidad y cantidad de virus recuperados de varios órganos.

Sin embargo, en numerosos estudios el estrés tuvo efecto positivo o de incremento de las respuestas inmunitarias específicas e inespecíficas y consecuentemente efecto protector contra las infecciones.

Los monos infantiles separados prematuramente de la madre *manifiestan* depresión de la respuesta proliferativa a mitógenos T (Con A y PHA), pero no hubo cambio en la respuesta al mitógeno PWM (respuesta de células B). Después de la reunión de la madre y el hijo, la *respuesta volvió a los niveles anteriores a la separación*. En las madres los cambios fueron similares.

En ratas a las cuales se sometieron a choques eléctricos inescapables, choques escapables o choques sin restricción física, solamente en el grupo sometido a choque inescapable *la respuesta proliferativa a PHA fue*

significativamente menor que en los testigos *no sometidos a estrés*. En el grupo sometido a choque escapable no hubo disminución en la respuesta, ya que en esta situación el animal aprendió a apagar el choque. Los autores proponen que la capacidad de controlar el estresor es un factor clave en modular la respuesta inmune.

En ratas el estrés incrementó la respuesta humoral y celular contra un *antígeno proteínico Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)*. Por el contrario en otro estudio en el que se empleó el mismo antígeno y estresor⁽⁶⁾ se encontró reducción de la respuesta de anticuerpos IgG anti KLH; esto muestra que los efectos del estrés pueden ser muy variables.

Asimismo, Schedlowski *et al*⁽⁷⁾ mostraron que el estrés emocional se acompaña de incremento de niveles plasmáticos de las hormonas simpático-adrenales catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y cortisol, y con mayor actividad funcional de las células NK, las cuales desempeñan un papel inmediato y primordial en contra de las infecciones.

El estrés aumentó las reacciones de hipersensibilidad retardada en la piel, este tipo de respuestas depende de una efectiva inmunidad celular.

Finalmente, en la actualidad se acepta que el estrés puede ser uno de los componentes de cualquier enfermedad, no únicamente de aquellas designadas como "sicosomáticas". La susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, puede aumentar en situaciones de estrés.

1.2. MEDIADORES QUÍMICOS

1.2.1 GLUCOCORTICOIDES

Independientemente del origen del estrés (físico, químico, sicosocial) las vías finales comunes son: a) estimulación de la corteza suprarrenal con el subsecuente incremento en los niveles de glucocorticoides (cortisol), y b) estimulación del sistema nervioso simpático y la consiguiente liberación de catecolaminas. Stein M.⁽⁸⁾ sugiere que el sistema nervioso central y algunas hormonas del sistema endocrino pueden estar relacionados con la modulación del sistema inmune como respuesta a

los estresores.

Los glucocorticoides, como el cortisol, se liberan junto con las catecolaminas durante las situaciones de estrés. Los glucocorticoides, además, son las drogas más comúnmente usadas para suprimir las respuestas inmunitarias e inflamatorias no deseadas. Intervienen en varios puntos de las respuestas inmunitarias y parecen afectar diversos aspectos de la inflamación. El efecto de los corticosteroides en la fagocitosis por macrófagos parece ser bifásica: dosis pequeñas estimulan y dosis grandes deprimen.

La inhibición de la fagocitosis puede bloquear la captación inicial del antígeno (Ag) e interferir con el procesamiento del antígeno. Se ha hecho un estudio donde se ha demostrado que en los conejos tratados con 1 mg. de cortisona por kilogramo de peso, la fagocitosis de bacilos se incremento pero no se inhibió la multiplicación de los bacilos dentro de las vacuolas. Se propone que al no ocurrir ruptura de los bacilos no hubo 'procesamiento' de los antígenos. Por lo tanto, los glucocorticoides inhiben la digestión de los microorganismos por los macrófagos. En 1938, Ingle y cols describieron los efectos de los corticosteroides sobre el tejido linfóide. Otras tres horas después de una sola dosis de cortisona el núcleo del linfocito se encoge y después se desintegra; el citoplasma se dispersa. Las áreas linfoides más sensibles a los corticosteroides son la zona cortical del timo y los folículos germinales de los ganglios linfoides y el bazo, aunque los corticosteroides también provocan una gran disminución en el número de linfocitos circulantes en la sangre y la linfa.

La prednisona por vía oral afecta tanto a los linfocitos T como B, pero la linfocitopenia T es más pronunciada, ésta puede ser el resultado del secuestro de los linfocitos en la médula ósea, interrupción pasajera en la recirculación o ambos.

Cuatro a seis horas después de una sola administración intravenosa de 100 mg. de hidrocortisona, se observó, un decremento significativo en los números absolutos de linfocitos circulantes.

En la respuesta inmune humoral, o activación de células B, solamente las células B precursoras son sensibles a la cortisona, ya que las células maduras productoras de anticuerpos son resistentes a los corticosteroides. En una serie extensa de experimentos se demostró que los corticosteroides evitan la producción

de anticuerpos. La depresión en la síntesis de anticuerpos circulantes depende notablemente del momento, en relación con el reto antigénico, de la administración de los corticosteroides. Se han hecho dos observaciones importantes: 1) la respuesta primaria fácilmente se inhibe en comparación con las respuestas secundarias, y 2) son más vulnerables las etapas más tempranas de la activación de los linfocitos B. En humanos, la mayoría de los estudios no han podido demostrar una disminución en la síntesis de anticuerpos debido al tratamiento con corticosteroides. Esto pudo deberse a las bajas dosis de esteroides usadas, ya que en pacientes con pemfigo vulgar, tratados con 150 mg. de prednisona cada tercer día, hubo disminución marcada en el título de anticuerpos séricos específicos

1.2.2 CATECOLAMINAS

Los experimentos de W. Cannon en 1935⁽⁹⁾ demostraron la importancia del sistema simpático-médula suprarrenal en el mantenimiento de un estado constante en el cuerpo, o homeostasis, en respuesta a eventos de estrés físico o psicológico. Más tarde en 1936 Seyle (Bercz, 1997) reportó que el eje hipófisis-corteza suprarrenal también responde a estímulos estresantes. Propuso la teoría de que la respuesta hipófisis-corteza suprarrenal era inespecífica ya que cualquier estímulo nocivo o estresor la desencadenaba.

La actividad nerviosa simpática que se asocia a situaciones de estrés, físico y psicológico: ejercicio, miedo, daño tisular (infarto del miocardio), cirugía, hipoglucemia intensa, anoxia, y muchos otros estímulos de estrés, produce elevación aguda de adrenalina y noradrenalina procedente de la médula suprarrenal. La ansiedad crónica y el estrés se asocian con actividad persistente del sistema simpático con liberación de catecolaminas.^(9,10) Las catecolaminas circulantes tienen efectos variables sobre diversas poblaciones celulares y funciones del sistema inmune. Por ejemplo, en células NK de sangre periférica humana se expresan receptores alfa y beta para adrenalina y la adrenalina incrementa el número de receptores en células mononucleares y subpoblaciones de células T.⁽¹¹⁾ La adrenalina suprime la actividad de células T a través de receptores alfa adrenérgicos⁽¹²⁾, la generación de células T citotóxicas contra tumores⁽¹³⁾, así

como la generación de factor de necrosis tumoral por macrófagos activados mediante lipopolisacárido₍₁₄₎. En general, las catecolaminas tienen efectos depresores sobre las funciones inmunitarias humorales y celulares.

1.3 REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA INMUNIDAD EN LA MUCOSA INTESTINAL

En la actualidad se acepta en forma generalizada que el sistema nervioso central (SNC) es capaz de modular la actividad del sistema inmunitario (SI). Por otro lado, las respuestas inmunitarias pueden influir sobre el cerebro. Las relaciones entre el cerebro y las células inmunocompetentes son bastante complejas; involucra múltiples factores y circuitos de retroalimentación que deben actuar coordinadamente para lograr un funcionamiento óptimo. El término neuroinmunomodulación se refiere a la habilidad de vías y señales neurofisiológicas de regular las respuestas inmunitarias.

1.3.1 RELACIONES ANATOMO-FUNCIONALES ENTRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y EL SISTEMA NERVIOSO

La mucosa intestinal es un sitio especial donde ocurren amplias interacciones entre el sistema inmune y el sistema nervioso. El estudio de las relaciones funcionales entre el sistema nervioso y el sistema inmune en la mucosa intestinal ha sido poco explorado, a pesar de las importantes relaciones anatómicas entre ambos sistemas. En caso de existir una interrelación funcional entre ambos sistemas entonces podría ser posible incrementar o reducir las respuestas inmunes a nivel de la mucosa intestinal mediante la utilización de fármacos (glucocorticoides; agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos, agonistas y antagonistas colinérgicos), lo cual podría ser benéfico en el tratamiento de enfermedades intestinales con base inmunológica: colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndromes de mala absorción.

