

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de



TESIS DOCTORAL

**Modulación del sistema inmune por el estrés : respuesta
tímica y mecanismo de acción**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Maria de la Luz Pérez Mera

Madrid, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

T 577.27



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5324452151

PER
mod

MODULACION DEL SISTEMA INMUNE POR EL ESTRES:

RESPUESTA TIMICA Y MECANISMOS DE ACCION.

Memoria que, para optar al Grado
de Doctor en Biología, presenta
MARIA DE LA LUZ PEREZ MERA.

Santiago de Compostela, Noviembre 1989.



R. i34454391

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social durante los años 1987, 1988 y 1989 (Exp. 87/1313, 88/0989 y 89/0484).

Hai un fondo calamento
no toxal, na frol, na estrela;
pinga
unha bágoa
do vento
avelaiña sinxela
na furna do pensamento

A mi familia y en especial
a mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han hecho posible la realización de esta tesis, y en particular:

Al Dr. Manuel Rey Méndez, por la dirección de esta tesis y especialmente por sus consejos y ánimos durante todos estos años.

Al Dr. Manuel Freire Rama, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Biología.

A Bibiana Guerra Pestonit, José Manuel Castro Freire y Dolores García Carnero, por su inestimable colaboración en el trabajo experimental.

Al Dr. Manuel Aldegunde del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago, por su ayuda en las mediciones espectrofluorimétricas de corticosterona.

A mi padre, por su colaboración en la parte gráfica de este trabajo y sobre todo por su apoyo y confianza.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, por la subvención de este proyecto de investigación durante los años 1987, 1988 y 1989.

A todos los compañeros de laboratorio y amigos que han estado a mi lado tanto en los buenos como en los malos momentos.

Solalida Javallo
2439783

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCION.	
I.1.- VISION HISTORICA DEL CONCEPTO DE ESTRES	4
I.2.- TERMINOLOGIA UTILIZADA	11
I.3.- ESTRES Y ENFERMEDAD	13
I.3.1.- Efecto del estrés sobre la incidencia de enfermedades infecciosas.....	15
I.3.2.- Efecto del estrés sobre la incidencia del cáncer.....	17
I.3.3.- Efecto del estrés sobre la incidencia de enfermedades alérgicas.....	21
I.3.4.- Efecto del estrés sobre la incidencia de enfermedades autoinmunes.....	23
I.3.5.- Efecto del estrés sobre el sistema inmune.....	25
I.4.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INMUNOMODULACION POR EL ESTRES	29
I.4.1.- Respuestas del sistema endocrino al estrés	32
I.4.1.1.- Sistema nervioso simpático.....	32
I.4.1.2.- Pituitaria anterior.....	33
a) Eje pituitaria-adrenal.....	33
b) Hormona del crecimiento.....	35
c) Prolactina	36
d) Gonadotropinas.....	36
e) Tirotropinas.....	36
I.4.1.3.- Pituitaria posterior.....	37
I.4.1.4.- Esteroides gonadales.....	38
I.4.1.5.- Efectos de los glucocorticoides sobre los procesos inmunes.....	41
I.4.2.- Relaciones entre el sistema nervioso central y el sistema inmune	50
I.4.3.- Proceso de migración y diferenciación de las células linfoides	55
I.4.3.1.- Origen de las células linfoides.....	55
I.4.3.2.- La glándula tímica: un órgano linfoide primario.....	58
I.4.3.3.- Diferenciación intratímica de linfocitos.....	60
I.4.3.4.- Recirculación linfoide.....	65

I.4.3.5.- Antígenos de superficie y enzimas relacionadas con la diferenciación de células T.....	66
I.4.3.6.- Alteración de los patrones de migración linfoide.....	71
I.5.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	75
II. MATERIALES.	
II. 1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	80
II. 2.- REACTIVOS ESPECIALES.....	81
II. 3.- APARATOS.....	82
III. METODOS.	
III. 1.- ESTERILIZACION DE MATERIAL.....	85
III. 2.- MANTENIMIENTO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	86
III. 3.- ADRENALECTOMIA.....	88
III. 4.- PROTOCOLOS DE ESTRES.....	90
III. 5.- OBTENCION DE SANGRE Y ORGANOS.....	92
III. 6.- OBTENCION DE CELULAS LINFOIDES.....	93
III.6.1.- Obtención de timocitos.....	93
III.6.2.- Separación de subpoblaciones de timocitos.....	94
III.6.3.- Obtención de células precursoras de médula ósea.....	96
III. 7.- RECUENTO CELULAR Y DETERMINACION DE LA VIABILIDAD.....	97
III. 8.- DETERMINACION DE CORTICOSTERONA.....	98
III. 9.- OBTENCION DE FACTOR QUIMIOTACTICO TIMICO.....	100
III.10.- ENSAYOS DE MIGRACION "IN VITRO".....	102
III.11.- EXTRACCION DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR.....	105
III.12.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	107
III.13.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	109
III.13.1.- Extractos celulares.....	109
III.13.2.- Determinación de la actividad 5'-NT....	111

