INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

EFECTO DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPATICO EN EL TRANSPORTE Y SECRECION DE IgA EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES Balb/C

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

M. C. JOSÉ MARTÍN MEJÍA CORIA

DIRECTORES DE TESIS

DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ

DR. ALDO ARTURO RESENDIZ ALBOR

MÉXICO, D. F. ENERO 2012

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizo en el laboratório de Inmunología de La Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, con apoyo de la beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT).

SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 29 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

"EFECTO DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPATICO EN EL TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE IgA EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES Balb/c"

Presentada por el alumno:

Mejía	**Coria**	**José Martín**
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: **A 1 0 0 6 4 5**

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

Dr. Saúl Rojas Hernández

Dra. Norma Estela Herrera González

Dra. Marycarmen Godínez Victoria

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla

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

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 29 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Mejía Coria José Martín alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100645 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Rafael Campos Rodríguez, Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor y cede los derechos del trabajo intitulado "EFECTO DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPATICO EN EL TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE IgA EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATONES Balb/c", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **androide_paronoico 28@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

José Martín Mejía Coria

Nombre y firma

Contenido

	Pagina
Contenido	**I**
Índice	**II**
Índice de figuras	**IV**
Abreviaturas	**V**
Resumen	**VI**
Abstrac	**VII**
1. INTRODUCCIÓN	**1**
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	**14**
3. JUSTIFICACIÓN	**15**
4. HIPÓTESIS	**16**
5. OBJETIVO GENERAL	**17**
6. OBJETIVOS PARTICULARES	**18**
7. METODOLOGÍA	**19**
8. RESULTADOS	**25**
9. DISCUSIÓN	**37**
10. CONCLUSIONES	**45**
11. PERSPECTIVAS	**46**
12. BIBLIOGRAFÍA	**47**

Índice

1. Introducción	**1**
1.1 Generalidades	**1**
1.2 Características fisiológicas de la respuesta al estrés	**1**
1.3 Interacciones neuroendocrinoinmunologicas	**3**
1.4 Hormonas del estrés	**6**
1.4.1 Glucocorticoides	**6**
1.4.2 Catecolaminas	**7**
1.5 Catecolaminas, inervación simpática y sistema inmune	**9**
1.5.1 Efectos del estrés en la función inmune	**9**
1.6 Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)	**9**
1.7 Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)	**11**
2. Planteamiento del problema	**14**
3. Justificación	**15**
4. Hipótesis	**16**
5. Objetivo general	**17**
6. Objetivos particulares	**18**
7. Metodología	**19**
7.1 Animales de experimentación	**19**
7.2 Grupos experimentales	**19**

7.3 Protocolo de estrés	**20**
7.4 Obtención de material biológico	**21**
7.5 Determinación de SIgA en liquido intestinal y de IgA y pIgR y en células epiteliales por Western Blot	**22**
7.6 Análisis estadístico	**23**
8. Resultados	**25**
8.1 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de SIgA intraluminal en intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos	**25**
8.2 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de IgA en células epiteliales del intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos	**27**
8.3 Efecto del estrés agudo sobre el transporte de IgA en ratones con bloqueo de receptores alfa y beta adrenérgicos	**29**
8.4 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de SIgA en liquido intestinal en ratones con simpatectomía química	**31**
8.5 Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre los niveles de IgA en células epiteliales en ratones con simpatectomía química	**33**
8.6 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de pIgR en células epiteliales en ratones con simpatectomía química	**35**
9. Discusión	**37**
9.1 Bloqueo de receptores adrenérgicos	**40**
9.2 Simpatectomía química	**42**
10. Conclusiones	**45**
3. Perspectivas	**46**
4. Bibliografía	**47**

Índice de figuras

Figura		Pagina
Figura 1	El eje Hipotálamo hipófisis medula adrenal y el sistema inmunitario	4
Figura 2	Descripción del tejido linfoide asociado a intestino	12
Figura 3	Efecto del estrés agudo sobre la secreción de SIgA en ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos	26
Figura 4	Efecto del estrés agudo sobre la expresión de IgA en células epiteliales de intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos por western blot	28
Figura 5	Efecto del estrés agudo en la expresión del piar en célula epitelial de ratones sometidos a bloqueo de receptores adrenérgicos evaluado por western blot	30
Figura 6	Efecto del estrés agudo en la secreción de SIgA en liquido intestinal de ratones sometidos a simpatectomía química evaluada por western blot	32
Figura 7	Efecto del estrés agudo en la IgA en célula epitelial de ratones sometidos a simpatectomía química evaluada por Western Blot	34
Figura 8	Efecto del estrés agudo en la expresión del pIgR en célula epitelial de ratones sometidos a simpatectomía química evaluado por western blot	36

Abreviaturas

ACTH: Hormona adrenocorticotrofa

Ag: Antígeno

APC: Células presentadoras de antígeno

BALT: Tejido linfoide asociado a los bronquios

CRH: Corticotropina

DHEA: Dehidroepiandrosterona

GALT: Tejido linfoide asociado a intestino

HHS: Eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales

IgA: Inmunoglobulina A

LP: Lamina propia

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas

MHC-II: Clase II del complejo principal de histocompatibilidad

NK: Células asesinas naturales,

pIgR: Receptor para inmunoglobulinas poliméricas

S-IgA: Inmunoglobulina A secretora

SNC: Sistema nervioso central

Th2: Linfocitos T cooperadores.

6-OHDA: 6-hidridopamina

C: Grupo de ratones control

C+E: Grupo de ratones control más estrés

F: Grupo de ratones con bloqueo de receptores alfa adrenérgicos mediante fentolamina

F+E: Grupo de ratones con bloqueo de receptores alfa mediante fentolamina adrenérgicos más estrés

N: Grupo de ratones con bloqueo de receptores beta adrenérgicos.

N+E: Grupo de ratones con bloqueo de receptores beta adrenérgicos más estrés

6-OHDA: Grupo de ratones a los que se les realizó simpatectomía química mediante 6 Hidroxidopamina

6-OHDA + E: Grupo de ratones a los que se les realizó simpatectomía química mediante 6 Hidroxidopamina más estrés.

RESUMEN

El término estrés se utiliza para aludir a cualquier condición que perturba seriamente la homeostasis fisiológica y psicológica, y que el organismo percibe como una amenaza. La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC), endocrino e inmune. El estrés agudo puede aumentar la función del sistema inmune, mientras el estrés crónico resulta en reducción de la respuesta inmune. El propósito de este estudio fue determinar el efecto del sistema nervioso simpático en el transporte y secreción de IgA en el intestino delgado de ratón Balb/c sometido a estrés agudo. Se formaron dos grupos de ratones, a uno se sometió a bloqueo de receptores adrenérgicos y a otro se le realizó simpatectomía química. En ambos grupos se evaluó la presencia de SIgA en liquido intestinal y de IgA y pIgR en célula epitelial mediante Western Blot. En el grupo al cual se le sometió a bloqueo de receptores adrenérgicos observamos que en respuesta al estrés se produce una aumento en los niveles de SIgA, IgA y pIgR. Asimismo consideramos que el aumento que se observo en los niveles de SIgA en la mayoría de los grupos puede estar mediada en parte por el aumento de la permeabilidad intestinal, la cual permite el tránsito de IgA hacia de luz intestinal proveniente de otras partes distintas a la lamina propia intestinal.

En el grupo de ratones a los cuales se les realizo simpatectomía química observamos que el estrés produce aumento de los niveles de SIgA, IgA y pIgR en respuesta al estrés, el cual no llega a los niveles observados en el grupo control más estrés y que puede estar dado por las otras hormonas (glucocorticoides principalmente) que se generan en respuesta al estrés.

ABSTRAC

The term stress is used to refer any condition that seriously perturbs physiological and psychological homeostasis, and that the body perceives as a threat. The stress response is controlled by the central nervous system (CNS), endocrine and immune systems. It is generally accepted that acute stress may enhance immune system function, while chronic stress results in reduced immune responses. The purpose of this study was to determine the effect of the sympathetic nervous system in the transport and secretion of IgA in the small intestine of BALB / c under acute stress. Two groups of mice, one was subjected to adrenergic receptor blockade and other chemical sympathectomy was performed. Both groups evaluated the presence of SIgA in intestinal fluid IgA and pIgR in epithelial cells by Western Blot. In the group which was subjected to adrenergic receptor blockade observed in response to stress that there is an increase in the levels of SIgA, IgA and pIgR. We also believe that the observed increase in the levels of SIgA in most of the groups may be mediated in part by increased intestinal permeability, which allows the movement of IgA into the intestinal lumen from other parties other than the intestinal lamina propria. In the group of mice that underwent chemical sympathectomy observed that stress causes increased levels of SIgA, IgA and Pig in response to stress, which does not reach the levels observed in the control group more stress and can be given by the other hormones (glucocorticoids in particular) that are generated in response to stress.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades

El término estrés deriva del latín *stringere*, que significa originalmente "oprimir", "apretar" o "atar". (Hernández y Pavón-Romero., 2007). Actualmente el concepto de estrés se define como una perturbación de la homeostasis e incluye el estresor, la respuesta al estresor y los cambios fisiológicos entre el estresor y la reacción corporal. El estrés se puede dividir en dos categorías:

1) Agudo: con una exposición limitada de tiempo a algún estresor.

2) Crónico: con una exposición continua a algún estresor. (Pakac y col., 2001).

Diversos estudios han demostrado que dependiendo del tipo y la duración del estrés, este puede aumentar o reducir la función inmune (Ader & Cohen, 1993). De manera general es aceptado que el estrés agudo podría aumentar la función del sistema inmune, mientras el estrés crónico a menudo resulta en reducción de la respuesta inmune (Dhabhar & McEwen, 1997).