1.3.1.1 RELACIONES ANATÓMICAS

El intestino contiene abundantes elementos de los sistemas simpático y parasimpático, los cuales aún cuando relativamente autónomos establecen importantes relaciones con el SNC y el sistema inmune sistémico. Además, en el intestino se encuentran abundantes fibras serotoninérgicas.

Nervios extrínsecos conectan al sistema nervioso entérico (ENS) con el SNC a través de vías simpáticas y parasimpáticas.

1.3.1.1 Nervios en el intestino

Los nervios extrínsecos llegan al intestino con la vasculatura mesentérica que conectan con los nervios intrínsecos de los plexos principales del intestino. Estos nervios intrínsecos tienen ciertas características poco usuales: a) Hay una gran cantidad de tejido nervioso intrínseco en las mucosas, se ha calculado que hay tantos cuerpos neuronales dentro del tracto gastrointestinal como en toda la médula espinal⁽¹⁵⁾; b) alta densidad de fibras nerviosas neuropeptidérgicas, además de los *nervios colinérgicos* y *no-colinérgicos*; c) muchas de las fibras nerviosas contienen múltiples neurotransmisores; d) los neuropeptidos más abundantes en los nervios entéricos Somatostatina (SOM), Sustancia P (SP), Péptido vaso activo intestinal (VIP), tienen importantes funciones inmunoregulatoras. Los nervios se distribuyen ampliamente a lo largo de los tejidos mucosos, a menudo con *ramificaciones al epitelio* (tracto respiratorio) y capilares, con *inervación del músculo liso*⁽¹⁶⁾.

1.3.1.1.2 Linfocitos y fibras nerviosas en los compartimientos mucosos

Lámina propia. La lámina propia del intestino recibe gran cantidad de fibras nerviosas, la mayoría de las neuronas intrínsecas del sistema nervioso entérico, muchas de las cuales proceden del plexo submucoso⁽¹⁷⁾. Las fibras nerviosas que contienen VIP son las más abundantes en la lámina propia, forman redes intrincadas alrededor de las criptas y ramifican a lo largo de las vellosidades las porciones terminales de las fibras nerviosas se localizan justo por abajo de la membrana basal del epitelio. Las fibras con SP tienen una distribución similar, pero menos abundante y son menos frecuentes las fibras con SOM.

Este patrón permite posibles interacciones entre linfocitos y neuropeptidos a nivel de la *lámina propia del intestino*, quizá sin necesidad de contacto directo. Debido a la gran densidad de fibras nerviosas en la lámina propia se sugiere que una gran proporción de linfocitos se encuentran a *cierta distancia de una fibra nerviosa*. Además, un porcentaje elevado (5-10 %) de los mastocitos del intestino de la rata establecen contacto directo con fibras nerviosas peptidérgicas y las restantes están muy cercanas a una fibra nerviosa (2 μ m).

I.3.1.1.3 Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)

La inervación de las estructuras linfoides organizadas es menos conocida y tiene variaciones regionales. Tiene inervación simpática que es similar a la de ganglios linfáticos regionales en que se encuentran principalmente restringida a las áreas T.

Placas de Peyer. No se conoce de donde proceden los nervios que inervan a las placas de Peyer. Se localizan fibras nerviosas no mielinizadas en los espacios intercelulares. Axones y contactos de tipo sináptico se asocian con las células reticulares sin contacto aparente con los linfocitos. Tienen inervación noradrenérgica por fibras que proceden de ganglios mesentéricos. En ratón, muchas de las fibras nerviosas que entran a placas de Peyer por la vasculatura contienen VIP. Aún cuando menos numerosas que en lámina propia, estas fibras se localizan en las áreas T y algunas se encuentran en estrecha proximidad con las vénulas postcapilares especializadas con endotelio alto, a través de los cuales migran los linfocitos T y B procedentes de la sangre.

I.3.1.2 INTERACCIONES DE LINFOCITOS CON NEUROPEPTIDOS

Una de las primeras etapas en la activación celular es la interacción de receptores de membrana con factores activadores. Por lo que si los neuropéptidos inflúan en la activación de linfocitos, éstos deberían tener receptores para tales moléculas. Ahora se sabe que tales receptores existen y son funcionales.

I.3.1.2.1 Estudios de unión ("binding")

Linfocitos T y B de placas de Peyer de ratón tienen receptores para SOM y SP₍₁₈₎ muchos de ellos para ambos neuropéptidos_(19, 20). También se han identificado linfocitos de lámina propia del colon humano que unen VIP y SOM₍₂₁₎. Se requieren muchos más estudios para identificar las subpoblaciones de linfocitos con receptores para neuropéptidos.

I.3.1.2.2 Estudios funcionales

Los peptidos SOM, SP y VIP pueden regular una gran variedad de funciones inmunológicas sistémicas y de las mucosas.

La Somatostatina (SOM) inhibe la producción de IgA por parte de linfocitos de placas de Peyer y bazo. Sin embargo, cuando se administró SOM por infusión continua por varios días en ratón las respuestas proliferativas y de producción de inmunoglobulinas por células de estos tejidos aumentó. En ratas, SOM no provoca la desgranulación de mastocitos de lámina propia pero sí de mastocitos peritoneales.

La sustancia P (SP) tiene varias funciones principales en mucosas:

a) a diferencia de VIP y SOM, la SP es potente estimulador de la secreción de histamina por mastocitos tanto de *lámina propia* como de *peritoneo*; b) incrementa la producción de IgA por parte de linfocitos de placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo siendo más sensibles los linfocitos de las placas de Peyer; c) aumenta la actividad citotóxica (NK) de linfocitos intraepiteliales del ratón; el efecto parece ser selectivo; d) in-vivo, la infusión continua de SP incrementa la respuesta proliferativa a ConA y la producción de IgA por linfocitos de placas de Peyer y bazo en el siguiente orden $IgA > IgM > IgG$, y la actividad NK de linfocitos intraepiteliales.

Las actividades conocidas del péptido vasoactivo intestinal (VIP) a nivel intestinal son (Ottaway, 1991): a) es inhibidor de la síntesis de IgA por linfocitos de placas de Peyer.; b) se ha propuesto que participa en la migración de células T a los ganglios mesentéricos y placas de Peyer del ratón en virtud de que las células T expresan receptores para VIP y en los corredores T se localizan fibras VIP.

La colecistocinina (CKC), hormona gastrointestinal de naturaleza peptídica, afecta la contracción de la vesícula biliar y la secreción de enzimas pancreáticas. Secretada por células endocrinas (tipo I) de la mucosa intestinal de duodeno y yeyuno. Presente también en nervios intestinales, plexo mesentérico y en el SNC, por lo cual parece actuar como neurotransmisor. La administración i.v. de CKC a voluntarios humanos provoca aumento en la secreción de varias inmunoglobulinas incluyendo la IgA en el líquido intestinal. La administración intravenosa de CKC

provoca aumento de los anticuerpos IgA e IgG anti ovoalbúmina en una asa aislada del intestino de ratas previamente inmunizadas. La administración antagonista de la CKC (proglumide) reduce la secreción de ambas inmunoglobulinas. La instilación intragástrica de alimento (hidrolizado de proteínas) también incrementa la secreción de inmunoglobulinas. La atropina provoca reducción en el 50% de la secreción basal de IgA, sin afectar la secreción de IgG₍₁₈₎.

1.4 EFECTO DEL ESTRÉS EN LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS EN MUCOSAS

1.4.1 Producción de anticuerpos de IgA

Los efectos del estrés sobre las respuestas inmunitarias en mucosas se han estudiado casi exclusivamente sobre las modificaciones en los niveles de IgA secretoria (IgA-s). 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_(21, 22, 23), por el contrario, en otros se encontró que los niveles de IgA aumenta como consecuencia del estrés_(24, 25). Por lo cual no puede concluirse en definitiva que el estrés debilita la respuesta inmune humoral de las mucosas, representada por la IgA-s.

1.4.2 Efectos sobre funciones de las placas de Peyer

Los efectos del estrés sobre las funciones del tejido linfoide organizado asociado al intestino -nódulos linfoides- y placas de Peyer- no se han estudiado previamente.