III.13.3.- Determinación de la actividad NABG.....	113
III.13.4.- Determinación de la actividad BG.....	114
III.13.5.- Determinación de la actividad SE.....	115

III.14.- ANALISIS ESTADISTICO.....	116
------------------------------------	-----

IV. RESULTADOS.

IV.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE TRES AGENTES ESTRESANTES SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.....	120
IV.1.1.- Incremento del peso corporal.....	120
IV.1.2.- Peso del bazo.....	123
IV.1.3.- Peso de las cápsulas suprarrenales.....	125
IV.1.4.- Nivel de corticosterona en plasma.....	127
IV.1.5.- Peso del timo.....	129
IV.1.6.- Número y tipo de timocitos.....	131
IV.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE EL DNA DE TIMOCITOS MURINOS.....	134
IV.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA Y LA APLICACION DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.....	137
IV.3.1.- Incremento del peso corporal.....	138
IV.3.2.- Peso del bazo.....	140
IV.3.3.- Peso de las cápsulas suprarrenales.....	142
IV.3.4.- Nivel de corticosterona en plasma.....	144
IV.3.5.- Peso del timo.....	146
IV.3.6.- Número y tipo de timocitos.....	148
IV.4.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE LA MIGRACION DE CELULAS PRECURSORAS AL TIMO.....	151
IV.4.1.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de neonatos.....	152
IV.4.2.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones adultos estresados y control.....	157
IV.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS MARCADORAS DE LA MADURACION DE LOS LINFOCITOS T.....	170
IV.5.1.- Actividad 5'-nucleotidasa.....	171
IV.5.2.- Actividad N-acetil- β -glucosaminidasa.....	174
IV.5.3.- Actividad β -glucuronidasa.....	177

IV.5.4.- Actividad Serín esterasa.....	180
V. DISCUSION.....	183
V.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE TRES AGENTES ESTRESANTES SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.....	188
V.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE EL DNA DE TIMOCITOS MURINOS.....	191
V.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA Y LA APLICACION DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.....	192
V.4.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE LA MIGRACION DE CELULAS PRECURSORAS AL TIMO.....	195
V.4.1.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de neonatos.....	196
V.4.2.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones adultos estresados y control.....	197
V.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS MARCADORAS DE LA MADURACION DE LOS LINFOCITOS T.....	202
VI. CONCLUSIONES.....	206
VII. BIBLIOGRAFIA.....	210

ABREVIATURAS.

A	Absorbancia.
ACTH	Hormona adenocorticotrópica.
AMP	Adenosina monofosfato.
AVP	Vasopresina.
β -E	β -Endorfina.
BG	β -Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.31).
BSA	Seroalbúmina bovina.
CA	Catecolaminas.
EDTA	Acido etilén-diamino-tetracético.
FCS	Suero fetal de ternera.
FSH	Hormona folículo estimulante.
GH	Hormona del crecimiento.
IFN	Interferon.
Ig	Inmunoglobulina.
IL	Interleukina.
Kd	Kilodaltons.
LH	Hormona luteinizante.
mRNA	RNA mensajero.
NABG	N-acetil- β -glucosaminidasa (E.C. 3.2.1.30).
NAD ⁺	Nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado).
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido (reducido).
NK	Célula asesina natural.
5'-NT	5'-Nucleotidasa (E.C. 3.1.3.5).
PBS	Tampón fosfato salino.
Pi	Fosfato inorgánico.
PNA	Aglutinina de cacahuete.
PNA ⁺	Timocitos aglutinados con PNA.
PNA ⁻	Timocitos no aglutinados con PNA.
PRL	Prolactina.
RNasa	Ribonucleasa.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SE	Serín esterasa (E.C. 3.4.21).
S.E.M.	Error estándar de la media.
SRBC	Eritrocitos de carnero.
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
TSH	Hormona estimulante del tiroides.
U	Unidades.
w/v	Relación peso-volumen.