1.2 Características fisiológicas de la respuesta al estrés

La respuesta al estrés está controlada por el Sistema Nervioso Central (SNC) y la coordinación que esté ejerce sobre los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis: autónomo, endocrino e inmunológico. (Gómez González B., Escobar A., 2006.) El principal efector de la respuesta al estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HHS). (Elenkov I.J., Chrousos G.P., 2002).

En el hipotálamo, las neuronas de la región parvocelular del núcleo paraventricular poseen axones que se proyectan a la capa externa de la eminencia media donde secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés). La hormona liberadora de corticotropina desde la circulación porta hipofisiaria estimula a las células corticotropas de la adenohipófisis a que secreten hormona adrenocorticotrofa (ACTH, por sus siglas en inglés). La ACTH tiene como órgano blanco la corteza de las glándulas suprarrenales, específicamente las porciones fasciculada y reticular, que en respuesta a la estimulación de la ACTH secretan glucocorticoides; en el ser humano el principal glucocorticoide es el cortisol. (Gómez González B., Escobar A., 2006.)

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 pre-ganglionares simpáticas, ubicadas en el asta intermediolateral de los segmentos torácico 1 a lumbar 2 de la médula espinal, y liberación concomitante de noradrenalina por las neuronas posganglionares simpáticas. Asimismo, la activación simpática estimula a las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales que secretan adrenalina al torrente sanguíneo. (Goodman& Gilman. 2003)

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 catecolaminas ejercen influencia directa sobre el

funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a sus receptores específicos y también ejercen efectos indirectos al alterar la producción de citocinas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias. Los glucocorticoides, al acoplarse a sus receptores citoplasmáticos 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 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. (Gómez González B., Escobar A., 2006: Griffin y Thomson, 1998). (Figura 1)

1.3 Interacciones neuroendocrinoinmunologicas

Desde hace 20 años, gran número de evidencias experimentales han demostrado la existencia de una comunicación constante y bidireccional entre el sistema neuroendocrino y la respuesta inmunológica. Estas interacciones nos permiten mantener la homeostasis ante los estímulos estresante, tanto de tipo sistémico –lesiones tisulares, infecciones mediadas por bacterias, virus y parásitos- como de tipo psicológico, secundarios a la percepción y procesamiento del estímulo por cada individuo.

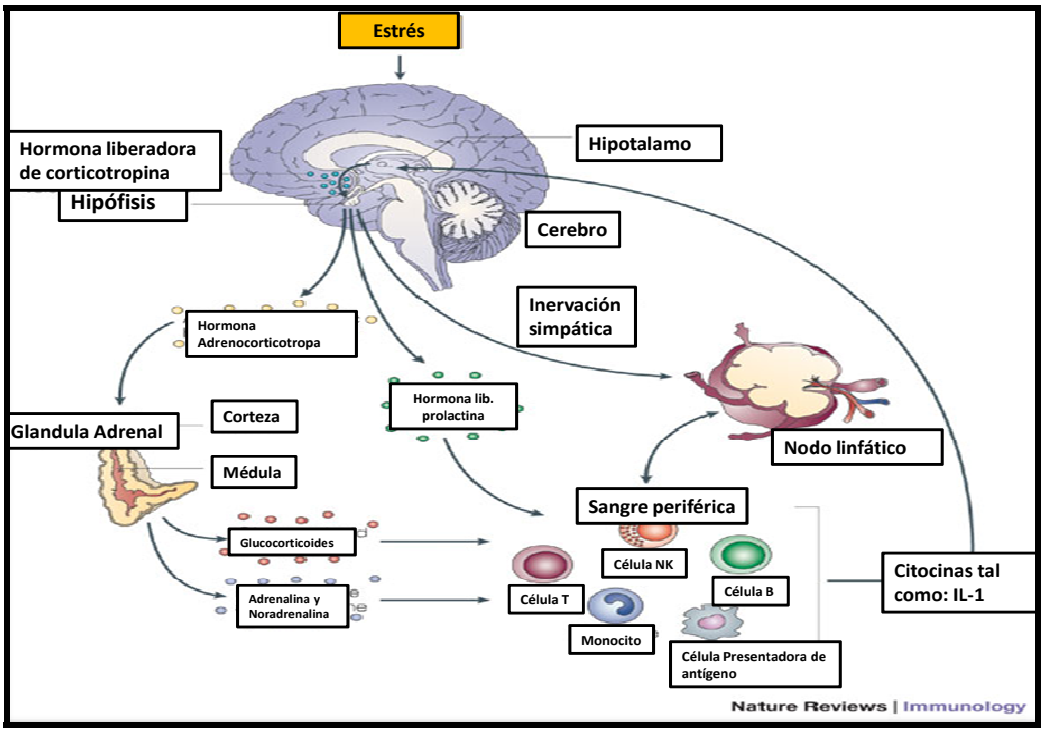

Figura 1. El eje Hipotálamo hipófisis medula adrenal y el sistema inmunitario. Los factores de estrés pueden activar el eje simpático-adrenal-medular (SAM), así como el eje HPA, y por lo tanto provocar la liberación de hormonas hipofisarias y suprarrenales como las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), hormona corticotropina (ACTH), cortisol, hormona del crecimiento y la prolactina, que a su vez pueden actuar directa o indirectamente sobre el sistema inmunológico. Webster Marketon Jeanette I. Stress hormones and immune function. Cellular Immunology 252 (2008) 16–26

El estrés es un proceso fisicoquímico o emocional inductor de una tensión, que favorece la liberación de: a) citocinas proinflamatorias, b) la hormona liberadora de corticotrofina (CRH, por sus siglas en inglés) y c) el cortisol, así como de un amplio grupo de neurotransmisores, que inducen, en su conjunto, la aparición de alteraciones conductuales. La respuesta ante el estrés físico o psicológico que el organismo elabora es equivalente. Los estímulos estresantes agudos tienen efectos que pueden considerarse como veniales. Sin embargo, cuando estos se mantienen por un período prolongado se vuelven nocivos y generan la aparición de alteraciones indeseables. (Pederson, B.K., Hoffman-Goetz L. 2000.).

El organismo inicia una respuesta adaptativa ante los estímulos estresantes que consiste en una elevación de los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas proinflamatorias son capaces de unirse a sus receptores y estimular al Sistema Nervioso Central (SNC). Estas citocinas se unen a sus receptores específicos en el cerebro y, por medio de vías fisiológicas diferentes, inducen la generación de los siguientes procesos:

1) **Neuroinmunológicos,** que activan la liberación de citocinas en el cerebro mismo; 2) **Neuroquímicos,** que empiezan con la liberación de neurotransmisores, como la norepinefrina y la serotonina; 3) **Neuroendocrinos,** que se inician con la secreción de la CRH, la cual activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA), lo que a su vez induce la liberación de cortisol y andrógenos anábolicos, como la dehidroepiandrosterona (DHEA, por sus siglas en inglés). (Hernández y Pavón-Romero., 2007)

Es bien reconocido que, además de factores inmunológicos, factores neuroendocrinos juegan un papel importante en la regulación de actividades efectoras de las células en el sistema inmunológico. (Ottaway & Husband, 1992, 1994) Una de las mayores vías por las cuales estos factores ejercen su influencia en la función inmune es a través de una extensa red de inervación del tejido linfoide por parte del sistema nervioso simpático. Fibras del sistema nervioso simpático han sido identificadas en estrecha asociación con vasos sanguíneos (Felten, 1998)

En esta conexión, se ha demostrado que las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, tienen efectos paracrinos en las células del sistema inmunológico vía receptores adrenérgicos presentes en estas. (Maden, Sanders, & Felten, 1995). En vista de esta densa inervación simpática del

sistema inmune de mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) se ha demostrado que la función inmune de mucosas es especialmente susceptible a la regulación neuroendocrina (Stead, 1991)

1.4 Hormonas del Estrés

1.4.1 Glucocorticoides

La Corteza suprarrenal produce muchas hormonas esteroideas, entre las cuales destacan el cortisol, la aldosterona y los andrógenos suprarrenales.

En lo que se refiere a su anatomía microscópica la corteza histológicamente se compone de tres zonas, una glomerular externa, una fasciculada y una reticular interna. En la zona glomerular se produce aldosterona y no se puede producir cortisol, ni andrógenos. En la zona fascicular se producen cortisol y andrógenos. La zona reticular interna rodea la médula y también produce cortisol y andrógenos. Las zonas fasciculada y reticular están reguladas por ACTH (Hormona Adrenocorticotropica, por sus siglas en inglés); el exceso o deficiencia de esta hormona altera su estructura y función. (Sulllivan y col., 1983; Wira y col., 1991; Alverdy y Aoys, 1991)

1.4.2 Catecolaminas

La medula suprarrenal es una parte especializada del sistema nervioso simpático que secreta catecolaminas. El sistema nervioso simpático comúnmente secreta noradrenalina como neurotransmisor local, directamente a los órganos blanco. En cambio, la médula suprarrenal es importante por la secreción de adrenalina y otras sustancias hacia la circulación general por su

distribución y efectos amplios. Si bien, la médula suprarrenal no es necesaria para la supervivencia, la secreción de adrenalina y otros compuestos ayuda a mantener la homeostasis del cuerpo durante periodos de tensión. (Kohm P y Sanders M; 2001).

Estructura microscópica. Las células cromafines, o feocromocitos, de la médula suprarrenal son células columnares ovoides grandes, dispuestas en grupos o cordones que rodean los vasos sanguíneos. Tales células tienen un gran número de vesículas o gránulos que contienen catecolaminas. La médula suprarrenal también contiene algunas células de ganglios simpáticos, aislados o en grupos. (Greespan F.S., Gardner D.G. 2005)

Las catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoacido precursor L-tirosina. Hay dos principales fuentes de tirosina, por un lado la dieta y por otro a partir de la hidroxilación del aminoácido fenilalanina en el hígado. A partir de la entrada a la célula cromafin, en las terminales nerviosas catecolaminergicas, la tirosina es convertida, mediante varias reacciones enzimáticas, en dihidroxifenilalanina (DOPA, por sus siglas en inglés) y esta a su vez en Dopamina. Finalmente la Dopamina es convertida en Noradrenalina (NA) por medio de la enzima Dopamina-β-hidroxilasa, la NA es entonces convertida en Adrenalina por la enzima fenilentanolamina N-metiltransferasa.