I.V. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN PLACAS DE PEYER

Habitualmente se considera a las placas de Peyer como sitio de generación de precursores de células productoras de anticuerpos de la clase IgA sin constituir un órgano efector donde se localicen células plasmáticas productoras de anticuerpos (CPA)_(26, 27, 28). Sin embargo en placas de Peyer se encuentran células T y B, así como células con función accesoria

La aplicación de eritrocitos de carnero (ec) directamente en el interior de la vena de la placa de Peyer del conejo, no incrementó el número de CPA en la placa, pero sí en el bazo₍₂₉₎. En forma similar la aplicación por vía sistémica de antígenos

solubles, como la ovoalbúmina, no provocó alteraciones morfológicas en las placas de Peyer del conejo⁽³⁰⁾. Por último, la inyección en cojinetes plantares de hámsters de albúmina bovina con o sin adyuvante completo, no condujo a la aparición de células que contenían anticuerpos específicos en placas de Peyer, pero sí en la lámina propia. Es evidente de los trabajos mencionados que las placas de Peyer no responden a la presencia de antígenos depositados por vía sistémica.

La aplicación de antígenos directamente en la placa de Peyer provocó la aparición de centros germinativos que contenían células con anticuerpos específicos para el antígeno. Estas células plasmáticas pueden proceder de la misma placa o de lugares distintos como el bazo o la médula ósea. Evidentemente este tipo de inmunización es sistémico y normalmente no ocurre. La administración oral de bacterias vivas de S. paratyphi en ratones libres de gérmenes provocó infección intestinal y nueve días después, bacteriemia. Por el día 16 aparecieron centros germinativos en el bazo y los ganglios linfáticos y las placas de Peyer. En éstas el edema fue visible dos días después de la infección oral. Es evidente que las bacterias que atraviesan la barrera intestinal inducen cambios en las placas de Peyer⁽³¹⁾.

En cultivos *in vitro* de células de placas de Peyer de conejos normales estimuladas por la presencia del antígeno *ec*, se generan CPA específicas lo cual no ocurre con células del timo. No hay generación de CPA anti-*ec* en cultivos *in vitro* de células (T y B) de placas de Peyer de ratón C57b1/6, sin embargo cuando se añaden células adherentes de exudado peritoneal o *mercaptoetanol* sí hay generación de respuestas⁽³¹⁾. Kiyono y colaboradores (1982) obtuvieron por disociación enzimática con Dispasa suspensiones celulares de placas de Peyer de ratón. Estas suspensiones al estimularse *in vitro* con *ec* manifiestan respuesta de CPA IgM anti-*ec*; la respuesta se incrementó cuando se añadieron desde el inicio del cultivo estimulantes como Concaivalina A (dosis submitogénica), LPS y MDP, que actúan sobre macrófagos, células T y B. En suspensiones de placas de Peyer de ratones inmunizados por intubación intragástrica con *ec* y retadas con el mismo antígeno al cabo de 4-5 días de cultivo se detectan CPA de todos los isotipos principales, pero la respuesta IgA anti-*ec* es 2 veces más alta con respecto a las

respuestas de IgM e IgG. Estos resultados demuestran que la administración oral de antígeno T dependiente sensibiliza a las células de las placas de Peyer para la aparición de respuestas humorales sobre todo de IgA, y que en ese sitio se encuentran todas las poblaciones requeridas para la respuesta de anticuerpos IgA. Sustancias estimuladoras como ConA a dosis submitogénica, incrementan la respuesta de IgA anti-ec, lo cual sugiere que células T cooperadoras o sus mediadores son importantes en la respuesta IgA, al menos in vitro. Por último, estudios de microscopía electrónica⁽³³⁾, inmunofluorescencia y funcionales in vivo e in-vitro^(34,35, 36,37), han mostrado que células de las placas de Peyer de varias especies, incluyendo al hombre^(38, 39), pueden producir anticuerpos.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De lo mencionado en los antecedentes resulta claro que existen conexiones funcionales importantes entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Sin embargo, a pesar de que en la mayoría de las alteraciones orgánicas provocadas por el estrés está involucrado el aparato digestivo (úlceras pépticas, colitis ulcerosa, enteritis regional), no se han estudiado las posibles alteraciones en las respuestas inmunitarias en el intestino provocadas por el estrés. Por lo que se propone la siguiente hipótesis.

III HIPÓTESIS:

Si el estrés y los glucocorticoides tienen efecto sobre las respuestas inmunitarias en el intestino, entonces en ratones estresados o tratados la magnitud de la respuesta de anticuerpos en las placas de Peyer se verá disminuida.

IV OBJETIVOS

Los principales objetivos son:

1 Estudio de la respuesta de anticuerpos en placas de Peyer de ratones sometidos a estrés físico por inmovilización.

2 Análisis del efecto de diversas dosis de hidrocortisona y dexametasona en la respuesta humoral en placas de Peyer.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De lo mencionado en los antecedentes resulta claro que existen conexiones funcionales importantes entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Sin embargo, a pesar de que en la mayoría de las alteraciones orgánicas provocadas por el estrés está involucrado el aparato digestivo (úlceras pépticas, colitis ulcerosa, enteritis regional), no se han estudiado las posibles alteraciones en las respuestas inmunitarias en el intestino provocadas por el estrés. Por lo que se propone la siguiente hipótesis.

III HIPÓTESIS:

Si el estrés y los glucocorticoides tienen efecto sobre las respuestas inmunitarias en el intestino, entonces en ratones estresados o tratados la magnitud de la respuesta de anticuerpos en las placas de Peyer se verá disminuida.

IV OBJETIVOS

Los principales objetivos son:

1 □ Estudio de la respuesta de anticuerpos en placas de Peyer de ratones sometidos a estrés físico por inmovilización.

2 □ Análisis del efecto de diversas dosis de hidrocortisona y dexametasona en la respuesta humoral en placas de Peyer.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De lo mencionado en los antecedentes resulta claro que existen conexiones funcionales importantes entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Sin embargo, a pesar de que en la mayoría de las alteraciones orgánicas provocadas por el estrés está involucrado el aparato digestivo (úlceras pépticas, colitis ulcerosa, enteritis regional), no se han estudiado las posibles alteraciones en las respuestas inmunitarias en el intestino provocadas por el estrés. Por lo que se propone la siguiente hipótesis.

III HIPÓTESIS:

Si el estrés y los glucocorticoides tienen efecto sobre las respuestas inmunitarias en el intestino, entonces en ratones estresados o tratados la magnitud de la respuesta de anticuerpos en las placas de Peyer se verá disminuida.

IV OBJETIVOS

Los principales objetivos son:

1 □ Estudio de la respuesta de anticuerpos en placas de Peyer de ratones sometidos a estrés físico por inmovilización.

2 □ Análisis del efecto de diversas dosis de hidrocortisona y dexametasona en la respuesta humoral en placas de Peyer.

V MATERIAL Y MÉTODO

ANIMALES: Se utilizaron ratones macho, de dos meses de edad, de aproximadamente 25-30 g de peso, de la cepa BALB/c proporcionados por el bioterio de la Escuela Superior de Medicina. Fueron desparasitados con mebendazol y metronidazol a dosis apropiadas.

Estrés físico por inmovilización. El estrés de tipo físico consistió en inmovilizar a los ratones de los grupos problema mediante fijación con cinta adhesiva, durante una a tres horas por tres días consecutivos. Los animales testigo no se inmovilizaron pero se colocaron en el mismo medio ambiente. Al cuarto día se obtuvieron los linfocitos de las placas de Peyer y se realizó el ensayo de placa hemolítica inversa.

Tratamientos con glucocorticoides. Grupos de 4 a 6 ratones se trataron con hidrocortisona a dosis de 125, 250 y 500 mg/Kg de peso. o dexametasona a dosis de 25 y 50 mg/Kg de peso. Los ratones testigo recibieron solución de diluyente. Cuarenta y ocho horas después los ratones de los diferentes grupos se sacrificaron y obtuvieron las placas de Peyer, en donde se cuantificó el número total de células y posteriormente se realizó el ensayo de placa hemolítica.

Purificación de Inmunoglobulinas de conejo anti-Inmunoglobulinas de ratón. Primero, se obtuvo suero de conejo anti-Inmunoglobulinas de ratón inmunizando con gamaglobulinas (Igs) de ratón previamente obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. A partir de este suero se obtuvo, por cromatografía de afinidad empleando una columna de inmunoglobulinas de ratón acoplada a Sefarosa, los anticuerpos de conejo anti-Igs de ratón.