ADA - *adeno* *de* *amida*

RESUMEN

Es bien conocido que el estrés contribuye al desarrollo de la enfermedad induciendo cambios en la función inmune, siendo la inmunodepresión una de sus principales consecuencias. Con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos que median los efectos del estrés en el sistema inmune nos propusimos estudiar en la primera parte de este trabajo el efecto de la aplicación de tres agentes estresantes (inmovilización, frío y natación) sobre una serie de marcadores de estados de estrés en ratones C57BL/6. Los resultados obtenidos revelan que todos los parámetros estudiados se ven afectados pero en un grado y signo distintos dependiendo del estresante utilizado. Con respecto al timo observamos un aumento de peso con el estrés de frío y una disminución con el de inmovilización; estos cambios de peso se ven acompañados por variaciones en el número de timocitos que únicamente afectan a la subpoblación inmadura, mientras que la madura permanece constante.

El estudio de los procesos que modulan la inmunidad bajo situaciones de estrés centra la segunda parte de nuestro trabajo. Aunque hasta ahora se consideraba a las hormonas adrenales como el primer mediador de los efectos del estrés y responsables de la involución tímica, nuestros resultados indican que los niveles de corticosteroides alcanzados durante el estrés no producen la degradación del DNA de timocitos y que en ausencia de cápsulas suprarrenales y en esas mismas condiciones estresantes persiste la involución tímica. Otros factores distintos de la corticosterona parecen estar implicados. Así el estudio del proceso de migración de las células precursoras al timo revela que la migración está inhibida bajo condiciones de estrés, lo que explicaría la involución tímica encontrada en esas condiciones. Esta inhibición parece ser célula-asociada.

Por otro lado, las variaciones de la actividad de las enzimas 5'-Nucleotidasa, N-Acetil- β -Glucosaminidasa, β -Glucuronidasa y Serín Esterasa (consideradas como marcadoras de estados de estrés) durante el proceso de maduración intratímica no se modifican bajo condiciones de estrés. Así pues, lo más probable es que durante el estrés se interrumpa o inhiba la llegada de células precursoras al timo, lo que originaría la involución tímica aunque el proceso de maduración siga inalterado.

I INTRODUCCION

I.1.- VISION HISTORICA DEL CONCEPTO DE ESTRES.

Durante los primeros años del presente siglo, el investigador Walter Cannon (1) inició los estudios pioneros sobre los cambios corporales en situaciones de dolor, hambre, miedo y rabia. Su trabajo pretendía determinar como el estrés podía conducir a la enfermedad. A él debemos la introducción del concepto de estrés, que definía como "todo agente capaz de inducir una respuesta o tensión en el mecanismo homeostático del cuerpo". Sus experiencias demostraron la importancia del sistema nervioso simpático y la liberación de catecolaminas medulares en el mantenimiento del estado de equilibrio del cuerpo u homeostasis, producida tanto en respuesta a estímulos físicos (pérdida de sangre, por ejemplo) como a sucesos psíquicos (gatos expuestos al ladrido de un perro). Todo su trabajo le llevó a formular la Teoría de la Función de Emergencia de la Médula Adrenal (2), en la que enfatiza el papel de la secreción de adrenalina, a la que consideraba la hormona del estrés, en la preparación del organismo frente a situaciones adversas -la denominada reacción de emergencia- para conseguir, finalmente, la restauración de la homeostasis. El grado de respuesta era proporcional al de estrés hasta un punto que denominó nivel crítico de estrés y, a partir del cual, los mecanismos homeostáticos eran incapaces de restaurar el funcionamiento normal del cuerpo.

A mediados de los años 30, el endocrinólogo Hans Selye introduce el concepto de estrés en el campo de la investigación biológica, en

oposición al concepto coloquial de estrés físico que predominaba hasta ese momento. Sus investigaciones abrieron nuevas perspectivas en las interrelaciones entre el hombre y su ambiente y los mecanismos envueltos en la adaptación de los organismos a los cambios ambientales.