La síntesis de catecolaminas se encuentra incrementada durante condiciones de estrés. Lo anterior se ha demostrado al observar que la actividad de las enzimas encargadas de la biosíntesis de catecolaminas se encuentra elevada bajo situaciones de estrés prolongado.

Bajo condiciones basales, bajos niveles de catecolaminas son liberados hacia la circulación sanguínea de la medula adrenal y de terminales nerviosas

simpáticas. Sin embargo, durante un estimulo estresante, una enorme cantidad de adrenalina (95%) y una significativa cantidad de Noradrenalina (la cual comprende 30% del total de la noradrenalina circulante) pueden ser liberadas a partir de la medula adrenal. El restante 70% de la noradrenalina es liberado a partir de terminales nerviosas simpáticas. Por lo tanto, durante el estrés, el incremento plasmático de adrenalina es derivado casi completamente de la medula adrenal, mientras la noradrenalina plasmática (casi el 70%) es derivado de nervios simpáticos (Kvetnansky, 2009)

El efecto de la catecolaminas es mediado por adrenoreceptores, los cuales pueden separarse en 4 categorías (α_1, α_2, β_1 y β_2) de acuerdo a su diferente sensibilidad a ciertos agonistas. (Maisel, 1989; Landmann, 1992). Se ha demostrado que la Noradrenalina activa predominantemente adrenoreceptores α_1 y β_1 y muestra mayor afinidad por adrenoreceptores β_1, mientras que la Adrenalina es un fuerte estimulador de receptores β. (Motulsky, 1982; Benschop 1996). Los receptores β2 están presentes en casi todos los tipos de células del sistema inmune, con la notable excepción de las clonas Th2. (Madden, 2003).

1.5 Catecolaminas, inervación simpática y sistema inmune.

Las catecolaminas modulan una amplia gama de actividades de las células del sistema inmune, incluyendo proliferación celular, producción de citocinas, de anticuerpos, actividad lítica y migración. Las catecolaminas pueden aumentar o suprimir la función inmune. (Maes, M., 1998). La Norepinefrina y adrenalina estimulan los receptores adrenérgicos (AR) α y β de la superficie celular con diferentes afinidades. Los receptores β2 están

presentes en casi todos los tipos de células del sistema inmune, con la notable excepción de las clonas Th2. (Madden, 2003).

1.5.1 Efectos del estrés en la función inmune

Se ha mostrado que el estrés tiene efectos perjudiciales en el sistema inmune. Estos efectos incluyen cambios en la población de linfocitos, en la proporción de células Th, disminución en la proliferación de linfocitos en la actividad y en el número de células NK, deterioro en la respuesta de anticuerpos y en la reactivación de infecciones virales latentes. (Webster, 2008). Se ha reportado que los niveles intestinales de SIgA disminuyen en respuesta al estrés crónico (Jarillo-Luna, 2008). Asimismo en un estudio se reportó una disminución de los niveles del mRNA de IgA en célula epitelial de ratas winstar sometidas a simpatectomía química. (Reyna-Garfias, 2010).

1.6 Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

Paradójicamente, la inmunidad sistémica no protege, o lo hace de una manera muy ineficiente, a la piel y a las mucosas, que son las principales superficies de contacto de nuestro cuerpo con el medio. Las mucosas respiratoria y digestiva del organismo tienen, en conjunto, una superficie de casi 400 m^2, doscientas veces mayor que la de la piel. De ahí que sean el sitio de contacto más frecuente por donde los agentes patógenos se asientan o penetran produciendo neumonías y diarreas, que son las enfermedades más prevalentes en nuestro medio y la causa principal de mortalidad infantil e incapacidad transitoria de un gran número de adultos. (Brandtzaeg P. 2007).

El sistema inmunitario de las mucosas, conocido también como tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, por sus siglas en inglés) es un conjunto de linfocitos y células accesorias, a menudo organizadas en estructuras anatómicas separadas y que se localizan bajo el epitelio de los aparatos digestivo y respiratorio. (Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. 2008)

Los compartimientos del sistema inmune de mucosas pueden dividirse principalmente en sitio inductor, donde los antígenos realizan una estimulación en la superficie mucosa a células T naive y linfocitos B; y un sitio efector donde las células efectoras después de la extravasación, retención y diferenciación realizan su acción, para poder contribuir a la formación de IgA.

Los sitios inductores para la inmunidad de las mucosas están constituidos por MALT, ganglios locales y regionales del drenaje linfático de la mucosa, mientras que los sitios efectores consisten en diferentes compartimentos histológicos, donde se incluye la lámina propia de diversas mucosas, estroma de las glándulas exocrinas y epitelios de superficie. (Brandtzaeg P. 2008)

En contraste con lo que ocurre dentro de nuestro organismo (por ejemplo, en el bazo, el hígado o el riñón, donde es intolerable la presencia de agentes extraños o células transformadas), en las mucosas, por ser una interface entre el interior y el exterior de nuestro cuerpo, normalmente se encuentran grandes cantidades de moléculas extrañas y microorganismos. Así, el sistema inmune de las mucosas debe inducir: a) una respuesta especializada que genere tolerancia o no reacción contra las moléculas benéficas; b) una respuesta inmune no esterilizante para la flora normal, y c) una inmunidad esterilizante contra los patógenos.

Esta triple función determina las diferencias principales entre el sistema inmune interno y el de las mucosas, por lo que las funciones principales del sistema inmune de las mucosas son la inducción de tolerancia, la adaptación al medio y la protección.

1.7 Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)

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 placas de Peyer (PP, por sus siglas en inglés) intestinales son los sitios inductores reconocidos del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en ingles). 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, por sus siglas en inglés), con capacidad fagocitica, que expresan en su superficie moléculas especiales, denominadas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II, por sus siglas en inglés), que las capacita como células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés).

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 linfocitos 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 en un derrotero que les permitirá alcanzar sitios lejanos como la glándula mamaria y los tractos respiratorio y genitourinario. Finalmente, la mayoría de esas células llegan a la lamina 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. (Kaetzel C.S. 2005) (Figura 2)

De esta manera, al menos en teoría, las principales mucosas del organismo quedan protegidas contra un patógeno determinado a través del MALT.

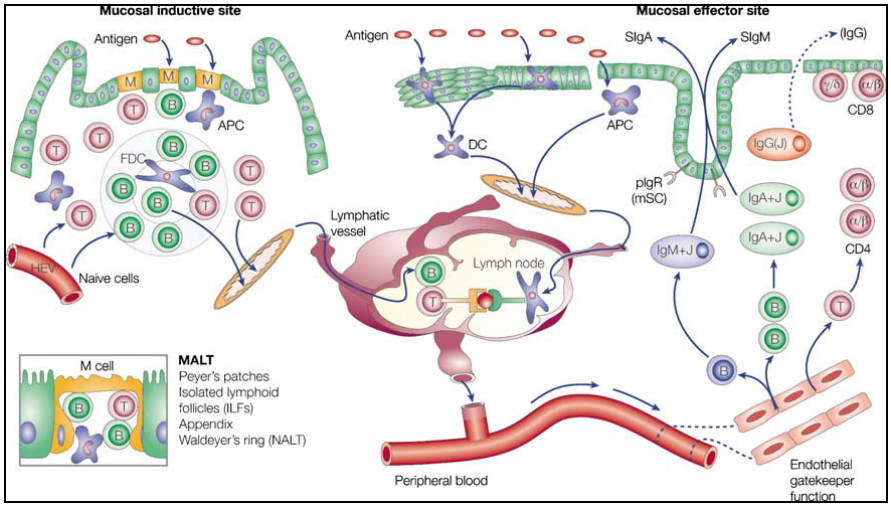

Figura 2. Descripción del tejido linfoide asociado a intestino. Una vez efectuada la captación se inicia el proceso de transitocis: las células M internalizan los antígenos luminales mediante mecanismos de endocitosis o fagocitosis y los transportan a través de sus vesículas hacia la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular. Las células M captan y transportan los antígenos luminales hacia las células presentadoras de antígenos situadas en la cúpula de las placas de peyer. Las APC pueden interaccionar con los linfocitos T de las áreas interfoliculares de las placas de peyer o migrar a los ganglios linfáticos mesentéricos a través de vasos linfáticos. Una vez activados, los linfocitos productores de IgA migran hacia la lámina propia donde se realiza la síntesis de IgA y su posterior transporte, por medio del pigR a través de la célula epitelial hacia la luz intestinal. (Gleeson, M., Pyne, D.B. (2000)

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. (Sano, Y., 2007). Los lugares de la mucosa que alojan a las células efectoras y las de memoria se denominan sitios efectores.

El tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) en el tracto respiratorio y la LP en el gastrointestinal son los sitios efectores reconocidos de esas 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. (Brandtzaeg P. 2007; Kraehebul y Neutra, 1992; Phillips-Quagliata y col., 1994; Lamm y col., 2002).

2. Planteamiento del problema.

¿Qué efecto tienen las catecolaminas liberadas por efecto del estrés agudo sobre la síntesis, transporte y secreción de IgA en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal de ratones Balb/c?

3. Justificación

Estudios del efecto del estrés crónico sobre la inmunidad de la mucosa intestinal han demostrado un aumento en los niveles de IgA en el lumen del intestino delgado. Sin embargo no está claro si el aumento de esta proteína se debe a un aumento en el transporte y secreción de la misma o a un cambio en la permeabilidad intestinal secundaria al estrés.