Recubrimiento de eritrocitos de carnero con inmunoglobulinas de conejo anti-Igs de ratón. De un paquete de eritrocitos de carnero, lavados previamente con solución de NaCl 0.15 M, se tomaron 100 μ l de la solución de inmunoglobulinas de conejo anti-Igs y 1 ml de una solución de cloruro crómico a 1 mg/ml. Después de incubar a 37°C durante una hora, los eritrocitos recubiertos se

lavaron y ajustaron al 20%.

Obtención de las células de las placas de Peyer. Las células de las placas de Peyer -que constan principalmente de linfocitos T, B y células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas)- se obtuvieron de acuerdo al procedimiento habitual: se extrae el intestino delgado en su totalidad y con la ayuda de tijeras finas de disección se quitaron las placas de Peyer, de tres a cinco, dependiendo del ratón.. Enseguida, con la ayuda de un embolo de jeringa de 1 ml se ejercía presión sobre las placas de Peyer depositadas en una caja de Petri que contenía solución de Hanks, las células obtenidas en suspensión se hacían pasar a través de una pequeña coladera y por una jeringa de plástico de 5 ml llena de gasa, con el objetivo de eliminar pedazos de tejido y células epiteliales que se retenían en la gasa. Las células recuperadas se centrifugaban a 400 g por 5 min; después de repetir este último procedimiento por dos ocasiones más, la suspensión celular se resuspendía en un ml de solución de Hanks.

El número total de células obtenidas se contabilizaba empleando solución de cristal violeta y la viabilidad de las células por exclusión de azul de tripano. Finalmente, la suspensión celular se ajustó a una concentración de 10^6 células por ml de solución de Hanks.

Ensayo de placa hemolítica inversa: Se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: a 100 microlitros de la suspensión de linfocitos de placa de Peyer, procedentes de los ratones testigo y de los sometidos a estrés, se les adicionaron 20 μ l de suspensión al 20% de los eritrocitos de carnero recubiertos con inmunoglobulinas de conejo anti-IgS de ratón, 20 μ l del suero de conejo anti-inmunoglobulinas (Igs) de ratón a dilución óptima de 1:150 y 20 μ l de suero de cobayo (complemento). La mezcla se introdujo en cámaras de Cunningham y después de incubar a 37°C durante 90 minutos se contó el número de placas hemolíticas, cada una de las cuales corresponde a una célula plasmática. Finalmente, se calculó el número de células plasmáticas productoras de anticuerpo por cada millón de células linfoides.

Con este método se cuantifican células que producen anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA, independientemente de su especificidad.

VI RESULTADOS

EFFECTO DEL ESTRÉS FÍSICO EN LA RESPUESTA HUMORAL

En los ratones estresados físicamente por inmovilización durante una y tres horas por tres días consecutivos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el número total de células presentes en las Placas de Peyer (Figura 1). Por el contrario, el número de células productoras de anticuerpos (CPA) fue menor en los ratones estresados por una o tres horas, en relación con los testigos ($p < 0.001$).

EFFECTO DE LA HIDROCORTISONA

Grupos de ratones BALB/c recibieron por vía intraperitoneal 125 mg/kg, 250 mg/kg y 500 mg/kg de peso de hidrocortisona, y 48 horas después se obtuvieron suspensiones de Placas de Peyer (PP), en las cuales se determinó el número total de células así como cantidad de células productoras de anticuerpos por el ensayo de placa hemolítica inversa. En ratones tratados con la dosis de 125 mg/kg de hidrocortisona no se observó efecto importante sobre el número de células linfoides como en la producción de anticuerpos ($p < 0.05$) (Figura 2).

En ratones tratados con la dosis de 250 mg/kg tampoco se observaron diferencias en cuanto al número de células linfoides y al número de CPA (Figura 3).

En los ratones tratados con 500 mg/kg de hidrocortisona (Figura 4) si hubo una reducción significativa en el número de células linfoides ($p < 0.0001$) y en la producción de anticuerpos en las PP ($p < 0.0001$).

EFFECTO DE LA DEXAMETASONA

Grupos de ratones Balb/c fueron tratados con dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg de peso de dexametasona y 48 horas después se obtuvieron suspensiones de placa de Peyer (PP) en las cuales se determinó el número total de células así como la cantidad de células productoras de anticuerpos por el ensayo de placa hemolítica inversa. La dexametasona a dosis de 25 mg/Kg (Figura 5) no alteró en forma significativa tanto el número de células linfoides ($p > 0.05$) ni la magnitud de la respuesta de CPA ($p > 0.05$), en los tres experimentos realizados.

En los ratones tratados con 50 mg/kg de dexametasona (Figura 6) la respuesta de anticuerpos fue significativamente menor que en los tratados ($p < 0.01$) lo mismo que el número de células linfoides por Placa de Peyer ($p < 0.01$).

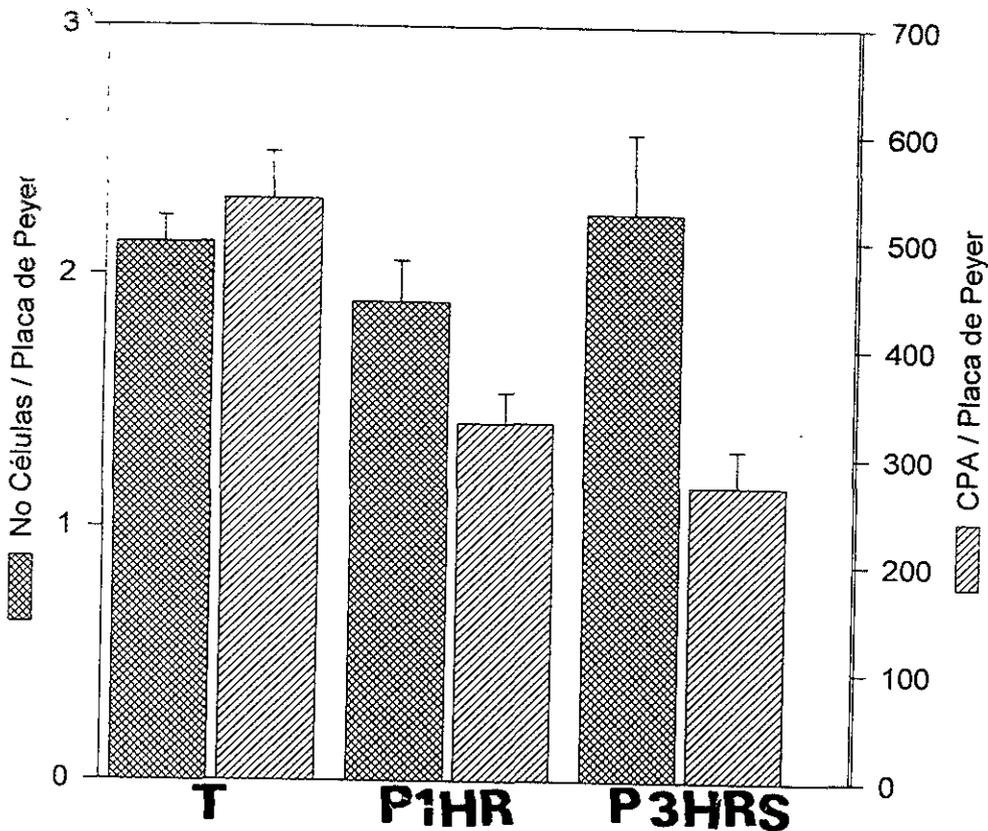


FIGURA 1. Efecto del estrés en la respuesta inmunitaria humoral en las placas de Peyer. Los ratones se estresaron por 1h o 3 h durante tres días y posteriormente se contó el número total de células en las placas de Peyer y se cuantificó, mediante ensayo de placa hemolítica, el número de células productoras de anticuerpos (CPA). Los resultados corresponden a cuatro ensayos diferentes y se muestran como media \pm error estándar. Los ratones estresados por 1h (n=17) o 3 h (n=16) tuvieron respuestas de CPA significativamente menores ($p < 0.001$) con relación a los testigos (n=18). El número total de células en las placas de Peyer no fue diferente entre los diferentes grupos ($p > 0.05$).

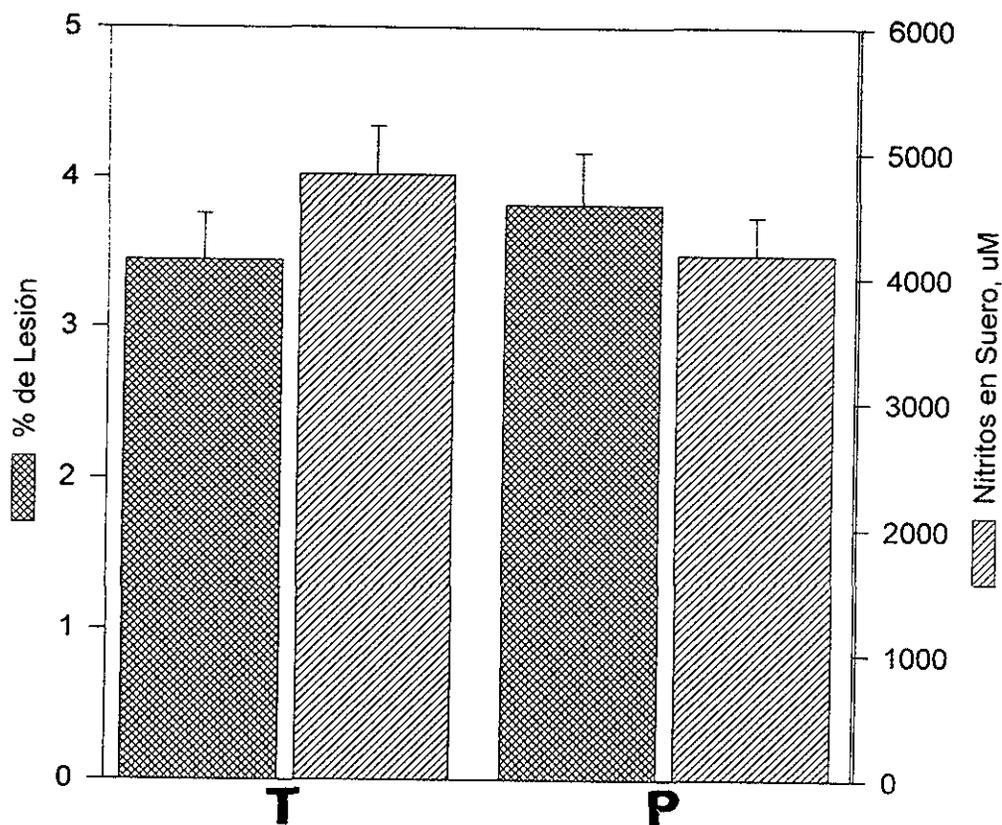


Figura 2. Efecto de la hidrocortisona a dosis de 125 mg / Kg. Los ratones se trataron con una dosis de 125 mg / Kg de peso corporal y posteriormente se cuantificaron tanto el número total de células como el de células productoras de anticuerpos en las Placas de Peyer. Se realizaron tres experimentos y los resultados se muestran como media ^{*} el error estándar. No hubo diferencias significativas entre los grupos testigo (n = 13) y problemas (n = 15) .

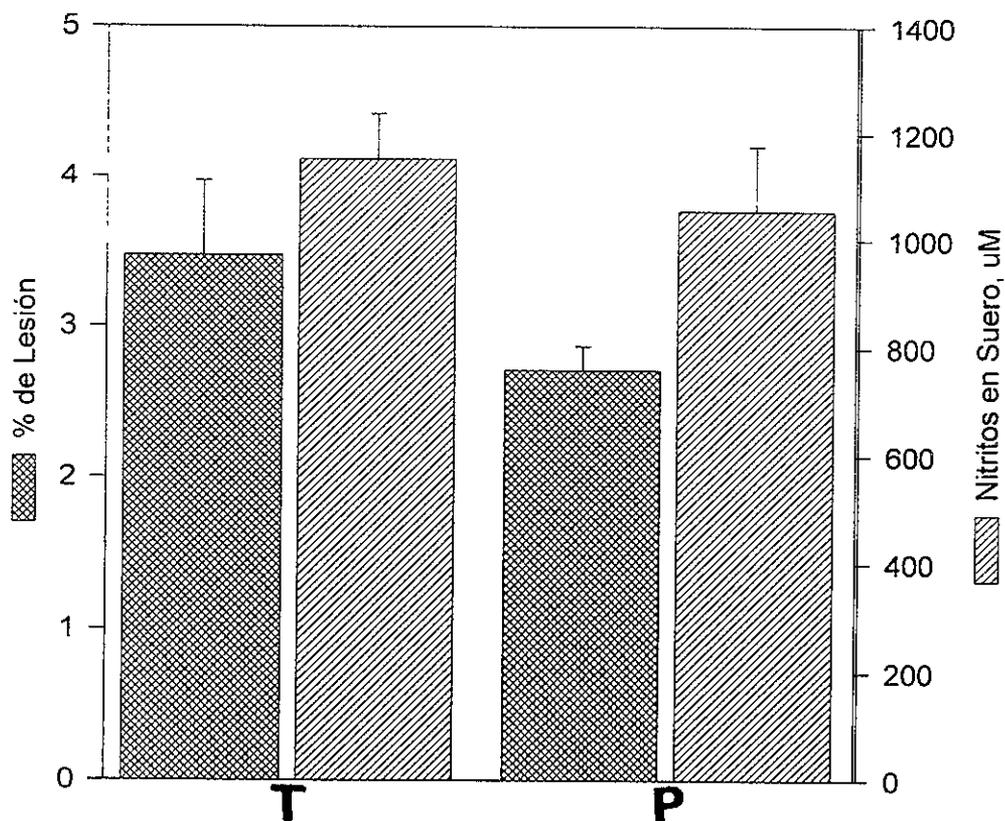


Figura 3. Efecto de la hidrocortisona a dosis de 250 mg / Kg.. Los ratones se trataron con una dosis de 250 mg / Kg de peso corporal y procedió como se indica en la figura 2. Se realizaron tres experimentos y los resultados se muestran como media [±] el error estándar. No hubo diferencias significativas entre los grupos testigo (n = 16) y problemas (n = 15) .

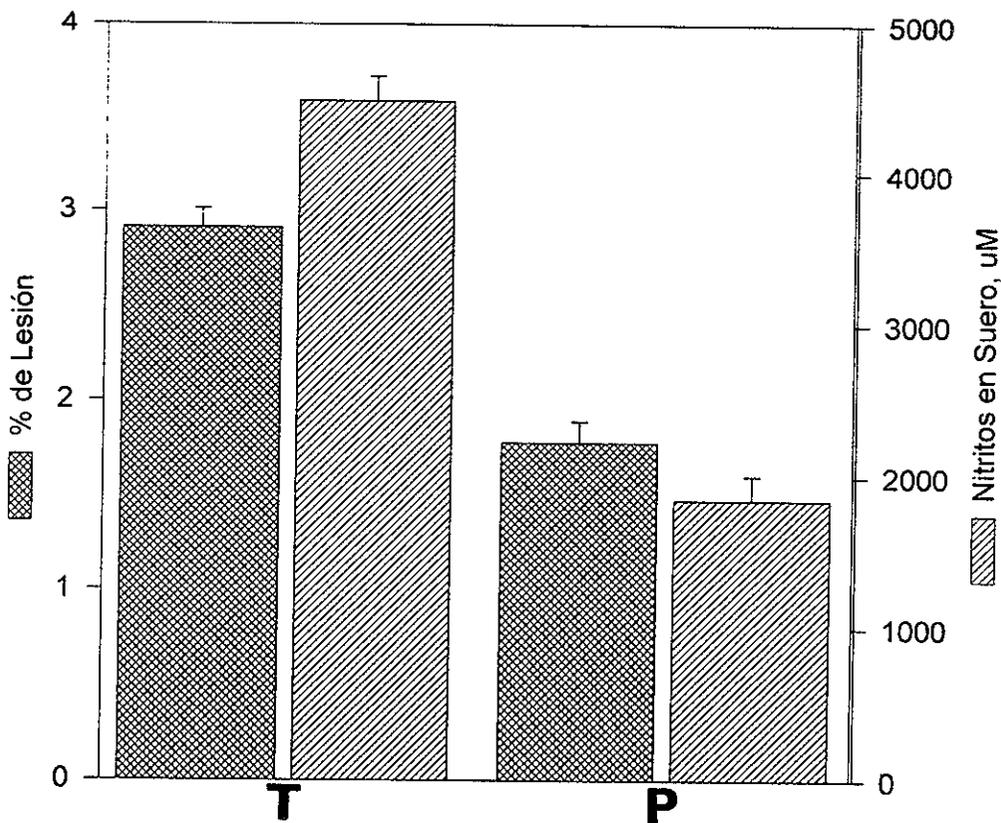


Figura 4. Efecto de la hidrocortisona a dosis de 500 mg / Kg.. Los ratones se trataron con una dosis de 500 mg / Kg de peso corporal y procedió como se indica en la figura 2. Se realizaron seis experimentos y los resultados se muestran como media ^{*} el error estándar. Se encontraron diferencias significativas tanto en el número total de células como el de células productoras de anticuerpos en las Placas de Peyer ($p < 0.0001$) entre los grupos testigo ($n = 14$) y problemas ($n = 16$).