Otro aspecto de gran relevancia es la falta de estudios que demuestren el papel individual de las catecolaminas y los glucocorticoides, los cuales son considerados como “hormonas del estrés”, sobre las modificaciones de la inmunidad intestinal observadas durante el estrés.

4. Hipótesis

Puesto que las catecolaminas aumentan los niveles de IgA en líquido intestinal, los ratones con simpatectomía química o bloqueo de receptores alfa y beta adrenérgicos sometidos a estrés agudo presentarán modificaciones en los niveles de IgA y en la expresión del pIgR.

5. Objetivo general

Determinar el efecto del Sistema Nervioso Simpático sobre el transporte y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/c bajo condiciones fisiológicas y de estrés agudo.

6. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del bloqueo de receptores adrenérgicos alfa y beta sobre el transporte y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/c bajo condiciones fisiológicas y de estrés agudo.
2. Evaluar el efecto de la simpatectomía química sobre el transporte y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/c bajo condiciones fisiológicas y de estrés agudo.

7. METODOLOGIA

7.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c machos de 8 a 12 semanas de edad con un peso de 25 a 30 g obtenidos del Bioterío de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. El manejo de los animales se hizo en conformidad con las regulaciones federales de México para la atención y experimentación animal (NOM-062-Z00-1999, Secretaría de agricultura, Ciudad de México, México) y de acuerdo a las normas de la Comisión de Bioética de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Los ratones mantuvieron en grupos de 5 animales en cajas de plástico, aislados del ruido y sin variaciones de temperatura. Todos los ensayos se iniciaron a las 7 de la mañana para evitar la influencia del ciclo circadiano sobre la secreción hormonal.

7.2 Grupos experimentales

Se formaron 6 grupos de experimentación:

1) Grupo control
2) Grupo control sometidos a estrés agudo
3) Grupo con simpatectomía química
4) Grupo con simpatectomía química sometidos a estrés agudo
5) Grupo con bloqueo de receptores adrenérgicos
6) Grupo con bloqueo de receptores adrenérgicos sometidos a estrés agudo

En el presente trabajo se realizo por un lado el bloqueo de receptores adrenérgicos presentes en todas las células del organismo, incluyendo las pertenecientes al sistema inmunológico y por otro lado se realizó una simpatectomía química, la cual produce destrucción de los cuerpos intervertebrales simpáticos con lo que se evitó la síntesis de catecolaminas, lo anterior se hizo con la finalidad de evaluar la relación que guardan las catecolaminas con el transporte y la secreción de IgA.

Bloqueo de receptores adrenérgicos

a) **Bloqueo de receptores adrenérgicos alfa:** los animales fueron inoculados con fentolamina a una dosis de 15 mg/Kg de peso diluida en solución inyectable por vía intraperitoneal (Eijkelkamp et al., 2007).
b) **Bloqueo de receptores adrenérgicos beta**: los animales fueron inoculados con nadolol a una dosis de 5 mg/Kg de peso diluida en solución inyectable por vía intraperitoneal (Eijkelkamp et al., 2007).

Simpatectomía química

Los ratones fueron inoculados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a dosis de 100 mg/kg de peso, diluida en solución inyectable, por vía intraperitoneal 48 h antes de iniciar el protocolo de estrés.

7.3 Protocolo de estrés

El estrés se indujo por inmovilización durante 1 h. Para esto los ratones fueron fijados con cinta adhesiva de sus 4 extremidades y la cola sobre una plancha quirúrgica durante 1 hora. Este protocolo se aplico 30 min después de

la administración de solución inyectable (grupo control) o de la administración del nadolol y la fentolamina (grupo con bloqueo de receptores) y después de 48 h de la administración de 6-0HDA (grupo con simpatectomía).

7.4 Obtención de material biológico

7.4.1 Líquidos intestinales.

El intestino delgado fue disecado y se pasaron a través del lumen 5 mL de PBS 1X obteniendo muestras de líquido intestinal de cada ratón. El líquido intestinal fue centrifugado a 4500 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue almacenado a –70 °C hasta su análisis para la determinación de SIgA por Western Blot.

7.4.2 Células epiteliales

Para evitar la contaminación de las células epiteliales de las placas de Peyer en el extracto de células epiteliales, las placas fueron disecadas y posteriormente el intestino fue evertido para exponer el epitelio.

El intestino fue incubado con 50 mL de una solución de EDTA (Hycel de México, 4027) en baño María 37 °C en agitación constante 1500 rpm durante 30 min. El intestino fue disgregado con un embolo de jeringa para desprender las células epiteliales y los linfocitos intraepiteliales. La suspensión celular fue filtrada con una malla de organza transferida a un tubo cónico y centrifugada a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y, el botón celular fue resuspendido con 10 mL de medio RPMI y nuevamente filtrado por una malla de organza. La suspensión celular fue centrifugada bajo las mismas

condiciones y el botón celular fue resuspendido en 4 mL de Percoll al 20% y transferido a un tubo de plástico cónico que contenía percoll al 40% con la finalidad de formar un gradiente (20:40). Los tubos fueron centrifugados durante 35 minutos a 2500 rpm a 4 °C con 0 de aceleración y 0 de desaceleración. Se recuperaron las células obtenidas de la interface que corresponden a las células epiteliales, se lavaron con 10 mL de medio cultivo RPMI y se centrifugaron a 1500 rpm, por 10 min, a 4°C, con la finalidad de eliminar el excedente de Percoll y así evitar la muerte celular ocasionada por este medio. Posteriormente el botón celular obtenido fue resuspendido con 1 mL de búfer de lisis RIPA al cual se le agregaron 400 µL de un cóctel inhibidor de proteasas (Mini complete, Roche Diagnostics GmbH, USA, 11836145001), se homogenizo en un agitador vortex y se centrifugo a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C para la recuperación del extracto proteico. El sobrenadante fue almacenado a -70 °C hasta el momento de su análisis para detección de IgA y pIgR mediante la técnica de Western Blot.

7.5 Determinación de SIgA en liquido intestinal y de IgA y pIgR y en células epiteliales por la técnica de Western Blot

La concentración proteica de cada muestra fue determinada por el método de Bradford. Cada muestra se incubó a baño Maria a 80°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se utilizaron 30 µg de cada extracto proteico/pozo en un gel de poliacrilamida al 10 %. La electroforesis se llevo a cabo a 88 V durante 2 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana a 18 V para pIgR y 20 V para IgA durante 60 min en una cámara de transferencia semi-seca

Para la determinación de IgA y de SIgA las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche al 5% (w/v) en búfer PBS-Tween al 0.05%, pH 7.4 (PBS-T), durante 2 h en agitación continúa e incubadas con una solución de anticuerpo primario policlonal anti-IgA (anti conejo) a una dilución 1:10,000, durante toda la noche en refrigeración y en agitación continua. Posteriormente se realizaron 3 lavados de las membranas con solución PBS-T de 10 min cada uno en agitación.

Para la determinación de pIgR, las membranas fueron bloqueadas con una solución de gelatina de pescado al 1% (w/v) diluida en búfer PBS-T durante 2 h en agitación continua. Posteriormente las membranas fueron incubadas con una solución de anticuerpo primario policlonal anti-componente secretor (SC) a una dilución 1:10 000, durante toda la noche en refrigeración y en agitación continua. Después se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución PBS-T y las membranas se incubaron con una solución de anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:10 000 en gelatina de pescado durante 2 h a TA en agitación constante. Se realizaron 3 lavados de las membranas de 10 min cada uno con solución PBS-T.

Después de realizar los lavados, las membranas fueron incubadas durante 1 min con luminol y las bandas fueron detectadas usando una película fotográfica con una exposición de 30 s para IgA y 2 min para pIgR. La densitometría de las bandas de proteínas fue determinada con el software Quantity One 1-D.

7.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba *t* de student con el programa estadístico Sigma Plot versión 11.0. La significancia estadística se consideró cuando el valor de P fue menor o igual a 0.05.

Se utilizo la prueba estadística de Q de Dixon para eliminar aquellos valores atípicos el valor atípico de cada uno de los grupos experimentales.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de SIgA intraluminal en intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos.

Los niveles de SIgA en el lumen del intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores alfa adrenérgicos fentolamina) y beta adrenérgicos (nadolol) con y sin estrés fueron determinados por la técnica de western blot (Figura 3).

En ambos grupos de ratones a los cuales se les administró un antagonista de receptores adrenérgicos no mostraron diferencia significativa con respecto al grupo control sin estrés. Los ratones control sometidos a estrés (C+E) aumentaron significativamente los niveles de SIgA en el intestino delgado ($P<0.001$). Los ratones con bloqueo de receptores alfa-adrenérgicos y sometidos a estrés (F+E) aumentaron significativamente los niveles de SIgA con respecto al control (C, $P<0.001$) y con respecto al grupo con bloqueo de receptores sin estrés (F, $P<0.001$). Sin embargo este aumento de IgA fue significativamente más bajo con respecto al grupo control sometido a estrés (C+E; $P=0.002$).

En los ratones con bloqueo de receptores beta-adrenérgicos (nadolol) los niveles de SIgA dismuyeron significativamente cuando fueron sometidos a estrés en comparación con sus grupos control (C+E, $P<0.001$; N, $P<0.001$).