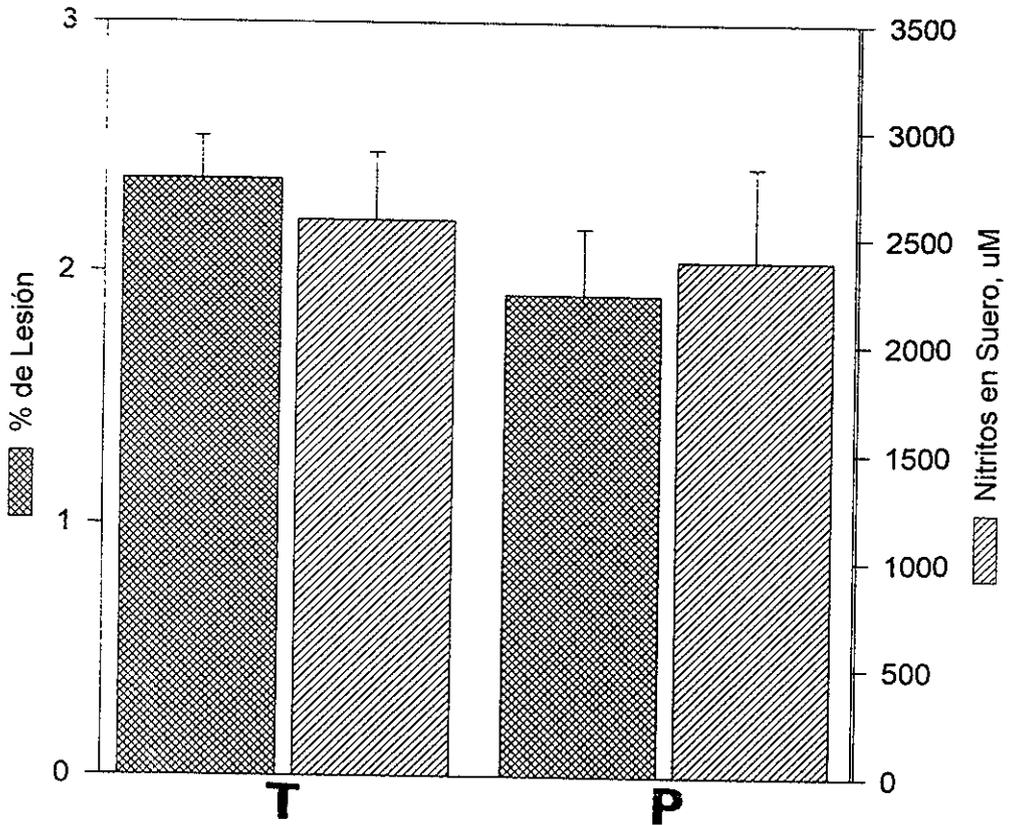


Figura 5. Efecto de la dexametasona a dosis de 25 mg / Kg.. Los ratones se trataron con una dosis de 25 mg de dexametasona por kilogramo de peso corporal y procedió como se indica en la figura 2. Se realizaron tres experimentos y los resultados se muestran como media [±] el error estándar. No se encontraron diferencias significativas tanto en el número total de células como el de células productoras de anticuerpos en las Placas de Peyer ($p > 0.05$) entre los grupos testigo ($n = 13$) y problemas ($n = 12$).

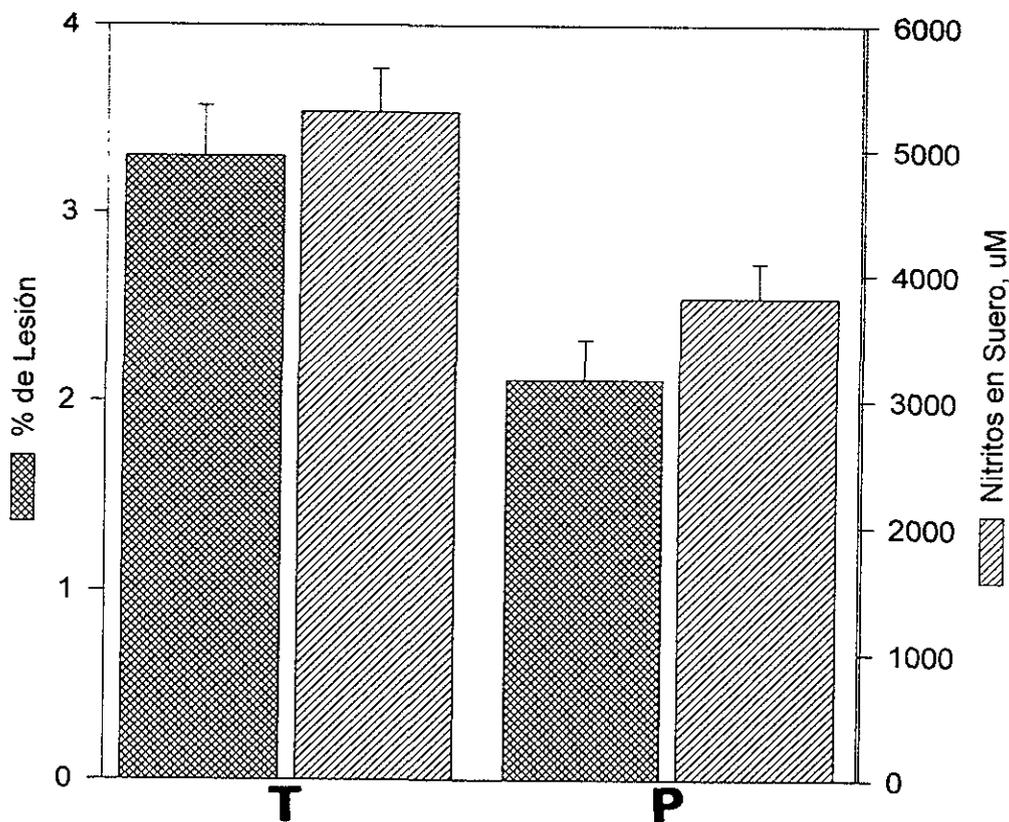


Figura 6. Efecto de la dexametasona a dosis de 50 mg / Kg.. Los ratones se trataron con una dosis de 50 mg / Kg de peso corporal y procedió como se indica en la figura 2. Se realizaron seis experimentos y los resultados se muestran como media [±] el error estándar. Se encontraron diferencias significativas tanto en el número total de células como el de células productoras de anticuerpos en las Placas de Peyer ($p < 0.01$) entre los grupos testigo ($n = 29$) y problemas ($n = 25$).

VII DISCUSIÓN

Los estudios acerca del efecto del estrés sobre las respuestas inmunitarias en el intestino son escasos. Por tal motivo se decidió investigar en relación con los posibles efectos del estrés sobre la respuesta inmunitaria humoral en las Placas de Peyer, para lo cual se empleo un modelo animal para observar si la respuesta inmune se suprime o no, siendo los ratones un recurso disponible para la obtención de células linfoides.

El procedimiento experimental, consistió, en someter a grupos de ratones BALB/C a estrés físico por inmovilización y tratamiento con diferentes dosis de glucocorticoides para comparar la respuesta de anticuerpos (de las clases IgG, IgA e IgM) en PP con ratones testigo, empleando un ensayo de placa hemolítica inversa.

Los resultados muestran que el estrés físico produce reducción en la respuesta de anticuerpos en el intestino cuando ésta se mide por el número de células productoras de anticuerpos en PP. Este efecto probablemente no se debe a muerte o eliminación de los linfocitos ya que no se observó reducción en el número total de células linfoides en las PP. En un trabajo se reportó que el estrés físico (descargas eléctricas) reduce la respuesta proliferativa de células T de bazo, pero sin disminución del número total de leucocitos o de subpoblaciones de células T. Por comparación sí hubo reducción tanto en el número de células como en la respuesta proliferativa en células de sangre (40).