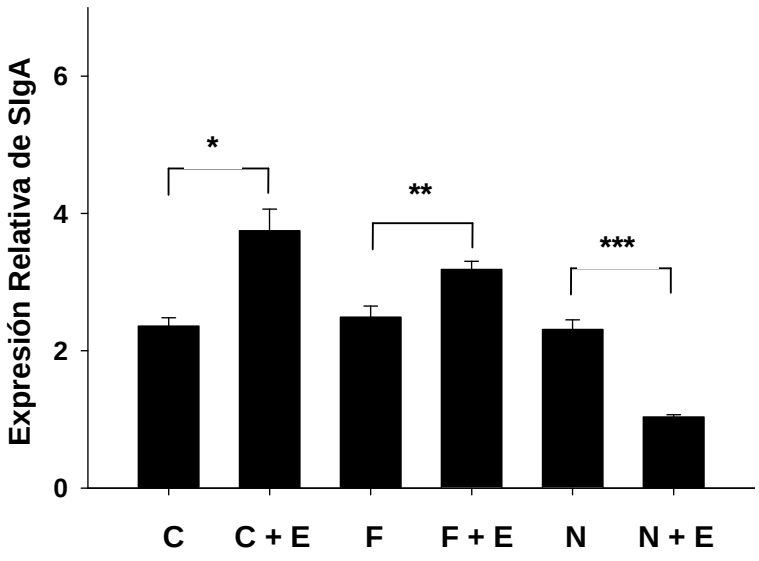

Figura 3. Efecto del estrés agudo sobre la secreción de SIgA en ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos. La expresión de IgA se determinó por la técnica de WB. Los resultados representan la media ± la DS de 2 experimentos independientes entre sí con una n=6 ratones/grupo en cada ensayo. Los niveles de IgA en los ratones con bloqueo de receptores alfa adrenérgicos y beta adrenérgicos sometidos a estrés fueron significativamente más bajos con respecto al grupo control más estrés.

Grupos: C, grupo control; C+E, control más estrés;F, Fentolamina, F+E, fentolamina más estrés, N, nadolol, N+E, nadolol más estrés.

*P <0.001, **P= <0.001, ***P=<0.001

8.2 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de IgA en células epiteliales del intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos

Los niveles de IgA en células epiteliales de la mucosa del intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores alfa adrenérgicos fentolamina) y beta adrenérgicos (nadolol) con y sin estrés fueron determinados por la técnica de western blot (Figura 4).

Los grupos de ratones con bloqueo de receptores alfa (F) y beta (N) adrenérgicos presentaron una disminución significativa de los niveles de IgA en células epiteliales con respecto al grupo control (C; $P<0.001$ y $P<0.001$, respectivamente). Los ratones control sometidos a estrés (C+E) aumentaron significativamente los niveles de IgA con respecto al grupo control sin estrés (C; $P<0.001$). En el caso de los ratones tratados con fentolamina (F+E) los niveles de IgA disminuyeron significativamente después del periodo de estrés en comparación con el grupo control (C; $P<0.001$), el grupo control sometido a estrés (C+E; $P<0.001$) y a los ratones con bloqueo de receptores alfa adrenérgico sin estrés (F; $P<0.001$). En el caso de los ratones con bloqueo de receptores beta adrenérgicos sometidos a estrés (N+E) los niveles de IgA se mantuvieron disminuidos significativamente en comparación con los grupos control (C; $P<0.001$) y control sometido a estrés (C+E, $P<0.001$). Sin embargo no hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo con bloqueo de receptores sin estrés (N; $P=0.384$) (Figura 4).

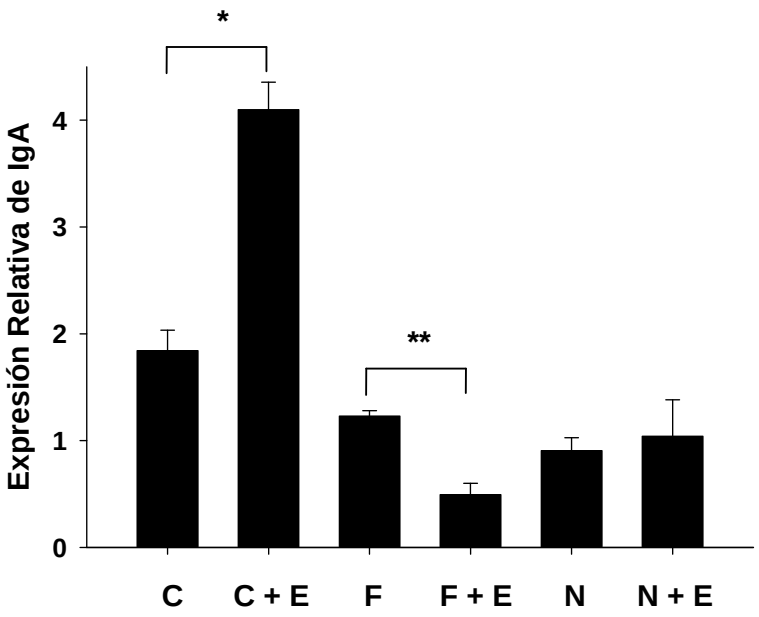

Figura 4. Efecto del estrés agudo sobre la expresión de IgA en células epiteliales de intestino delgado de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos por western blot.

Los resultados representan la media ± la DS de 2 experimentos independientes entre sí con una n=6 ratones/grupo en cada ensayo. Los ratones con bloqueo de receptores alfa y beta adrenérgicos no aumentaron los niveles de IgA en respuesta al estrés como se observa en el grupo control (C+E).

Grupos: C, grupo control; C+E, control más estrés;F, Fentolamina, F+E, fentolamina más estrés, N, nadolol, N+E, nadolol más estrés.

*P= <0.001, ** P= <0.001

8.3 Efecto del estrés agudo sobre el transporte de IgA en ratones con bloqueo de receptores alfa y beta adrenérgicos

Para evaluar el transporte de IgA en el epitelio de la mucosa del intestino delgado se determinó la expresión de pIgR en células epiteliales por la técnica de western blot.

Los ratones con bloqueo de receptores alfa y beta adrenérgicos no mostraron cambios significativos sobre la expresión de pIgR en células epiteliales con respecto al grupo control. Cuando los ratones control son sometidos a estrés la expresión de pIgR aumenta significativamente ($P < 0.001$). Sin embargo este efecto se pierde cuando los ratones son tratados previamente con bloqueados de receptores alfa (fentolamina) y beta (nadolol) adrenérgicos (Figura 5).

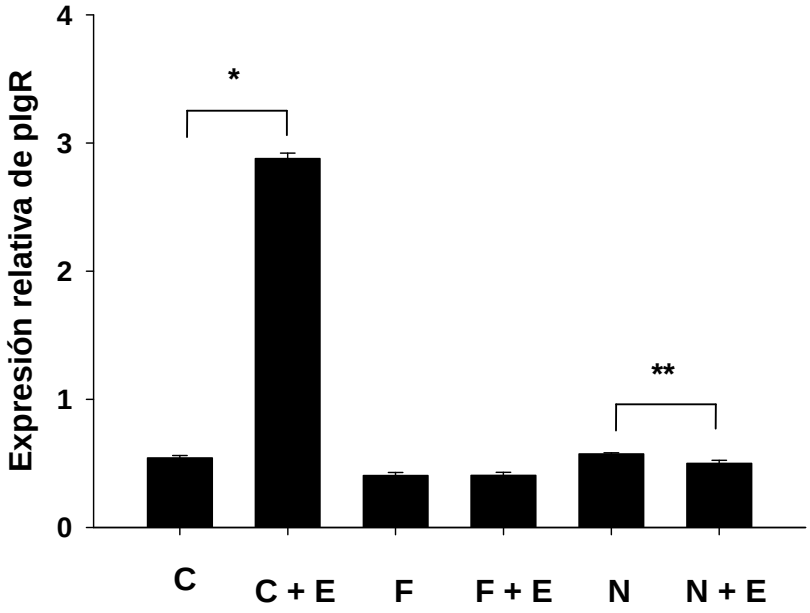

Figura 5. Efecto del estrés agudo en la expresión del piar en célula epitelial de ratones sometidos a bloqueo de receptores adrenérgicos evaluado por western blot. Los resultados representan la media ± la DS de 2 experimentos independientes entre sí con una n=6 ratones/grupo en cada ensayo. Los ratones control sometidos a estrés aumentaron significativamente los niveles de pIgR, sin embargo los ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos pierden totalmente esta respuesta ante el estrés (F+E y N+E).

Grupos: C, grupo control; C+E, control más estrés; F, Fentolamina, F+E, fentolamina más estrés, N, nadolol, N+E, nadolol más estrés. nadolol, N+E, nadolol más estrés.

*P <0.001, **P <0.001

8.4 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de SIgA en liquido intestinal en ratones con simpatectomía química

Con la finalidad de eliminar las terminaciones nerviosas simpáticas y así evitar la liberación de la noradrenalina a la circulación se administró la neurotoxina 6-OHDA 48 h previas al periodo de estrés.

Los niveles de SIgA en líquido del intestino delgado de todos los grupos de estudio se determinó por la técnica de western-blot.

Los ratones con simpatectomía química aumentaron significativamente los niveles de SIgA en comparación con el grupo control ($P<0.001$). Los ratones control sometidos a estrés también aumentaron significativamente los niveles de SIgA ($P<0.001$). Sin embargo los ratones con simpatectomía química sometidos a estrés disminuyeron significativamente los niveles de SIgA en comparación con los ratones tratados sin estrés ($P<0.001$), mostrando niveles más elevados en comparacióncon los ratones control sin estrés ($P<0.001$). (Figura 6).