La reducción en la respuesta de CPA alcanza un máximo con 1 hora de estrés diario ya que no se observó una mayor reducción de los animales estresados por 3 horas. Esto puede tener una explicación similar a la que se ha reportado en ratas estresadas. En algunas situaciones de estrés físico, descargas eléctricas por ejemplo, se manifiesta lo que se ha llamado "habitación" al estrés: una sola exposición al estrés físico provoca reducción en la respuesta proliferativas de células T a mitógenos, mientras que cinco exposiciones en el curso de varios días provoca que el efecto sobre la respuesta inmunitaria sea mucho menor ("habitación"). Este efecto sólo se observa en células de bazo y no en sangre (40,41).

Con el fin de indagar sobre qué hormona era responsable, al menos en parte, se trajeron ratones con corticosteroides: hidrocortisona y dexametasona, que participan en mediar algunos de los efectos del estrés sobre las respuestas inmunitarias sistémicas.

La hidrocortisona solamente a dosis muy elevadas de 500 mg/kg, tuvo efecto ya que los ratones tratados 48 horas antes con una dosis única tuvieron menor número de células linfoides y menor respuesta de anticuerpos en las PP en comparación con los testigos.

El efecto de la cortisona y la hidrocortisona ha sido ampliamente estudiado en el caso de las respuestas inmunitarias humorales sistémicas. La administración de corticosteroides suprime marcadamente la respuesta humoral (37).

La dexametasona también a dosis muy elevadas de 50 mg/kg redujo tanto la población de células linfoides como la producción de anticuerpos.

Otros autores han utilizado la dexametasona para investigar el posible papel de los glucocorticoides en el estrés. En ratas la dexametasona reduce significativamente los niveles de IgA secretoria (bilis) y aumenta también significativamente la adherencia bacteriana a la pared cecal. También reduce en forma significativa la concentración duodenal de colecistocinina, disminución de IgA (Células inmunoreactivas en íleon) y deficiente inmunidad de mucosas, que se manifiesta como mayor adherencia bacteriana y menor resistencia tisular. Estos fenómenos pueden contribuir a la mayor adherencia de las bacterias al epitelio y la invasión de la mucosa. Además los glucocorticoides pueden promover la translocación bacteriana ya que en animales tratados se observó una mayor cantidad de bacterias en ganglios mesentéricos.

La reducción en el número de células productoras de anticuerpos, también conocidas como células plasmáticas, puede estar directamente relacionado con la disminución en el número de células linfoides, y menos probablemente al efecto inhibitor sobre las células responsables de la inducción de las respuestas inmunitarias: macrófagos y células T cooperadoras. Sin embargo, algunos autores (Elliot y Sinclair, 1968) sugieren que la cortisona interfiere con la respuesta de anticuerpos en alguna fase temprana en la que posiblemente participen las

células T.

Un efecto directo de los glucocorticoides sobre las células B o células plasmáticas es menos probable ya que estas estirpes celulares son resistentes a los glucocorticoides (42).

Además de la reducción en la respuesta inmunitaria humoral en PP que se describe en este trabajo, se reportó en un estudio realizado in vitro que la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y beta-endorfina, péptidos relacionados con el estrés, reducen en forma significativa la producción de anticuerpos de los isotipos IgA, IgG e IgM en linfocitos de Placas de Peyer estimulados con Concanavalina A (43). También se ha encontrado que el estrés quirúrgico incrementa el número de células T gamma/delta y disminuye el de las células T alfa/beta en la PP de ratón.

En la actualidad se acepta que el estrés puede ser uno de los componentes de cualquier enfermedad, no únicamente de aquellas designadas como "sicosomáticas". La susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, puede aumentar en situaciones de estrés.

La reducción en la producción de anticuerpos en mucosa intestinal puede favorecer la infección e invasión por microorganismos y parásitos patógenos.

VIII CONCLUSIONES

El estrés físico no modificó el número de células linfoides, pero sí hubo diferencia en el número de Células Productoras de Anticuerpos CPA, en ratones estresados durante 1 y 3 horas.

En ratones tratados con diferentes dosis de hidrocortisona (125 mg/kg, 250 mg/kg), no se encontró diferencia significativa ni en el número de células linfoides ni en el número de CPA; sin embargo en ratones a los cuales se les administró 500 mg/kg, sí se encontró diferencia en el número de células linfoides y en el número de CPA.

Ratones tratados con 25 mg/kg de Dexametasona no se ven alterados ni el número de Células linfoides, ni el número de Células Productoras de Anticuerpos CPA, mientras que usando dosis de 50 mg/kg la respuesta sí se ve alterada.

Por lo tanto se concluye que a bajas dosis de glucocorticoides no se ve alterada la respuesta inmune, mientras que empleando dosis elevadas sí se altera la respuesta inmune de los ratones estresados. Puesto que finalizado el tratamiento no se cuantificaron los niveles plasmáticos de los glucocorticoides no podemos establecer con certeza cuales fueron los niveles alcanzados. En ratones normales los niveles son de alrededor de 500 ng/mL.

**ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

IX BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bercz I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. *Ann New York Acad. Sci.* **752**: 3-11, 1997.
- 2) Kronfol ZJ, Silva J, Greden S, Debinski R, Gardner, B. Carrol. Impaired T lymphocyte function in depressive illness. *Life sciences.* **33**: 241-247, 1983
- 3) Rabkin JTC, Struening EL. Life events, stress, and illness. *Science.* **194**: 1013-1020, 1976.
- 4) Jonhson T, Lavander E, Hultin, Rasmussen AF. The influence of avoidance-learning stress on resistance to coxackie B virus in mice. *J. Immunol.* **91**: 569-574, 1963.
- 5) Rabin BM, Lyle H, Epstein A, Caggiula R. Alteration of immune competence by number of mice housed per cage. *Ann NY Acad Sci.* **496**: 492-500, 1987.
- 6) Moyniham SA, Ader R, Grotta LJ, Schachtman TR, Cohen N. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain Behav. Immun.* **4**: 11-12, 1990.
- 7) Schedlowski M, Jacobs R, Stratmann G, Richter S. Hadicke A, Tewes U, Wagner T, Schmidt RE. Changes of natural Killer Cells during acute psychological stress. *J. Clin. Immunol.* **13**: 119-126, 1993.
- 8) Stein M, Keller SE, Schleifer SJ. Stress and immunomodulation; the role of depression and neuroendocrine function. *J. Immunol.* **135**: 827-833, 1985.
- 9) Szabo S. Hans seyle and the development of the stress concept. *Ann York Acad Sci.* **752**:19-23, 1997.
- 10) Chrousos GP. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptative response. *Ann York Acad Sci* **752**: 313-333, 1997.
- 11) Jetschman JU, Bnschop RJ, Jacobs R, Kemper A, Oberbeck R, Schmidt RE, Schedlowski. Expression and in vivo modulation of alpha and beta adrenoreceptors on human natural killer (CD16+) cells. *J. Neuroimmunol* **74**: 159-164, 1997.
- 12) Felsner P, Hofer D, Rinner I, Mangge H, Gruber. Continuous in vivo treatment with catecholamines suppress in vitro reactivity of rat peripheral blood T-lymphocytes. *J. Neuroimmunol* **37**: 47-57, 1992.
- 13) Cook-Mills JM, Mokyr MB, Cohen RL, Perlmann RL, Chambers DA. Neurotransmitter suppression of the in vitro generation of a cytotoxic T lymphocyte response against the syngeneic MOPC-315 Plasmacytoma. *J. Neuroimmunol* **55**:132-142, 1995.
- 14) Hu XX, Goldmuntz EZ, Brosnan CF. The effect of norepineprine on endotoxin mediated macrophage activation. *J. Neuroimmunol* **31**:35-42, 1991.
- 15) Bienenstock J. Neuroimmune interactions in the regulation of mucosal immunity. *En Immunophysiology of the gut.* Ed por Bienenstock J Academic Press. Capitulo 12:171-181, 1993.
- 16) Cooke H Neurobiology of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* **90**:1057,

1986.