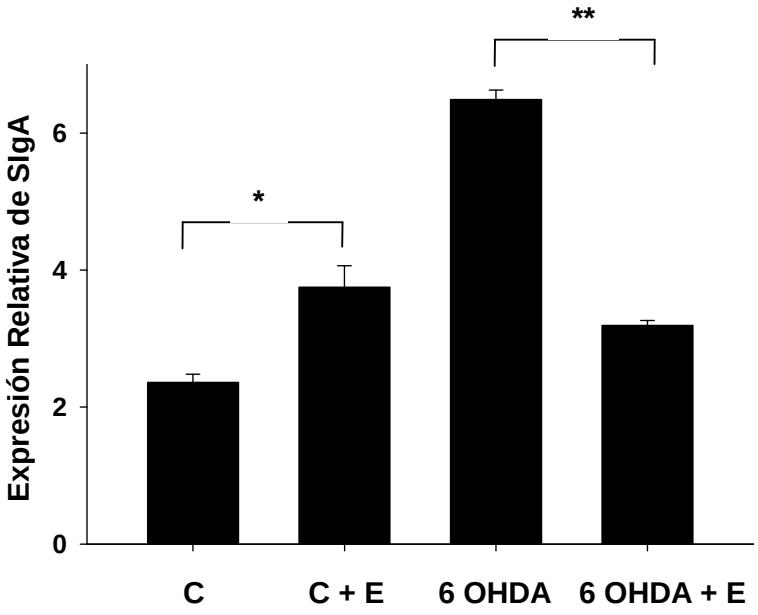

Figura 6. Efecto del estrés agudo en la secreción de SIgA en liquido intestinal de ratones sometidos a simpatectomía química evaluada por western blot. Los resultados representan la media ± la DS de 2 experimentos independientes entre sí con una n=6 ratones/grupo en cada ensayo. En el grupo de ratones a los cuales se les administro solamente 6-OHDA mostraron un aumento en los niveles de SIgA, este aumento no se mantuvo en al grupo al que se le administro dicho fármaco y posteriormente se le sometió a estrés agudo.

Grupos: C, grupo control; C+E, control más estrés; 6-OHDA, 6 Hidroxidopamina; 6-OHDA+E, 6 Hidroxidopamina más estrés.

*P<0.001, **P= <0.001

8.5 Efecto del estrés agudo por inmovilización sobre los niveles de IgA en células epiteliales en ratones con simpatectomía química

Los niveles de IgA en células epiteliales aumentaron significativamente en el grupo de ratones a los cuales se les sometió a estrés agudo ($P<0.001$).

A los ratones a los cuales se les administró 6-OHDA no mostraron cambios significativos con respecto al grupo control ($P=0.593$). Por otro lado al grupo al que se le administró 6 OHDA y posteriormente se le sometió a estrés agudo mostro una disminución en los niveles de IgA con respecto al grupo control más estrés ($P<0.001$) siendo los niveles de esta proteína significativamente más bajos con respecto al grupo control más estrés. (Figura 7)

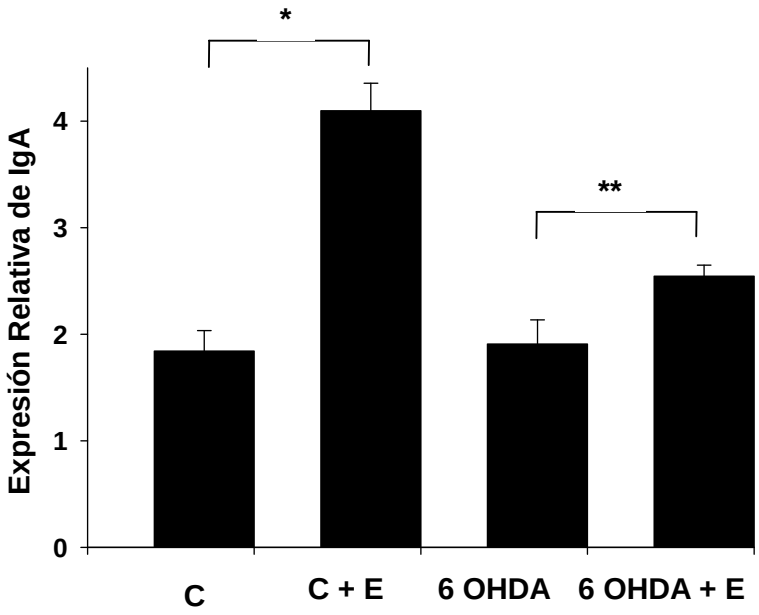

Figura 7. Efecto del estrés agudo en la IgA en célula epitelial de ratones sometidos a simpatectomía química evaluada por Western Blot. Los resultados representan la media ± la DS de 2 experimentos independientes entre sí con una n=6 ratones/grupo en cada ensayo. Los niveles de IgA en célula epitelial mostraron aumento en el grupo de ratones a los cuales se les sometió a estrés agudo. A los ratones a los cuales se les administró 6-OHDA no mostraron cambios significativos con respecto al grupo control. Por otro lado al grupo al que se le administró 6 OHDA y posteriormente se le sometió a estrés agudo mostro una disminución significativa ($p<0.001$) en los niveles de IgA con respecto a su grupo control (grupo al que se le administro vehículo -agua inyectabe- y posteriormente se sometió a estés agudo).

Grupos: C, grupo control; C+E, control más estrés; 6-OHDA, 6 Hidroxidopamina; 6-OHDA+E, 6 Hidroxidopamina más estrés.

*P<0.001, **P<0.001

8.6 Efecto del estrés agudo sobre los niveles de pIgR en células epiteliales en ratones con simpatectomía química

Para evaluar el proceso de transitosis de IgA en el epitelio de la mucosa del intestino delgado se determinó la expresión de pIgR en células epiteliales por la técnica de western blot.

Los ratones con simpatectomía no presentaron cambios significativos sobre los niveles de pIgR en comparación con el grupo control ($P=0.057$).

Ambos grupos de ratones sometidos a estrés (control y con simpatectomía) aumentaron significativamente la expresión de esta proteína en comparación con el grupo control sin estrés ($P<0.001$ y $P<0.001$, respectivamente) sin embargo los niveles de pIgR fueron significativamente más bajos en el grupo con simpatectomía química (6-OHDA+E) en comparación con el grupo control (C+E; $P<0.001$), ambos bajo condiciones de estrés (Figura 8)

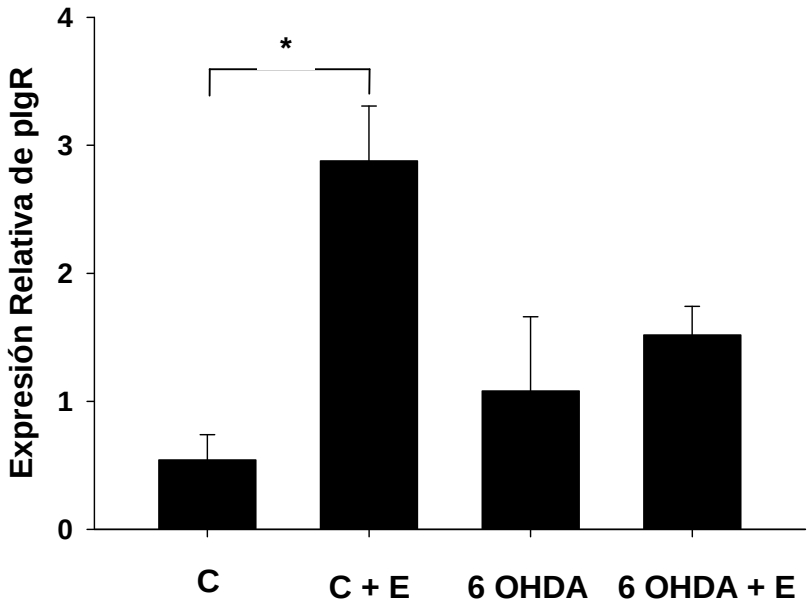

Figura 8. **Efecto del estrés agudo en la expresión del pIgR en célula epitelial de ratones sometidos a simpatectomía química evaluado por western blot.**. Los resultados representan la media ± la DS de 2 experimentos independientes entre sí con una n=6 ratones/grupo en cada ensayo. Se observo que al grupo de ratones a los cuales se les sometió a estrés agudo por inmovilización, los niveles de pIgR aumentaron con respecto al grupo control, este aumento no se mantuvo en los grupos en los que, por un lado se les administro 6 OHDA y en el grupo al que se le administró dicho medicamento y posteriormente se le sometió a estés agudo.

Grupos: C, grupo control; C+E, control más estrés; 6-OHDA, 6 Hidroxidopamina; 6-OHDA+E, 6 Hidroxidopamina más estrés.

*P<0.001

9. DISCUSION

Son escasos los trabajos acerca de los efectos del sistema nervioso simpático en la respuesta inmunológica a nivel de mucosa intestinal. En el presente trabajo se utilizaron diferentes tratamientos con la finalizad de analizar el efecto que tiene el sistema nervioso simpático, a través de las catecolaminas, consideradas como hormonas del estrés, en el transporte y secreción de IgA (Bosch J.A, 2002)

Actualmente es bien reconocido en papel que juegan en sistema neuroendocrino, a través de las catecolaminas y los glucocorticoides, sobre la respuesta inmune ante el estrés ya que se ha demostrado que un mecanismo regulador es proporcionado por complejas interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico. Uno de los mecanismo por el cual señales del sistema inmune pueden regular la actividad del sistema nervioso, es a través de la estimulación de receptores de citocinas expresados expresadas en células pertenecientes al sistema inmunológico y células presentes en el sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en ingles). (Kohm and Sanders, , 2001)

Dentro de las catecolaminas que mejor se han descrito en su interacción con el sistema inmune se encuentran la adrenalina y la noradrenalina. (Madden, 2003). Hasta el momento los efectos que se han atribuido a estas hormonas sobre el tejido linofoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) se encuentran descritos en estudios donde evalúa el efecto de las hormonas liberadas durante el estrés crónico sobre la mucosa intestinal (Jarillo Luna, 2008, Oros Pantoja, 2010), en dichos estudios se ha encontrado reducción en

el población de linfocitos intraepiteliales en el intestino delgado y disminución en el porcentaje de linfocitos T $CD3^+$ y $TCD4^+$ respectivamente. Sin embargo son pocos los estudios que han evaluado el efecto que tiene el estrés agudo sobre el GALT.