- 17) Wood JD. Enteric neuroimmune interactions. En Immunophysiology of the gut. Ed por Bienenstock J. Academic Press. Capitulo Academic Press, 14:207-227, 1993.
- 18) Ottaway CA. Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. Gastroenterology Clinics of North America. **20**: 511-529, 1991.
- 19) Scicchitano R, Dazin P, Bienenstock. Distribution of somatostatin receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B lymphocytes. Brain Behav. Immu. **1**:173-185, 1987.
- 20) Stanisz A, Scicchitano R, Dazin P. Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's Patch. T and B cells. J. Immunol. **139**: 749-755, 1987.
- 21) Pallone F, Fais D, Annibale M. Modulatory effects of somatostatin an vasoactive intestinal peptide on human intestinal lymphocytes. Ann NY Acad Sci. **594**: 408, 1990.
- 22) Drummong PD, Hewson BB, Increased psychosocial stress and clecreased mucosal immunity in children with recurrent upper respiratory tract infections. J Psychosom. Res. **43**: 271-278, 1997.
- 23) Guhad F, Hau J. Salivary IgA as a marker of social stress in ratas. Neurosci Lett **216**: 137-140, 1996.
- 24) Ziier H, Brauchli P, Joller Jemelka H. Effects work demand on immunoglobulin A and cortisol in air traffic controllers. Biol Psychol. **42**:413-423, 1996.
- 25) Mc Clelland CC, Ross G, Patel V. The effects of an academic examination on salivary norepin phrine and immunoglobulin levels. J. Human Stress. **11**:52- 59, 1985.
- 26) Tomasi TB, Plaut GA. Humoral aspects of mucosal inmunity. Advances in Host Defense Mechanisms. Ed por Gallin JI y Fauci AS. Raven Press, NY, **4**:31-61, 1985.
- 27) Bienenstock J, Dolezel J. Peyer's patches lack of specific antibody-containing cells after oral and parental immunization. J. Immunol. **106**:938-945, 1971.
- 28) Keren DF, Holt SP, Collins HH, Gemski P. Formal BS. The role of Peyer's patches in the local immune response of rabbit ileum to live bacteria. J. Immunol **120**: 1892-1896, 1978.
- 29) Henry C, Faulk WP, Kuhn L, Yoffey JM, Fudenberg. Peyer's patches Immunologic studies. J. Exp. Med. **131**:1200-1210, 1970.
- 30) Faulk WP, Mc Cormick JN, Goodman JR, Yoffey JM, Fudenberg HH. Peyer's patches. morphologic studies. Cell Immunol. **1**:500-520, 1971.
- 31) Pollar M, Sharon N. Responses of the peyer's patches in germ free mice to antigenic stimulation Infection Immunity **2**:96-100, 1970.

- 32) Kagnoff MF, Campbell S. Functional characteristics of Peyer's patches lymphoid cell, induction of humoral antibody and cells-mediated allograft reactions. *J. Exp Med.* **139**:398-406, 1974.
- 33) Chin KN, Hudson G, Ultrastructure of Peyer's patches in the normal mouse. *Acta Anat.* **78**:306-318, 1971.
- 34) Benner RA, Bjorklund M, Ivars F, Holmberg D. Background immunoglobulin production: measurement biological significance y regulation, *Immunology Today* **3**:243-249, 1982.
- 35) Benner RA, Rijnbeek M, Bernabe RR, Martiinez A, Coutinho A. Frequencies of background immunoglobulin secreting cells in mice as a function of organ, age and inmune status. *Immunobiology* **158**:225-238, 1981.
- 36) Haaijman JJ, Schuit RE, Haaijmans W. Immuglobulin-containing cells in different lymphoid organs of the CBA mouse during its life span. *Immunology* **32**:427-434, 1977.
- 37) Katz DH, Perey DE, Lymphocytes in peyer's partches of the mouse: analysis of the constituent cells in terms of their capacities to mediate functions of mature T and B lymphocytes. *J. Immunol.* **111**:1507-1512, 1973.
- 38) Bjerke K, Brandtzaeg P, Immunoglobulin and J chain producing cells associated with lymphoid foilicles in the appendix, colon and ileumincluding peyer's patches. *Clin. Exp. Immunol.* **64**:432-441, 1986.
- 39) Bjerke K, Brandtzaeg P. Terminally differentiated human intestinal B cells. *Scand. J. Immunol* **32**:61-67, 1990.
- 40) Lysle DT, Cunnick JE, Fowler H, Rabis BS. Pavlovian conditioning of shock induced suppression of lymphocyte reactivity: acouisition, extinction and prexposure effects. *Life Sci* **41**:2185-2194, 1988.
- 41) Chao CC, Peterson PK, Filice GA, Romero C, Sharp BM. Efects of immobilization stress on the pathogenesis of acute murine toxoplasmosis. *Brain Behav Immun* **4**: 162, 1990.
- 42) Katz DH. Lymphocyte differentiation, recognition and regulation. Academic Press, NY. 312-315, 1977.
- 43) Carr DJ Radulesco RT, De Costa BR, Rice K, Blalock JE. Differential effect of opioids on immunoglobulin production by limphocytes isolated from Peyer's patches and spleen. *Life Sci.* **47**: 1059-1069, 1990.
- 44) Cunnick JE, Lysle DT, Kucinski BJ, Rabin BS. Stress-induced alteration of immune function. Diversity of effects and mechanisms. *Ann NY Acad Sci.* **650**:283-287, 1992.
- 45) Dhabhar FS. Stress-induced enhancement of cell mediated immunity. *Ann NY Acad Sci.* **400**: 359-372, 1980.
- 46) Barr WG, Challacombe JS, Yem A, Tomasi. TB. The acesyory function of murine Peyer's patches. *Cell. Immunol* **92**:41-52, 1985.
- 47) Haaijman JJ, Slingerland TR, Besner R, Vanoudenaren. the distribution of cytoplasmic Immunoglobulin containing cells over various lymphoid organs of

- congenitally athymic (nude) mice as a function of age. *Immunology* **36**:271-278, 1979.
- 48) O'Leary A, Stress, emotion and human Immune function. *Psychol Bull.* **108**: 363-382,1990.
- 49) Wood PG, Karol MH, Kusnecou AW, Rabin BS. Enhancement of antigen specific humoral y cell-mediated Immunity by electric foots shock stress in rats. *Brain Behav. Immun.* **7**:121-134, 1993.
- 50) Zurier RB y Weissmann G. Anti-immunological and anti-inflammatory effects of steroid therapy, capitulo 16:223-237. En *Steroid Therapy*, Ed por Azarnoff DL. WB saunders, Philadelphia, 1975.
- 51) Li T, Hatada M, Tamada K, Abe K, Konomoto K. Repeated restraint stress impairs the antitumor T cells response through its suppressive effect on Th1-type CD4+T cells. *Anticancer Res* **17**:3259-3268, 1997.
- 52) Larson CT, Grass WB, Davis JW. Social stress and resistance of chicken and swine to staphy lococcus aureus challenge infections. *Can. J. Comp. Med.* **49**:208-210, 198
- 53) Bonneau RH, Sheridar JF, Feng N, Glaser R, Stress induced modulation of the primary cellular Immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal dependent and independent mechanisms, *J Neuro Immun.* **42**:167-176, 1993.
- 54) Carter BP, Collins FM. The route of enteric in normal mice, *J. Exp. Med.* **139**:1189-1203, 1974.
- 55) Lycke N, Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in lamina propria and peyer's patches in mice 2 years after oral Immunization with cholera toxin. *Scand J. Immunol.* **23**:611-616, 1986.
- 56) Tlaskalova H, Sterzl HJ, Stepankova R, Diabac V, Vetuicka P, Rossmann, Mandel L, Rejnek J. Development of Immunological capacity under germfree and conventional conditions. *Ann. NY Acad. Sci.* **409**:96-113, 1983.
- 57) Alverdy JC, Aoyo E, The Effect of dexamethasone and endotoxin administration on biliary IgA and bacterial adherence. *J. Surg. Res.* **53**: 5450-5454, 1992.
- 58) Alverdy J, Aoyo E, The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired mucosal immunodeficient state, *Ann. Surg.* **214**: 6719-6723, 1991.
- 59) Alverdy J, Stern E, Poticha S, Baucnoch D, Adrian T. Cholecystokinin modulates mucosal immunoglobulin A function. *Surgery* **122**:2386-2392, 1997.
- 60) Gryglewsk A, Szczepanik M, Majcher P, Papiela T. Different patterns of gamma delta and alpha beta T cell redistribution in the mouse after partial gastrectomy. *J. Surg. Res.* **73**: 2137-2142, 1997.