Antecedentes de nuestro laboratorio han mostrado que durante el estrés agudo inducido por inmovilización de 4h, hay un aumento en los niveles de IgA en el lumen del intestino delgado en ratones. Sin embargo se desconoce si este efecto es secundario a la liberación de glucocorticoides y catecolaminas y también el papel individual de cada una de estas hormonas (adrenalina, noradrenalina y corticosterona). Otra duda que surge al respecto es saber si el efecto vasoconstrictor de las catecolaminas sobre la mucosa intestinal participa de manera significativa sobre los niveles de IgA al aumentar la permeabilidad intestinal o si el aumento de los niveles de esta proteína son secundarios a la activación de células del sistema inmune, lo que favorece el transporte y secreción de esta inmunoglobulina.

Lo anterior abre la necesidad de diseñar un modelo experimental que explique el mecanismo por el cual los niveles de IgA aumentan en el lumen intestinal después del estrés y por otro lado saber el papel que juegan cada una de las hormonas del estrés en este proceso.

Para esto se diseño un modelo experimental donde se evaluó el transporte y secreción de IgA en la mucosa del intestino delgado de ratones Balb/C como mecanismos que pudiera explicar porque los niveles de IgA aumentan después del estrés. Y por otra parte se utilizaron fármacos que tienen la capacidad de bloquear selectivamente los receptores de las catecolaminas (fentolamina y nadolol) y un fármaco que bloquea la secreción de la noradrenalina en las

terminales nerviosas (6-hidroxidopamina, 6-OHDA) con la finalidad de saber el papel independiente que tiene cada una de estas hormonas sobre el transporte y secreción de esta inmunoglobulina después del periodo de estrés agudo. Para esto se incluyeron tres grupos de estudio: ratones control, ratones con bloqueo de receptores alfa y beta adrenérgicos y ratones con simpatectomía química. Estos grupos a su vez se subdividieron aleatoriamente en ratones sin estrés y ratones sometidos a estrés agudo.

El modelo de estrés agudo utilizado fue la inmovilización de las cuatro extremidades y de la cola durante 4 h.

Después de la síntesis del receptor para inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) en las células epiteliales de la mucosa, este es transportado a la superficie basolateral de las células epiteliales de la mucosa donde el dominio extracelular del pIgR se une principalmente a la IgA y sufre transitosis (transporte) a través del epitelio y de las mucosas. Al llegar a la superficie apical, en el plano extracelular, el dominio unido a su ligando es separado y liberado y como componente secretor (SC, por sus siglas en ingles) unido a la IgA polimérica, así forman la SIgA, es así como se lleva a cabo el transporte y la secreción de IgA en la mucosa intestinal. (Kaetzel, 2005, Brandtzaeg, 2009).

Para evaluar el transporte de IgA, se determinó por la técnica de western Blot la expresión del receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) en células de epitelio de la mucosa del intestino delgado en cada grupo de estudio.

Para evaluar la secreción de esta inmunoglobulina se determinó la expresión de la IgA en células epiteliales de la mucosa intestinal y la concentración de SIgA en líquido del intestino delgado por la técnica de western Blot.

9.1 Bloqueo de receptores adrenérgicos

La concentración de SIgA en líquido intestinal no se vio alterada en el grupo de ratones a los cuales se les administró solamente Fentolamina o Nadolol, en relación con su grupo control.

El grupo de ratones a los cuales se les administró fentolamina y posteriormente se les sometió a estrés agudo mostró una disminución en los niveles de IgA, con respecto a su grupo control. Esta disminución fue más intensa en el grupo al cual se le administró nadolol y posteriormente se le sometió a estrés agudo.

Lo anterior demuestra el papel importante que juegan las catecolaminas como inmunomoduladores en la secreción de IgA, a través de los receptores alfa beta adrenérgicos, los cuales al ser bloqueados impiden que los niveles de SIgA alcancen los niveles logrados en el grupo control. A su vez este aumento puede estas mediado en parte por los glucocorticoides, también consideradas hormonas del estrés, hormonas que también se elevan durante el estrés y las cuales se ha demostrado que juegan un importante papel en la función de la IgA. (Martínez Carrillo, 2010)

Por otro lado observamos una disminución mucho más marcada en los niveles de SIgA en el grupo de ratones a los cuales se realizó en bloqueo de receptores beta adrenérgicos y posteriormente se les sometió a estrés agudo, esto refleja la mayor influencia que pueden tener los receptores beta adrenérgicos en el transporte de la IgA, influencia que puede estar dada por una mayor presencia de dichos receptores a nivel de célula plasmática y/o célula epitelial, lo cual ocasiona una importante influencia en la secreción de

IgA. Lo anterior guarda relación con estudios que demuestran que los linfocitos B y T expresan casi exclusivamente receptores adrenérgicos β (Sanders, 2001). Por otro lado también podríamos considerar que dicho resultado se debe al efecto vasoconstrictor que posee el Nadolol, efecto que se ha observado ser más potente en comparación con la Fentolamina.

A nivel de célula epitelial se observó que los niveles de IgA aumentan en respuesta al estrés agudo, esto guarda relación con estudios donde se reporta dicho efecto. Al realizar el bloqueo de receptores adrenérgicos alfa y beta (Fentolamina y Nadolol, respectivamente) se observó una disminución en los niveles de IgA con respecto a su grupo control. Asimismo se observo que al administrar los medicamentos mencionados y posteriormente someter a cada grupo al protocolo de estrés agudo por inmovilización, esto mantuvo una disminución en los niveles de IgA.

Lo anterior demuestra que el estrés en presencia de bloqueo de receptores adrenérgicos no es suficiente para lograr una aumento en los niveles de IgA en célula epitelial y nos habla, a su vez, del importante efecto que tienen los receptores adrenérgicos y por lo tanto las catecolaminas en mantener niveles basales de IgA adecuados en condiciones ficiologicas y también al lograr el aumento de la misma para hacer frente a una situación de estrés. Estos resultados coinciden con los estudios realizados previamente donde se encontró que posterior a someter a un varios sujetos a un modelo de estrés agudo se encontraron niveles elevados de SIgA. (Ring, 2000)

Al evaluar el efecto que tienen las catecolaminas en el pIgR observamos resultados similares a los encontrados al evaluar a la IgA en célula epitelial.

Cabe recordar que por cada molécula de pIgR que es transportada a través de la célula epitelial se secreta una molécula de IgA. (Mostov, K.E. 1994)

Al igual que en el grupo anteriormente estudiado aquí también pudimos observar la importante relación que guardan las catecolaminas con el transporte de la IgA, el cual está determinado por el pIgR, dado que observamos un aumento de los niveles de pIgR en el grupo al cual se le administró agua inyectable y posteriormente se le sometió a estrés agudo, efecto que se vio abatido al bloquear los receptores alfa adrenérgicos. Con esto se demuestra que las catecolaminas son necesarias para que se lleve a cabo un adecuado transporte de la IgA en célula epitelial y que en ausencia de la función de estas, la respuesta de los glucocorticoides no es suficiente para hacer frente a un efecto de estrés. Este efecto inhibidor que ejerce el estrés sobre el pIgR y el cual no es revertido con el bloqueo de receptores adrenérgicos, coincide con estudios donde se ha reportado un incremento en la expresión del mRNA del pIgR posterior a la administración de fentolamina. (Reyna Garfias, 2010)

9.2 Simpatectomía química

Con la finalidad de evaluar de una forma más amplia el papel que guardan las catecolaminas en el transporte y secreción de la IgA realizamos un modelo en el cual se logra destruir las terminaciones nerviosas adrenérgicas, por medio de la administración de 6 Hidroxidopamina, y con esto producir ausencia de catecolaminas circulantes. (Kruszewska, 1995)

Al evaluar la presencia de SIgA en líquido intestinal observamos que la administración de 6 OHDA ocasionó aumento en los niveles de SIgA, respecto con el grupo control. Este aumento no se mantuvo en el grupo de ratones a los que posterior a la administración de 6 OHDA se les sometió a estrés agudo, en los cuales se observo una marcada disminución en los niveles de SIgA con respecto al grupo control. Lo anterior nos habla de que en ausencia de catecolaminas y en condiciones basales, se produce una respuesta inmunoestimulante al producirse aumento de IgA, dicho aumento puede ser secundario a un efecto protector ocasionado por la ausencia de catecolaminas, ya que se ha reportado (Marra S. 2004) que las catecolaminas pueden ocasionar apoptosis a nivel de célula epitelial y de célula plasmática asimismo dicho aumento de IgA puede deberse al efecto que guardan los glucocorticoides en la regulación de la IgA. Por otro lado observamos que los niveles de IgA en el grupo al cual se le administró 6 OHDA y posteriormente se les sometió a estrés agudo, no alcanzaron los niveles correspondientes a su grupo control, lo cual refleja el importante papel que juegan las catecolaminas para responder, por medio del aumento de la IgA, ante una situación de estrés**.**

Al evaluar el efecto de la simpatectomía química, la cual produce destrucción de las terminales nerviosas adrenérgicas y con ello ausencia de catecolaminas circulantes, observamos que al administrar 6 OHDA no se observaron cambios estadísticamente significativos con respecto al grupo control, mientras en el grupo al cual se administro dicho fármaco y posteriormente se sometió a estrés agudo observamos que los niveles de IgA aumentaron pero no a los niveles correspondientes al grupo control. Debido a que en ausencia de catecolaminas y en presencia de estrés agudo no se logra

alcanzar niveles necesarios de IgA para hacer frente a una situación de estrés, consideramos que las catecolaminas juegan un papel importante en el transporte de IgA el cual se ve alterado en ausencia de estas. (Oros Pantoja, 2010)

Al evaluar el efecto que produce el estrés sobre la expresión del receptor para inmunolobulinas poliméricas (pIgR) encontramos que este aumenta en respuesta al estrés, lo cual guarda relación con el aumento de IgA en célula epitelial también producido por efecto del estrés.

Al grupo al que se le administro 6 OHDA no mostró una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de pIgR con respecto a su grupo control. Por otro lado se observo que en ausencia de catecolaminas y en presencia de una situación de estrés agudo, los niveles de pIgR disminuyen con respecto al control, es decir que en ausencia de catecolaminas no se es capaz de emitir una respuesta inmunoprotectora, la cual estaría representada por el aumento dl pIgR, en respuesta a un efecto estresor.

Esto nos habla de la importancia que tienen las catecolaminas como hormonas inmunomoduladoras en la respuesta al estrés, en cuya ausencia la presencia de las otras hormonas del estrés, glucocorticoides principalmente, no son capaces de emitir una respuesta adecuada al estrés.

10. CONCLUSIONES

A. Bloqueo de Receptores Adrenérgicos

- El estrés agudo inducido por inmovilización aumenta los niveles de SIgA en líquido intestinal y de pIgR e IgA en células epiteliales.
- El bloqueo de receptores adrenérgicos disminuye la expresión de IgA en células epiteliales, sin modificar los niveles de SIgA y pIgR
- El bloqueo de receptores adrenérgicos alfa más estrés incrementa los niveles de SIgA y disminuye la expresión de IgA en células epiteliales.
- El bloqueo de receptores adrenérgicos beta más estrés disminuye los niveles de SIgA y de pIgR.

B. Simpatectomía química

- El estrés agudo inducido por inmovilización aumenta los niveles de SIgA en líquido intestinal y de pIgR e IgA en células epiteliales.
- El grupo de ratones sometidos a simpatectomía química mostraron un aumento de la SIgA en liquido intestinal, mientras que la IgA y el pIgR no mostraron cambios significativos con respecto a su grupo control.
- El grupo de ratones a los cuales se les realizo simpatectomía química mostraron que el estrés produce aumento de los niveles de SIgA, IgA y pIgR en respuesta al estrés.

11. PERSPECTIVAS

En el grupo de ratones con bloqueo de receptores adrenérgicos y simpatectomía química:

1. Analizar las células plasmáticas IgA+ en sitios inductores y efectores a nivel intestinal.
2. Analizar la expresión de las citocinas TGF-B, IL-5 e IL6 involucradas en el cambio de isótopo para la IgA.
3. Analizar la expresión de cadena j en célula epitelial.

12. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2008). Inmunología celular y molecular. 6ª ed. México. Elservier Saunders. pp. 346-347.
- Alverdy, J., Aoys, E. (1991). The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired mucosal immunodeficient state. Ann Surg. 214, 719-723.
- Baglole, C.J., Davidson JS., Meddings, JB. (2005). Epithelial distribution of neural receptors in the guinea pig small intestine. Can J Physiol Pharmacol. 83, 389-395.
- Bosch J.A., Ring C., de Geus EJ., Veerman EC., Amerongen AV. (2002). Stress and secretory immunity. Int. Rev. Neurobiol. 52: 213-253.
- Benschop J.R. (1996). Catecholamines.induced leucocytosis: Earlt observations, current research, and future directions. Brain, behavior and immunity 10, 77-91.
- Brandtzaeg P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. Vaccine. 25: 5467-5484.
- Brandtzaeg P. (2009). Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. Scandinavian Journal of Immunology. 70, 505-515.
- Dhabhar, F.S., McEwen. (1997). Acute stress enhances while chronic Stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leucocyte trafficking. Brain Behav. Immun. 11, 286-306.
- Eijkelkamp, N., Engeland, C.G., Gajendrareddy, P.K., Marucha, P.T. (2007) Restraint stress impairs early wound healing in mice via α-adrenergic but not β -adrenergic receptors. Brain Behav. Immun. 21, 409-412.
- Elenkov I.J., Chrousos G.P., (2002). Stress Hormones, Proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 966: 290-303.

- Felten, D. L., & Felten, S.Y. (1988). Sympathetic noradrenergic innervations of immune organs. Brain, Behavior, Immunity. 2, 293-300.

- Felten, S.Y., Felten, D. L. (1988). Noradrenergic sympathetic innervations of lymphoid organs. Progr. Allergy. 43, 14-36.

- Gleeson, M., Pyne, D.B. (2000). Exercise effects on mucosal immunity. Immunology and cell biology. 78, 536-544

- Gómez González B., Escobar A.,(2006). Estrés y sistema Inmune. Rev. Mex. Neuroci. 7: 30-38.

- González-Ariki S. (2006). The role of the synmpathetic innervations of the gut in regulatin mucosal immune response. Brain, behavior and immunity 12, 53-63.

- Goodman& Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 2003. 10ª Edición. Editorial McGraw-Hill.

- Greespan F.S., Gardner D.G. (2005). Endocrinología básica y clínica. 6ª ed. México. El Manual Moderno. pp. 381-393, 463-474.

- Griffin, J.F.T., Thomson, A.J. (1998). Farmed deer: a large animal model for stress. Domest Anim Endocrinol 15, 445-456.

- Jarillo-Luna. (2008). Effect of restraint stress on the population of intestinal intraepithelial lynphocytes in mice. Brain Behav. Immun. 22, 265-275.

- Jarillo-Luna. (2008). Effect of repeated restraint stress on the levels of intestinal IgA en mice. Brain Behav. Immun.32, 681-692.

- Kaetzel C.S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: brinding innate and adaptative immune responses at mucosal surfaces. Immunological Reviews. 206, 83-99

- Kohm Adam P. and Sanders M. Virginia. (2001). Norepinephrine and β2-Adrenergic Receptor stimulation Regulate CD4+ T and B Lymphocyte Function in Vitro and in Vivo. Pharmacological Reviews. 53;487-525.

- Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. Physiol Rev. 72, 853-879.

- Kruszewska, B. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympatectomy in two strains of mice. (1995). The journal of immunology. 155, 4613-4620.

- Kvetnansky Richard (2009). Catecholaminergic system in stress: structural and molecular genetic approaches. Physiol Rev 89, 535-606.

- Landmann, R. (1992). Beta-adrenergic receptors in human leucocyte subpopulations. Eur. J. Clinic. Invest. 22, 30-36.

- Madden Kelley S. (2003). Catecolamines, sympatetic innervation, and immunity. Brain, Behavior, and immunity. S5-S10

- Madden, K.S., Sanders, V., Felten, D.L. (1995) Ctatecholamine influences and sympatectic neural modulation of immune responsiveness. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 417-448.

- Maes, M., Song. (1998). The effects of psychological etress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and Th1-like reponses in stress-induced anxiety). Cytokine. 4, 313-318.

- S. Marra and L. Hoffman-Goetz. (2004). β-adrenergic receptor blockade during exercise decreases intestinal lymphocyte apoptosis but not cell loss in mice. J. Physiol Pharmacol. 82, 465-473.

- Maisel, A.S., Fowler, P., Rearden, A., Motulsky, H.J.,& Michel M.C. (1989). A new method for isolation of human lymphocyte subsets reveals differential regulation of β-adrenergic receptors by terbutaline treatment. Clin. Pharmacol. Ther. 46, 429-439.

- Martínez Carrillo B.E. (2011). Repeated restraint stress reduces the number of IgA-producing cells in Peyer's patches. Neuroimmunomodulation. 18, 131-141.Mostov, K.E. (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins. Annu Rev Immunol. 12, 63-84

- Mostov, K.E. (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins. Annu Rev Immunol. 12, 63-84

- Oros Pantoja, R. (2010). Effects of restraint stress on NALT structure and nasal IgA levels. Immunology letters. 135, 78-87.

- Ottaway, C.A., & Husband, A.J. (1992). Central nervous system influences on lymphocyte migration. Brain, behavior, Immun. 6, 97-116

- Ottaway, C.A., & Husband, A.J. (1994). The influence of neuroendocrine patways on lymphocyte migration. Immunol. Today. 15, 511-517.

- Pacák, K., Palkovits, M. (2001) Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. Endocrine Reviews, 22, 502-548.

- Pederson, B.K., Hoffman-Goetz L. 2000. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation.Physiol. Rev. 80(3): 1055-81

- Phillips y Quagliata, J.M., Lamm, M.E. (1994) Lymphocyte homimg to mucosal effector sites. Handbook of Mucosal immunology. In Oghra, P.L., Metecky, J., Lamm, M.E., strobe, W., McGhee, J.R., Bienenstock, j. (Ed). Academic Press, San Diego, CA, 225-239.

- Reyna-Garfias. Repeated restraint stress IgA concentration in rat small intestine. Brain Behav. Immun. 24: 110-118.

- Sanders, V.M. (2001) Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. Psychoneuroimmunology Academic Pres., pp 161-196.

- Sanders M. Virginia. (2011) The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we undertand it yet? Brain, Behavior and Immunity. Article in press.

- Sano, Y., Gomez FE., Kang W., Lan J., Maeshima Y., Hermsem JL., Ueno C., Kudsk KA. 2007. Intestinal polymeric immunoglobulin receptor is affected by type and route of nutrition. J. Parenter. Enteral. Nutr. 31(5): 351-6

- Stead, R.H. (1991). Interactions of the mucosal immune and peripheral nervous system. Psichoneuroimmunology, pp 177-207.
- Sullivan, D.A., Aundrdown, B.J., Wira, C.R. (1983). Steroid hormone regulation of free secretory component in the rat uterus. Immunology. 49, 379-386.
- Webster Marketon Jeanette I., Gaser Ronald. 2008. Stress hormones and immune function. Celular Immunology. 252:16-26.