Para Selye, el estrés era la respuesta no específica del cuerpo a cualquier estímulo hecho sobre él, ya que distinguía entre una respuesta específica y adecuada, que respondía a unos estímulos concretos (aumento de presión sanguínea frente a pérdida de sangre, aumento de insulina frente al aumento de glucosa en sangre, sudoración frente a calor...) o dependía de ciclos rítmicos (fotoperíodo, actividad motora, secreción de corticoides o insulina, sueño/vigilia, actividades enzimáticas, respiración..), y una respuesta no específica y estereotipada, el estrés, común a diversos agentes ambientales (frío, calor, inmovilización, ejercicio físico, productos tóxicos, infección...) y, por tanto, independiente de la naturaleza del estímulo. Selye (3) encontró que en respuesta a estos estímulos estresantes el organismo reaccionaba con un síndrome característico, cuyo objetivo era prepararse para contrarrestar los efectos del agente y que denominó **Síndrome General de Adaptación (GAS)**. Aunque reconoce la participación de la médula adrenal en esta adaptación, como ya había señalado Cannon a principios de siglo, destaca el papel decisivo de los glucocorticoides de la corteza adrenal (4).

El **Síndrome General de Adaptación (GAS)** fue descrito por Selye como una respuesta trifásica al estrés. La respuesta inicial o

reacción de alarma se caracteriza por una estimulación simpática y un aumento de la secreción adrenocortical, cuyas consecuencias son una serie de cambios dirigidos a la movilización de las reservas energéticas del organismo. En sus primeras publicaciones, las alteraciones estructurales y funcionales de esta primera fase eran formuladas como el triple efecto del estrés: aumento adrenal, atrofia tímico-esplénica y úlceras gástricas (5). Cuando la exposición al estímulo estresante continúa, se produce la reacción de adaptación o resistencia que da lugar a un estado de recuperación, con una disminución o desaparición de los cambios manifestados durante la reacción de alarma y la curación de las lesiones agudas. Si la exposición sigue, decrece la resistencia del organismo y la patología de la reacción de alarma reaparece, produciéndose la muerte del animal, bien por efecto directo del agente estresante, por fallo o destrucción adrenocortical o simplemente por el agotamiento de las reservas energéticas (3).

A pesar de que el estado de estrés está usualmente considerado como deletéreo para la salud, pues los altos niveles de corticosteroides, que resultan del mantenimiento del estrés, tienen el efecto adicional de deprimir el sistema inmune, Selye consideraba que un cierto tono o grado de estrés - el **estrés bueno (eustress)**- era fisiológico y beneficioso para el organismo e incluso necesario para una existencia normal, distinguiéndolo del **estrés perjudicial (distress)**, que era patológico y adverso cuando alcanzaba un grado excesivo e inapropiado, sin embargo, ambos tipos de estrés tendrían las mismas respuestas endocrinológicas (6).

Estas ideas, según las cuales todo estímulo nocivo resultaba en la iniciación de una serie de cambios metabólicos en el organismo expuesto y que afectaban, fundamentalmente al eje pituitaria-adrenal, siguieron desarrollándose bajo la influencia de Selye durante los años 40 y 50.

El énfasis en la respuesta biológica no específica al estrés no ha sido sostenida por investigadores posteriores. Mason (7) demostró que la naturaleza de las condiciones de estrés puede determinar el patrón específico de respuesta. Así, por ejemplo, los niveles de norepinefrina eran mayores que los de epinefrina durante el ejercicio y el nivel de epinefrina era mayor durante una conferencia pública (8). Esto enfatiza la necesidad de considerar la especificidad del estrés y la respuesta, y cuestiona la exclusiva utilización de la respuesta biológica específica como base de la definición del estrés.

Según Mason la inespecificidad se debe a que tras los diferentes agentes estresantes subyacen reacciones psicológicas semejantes. La simple amenaza a la exposición de un agente estresante puede ser más poderosa en términos de respuesta hormonal que la exposición en sí y es más, el estímulo físico por sí solo es incapaz de desencadenar la respuesta adrenocortical, si no va acompañado de un estímulo emocional. De una serie de estudios realizados en monos, privados de comida o sometidos a ejercicio, Mason concluye, que existe un componente psicológico, además del físico en el estrés, que es más potente incluso en producir cambios en los individuos (9).

Todo esto le llevó a establecer diferencias entre la estimulación cognitiva y la estimulación fisiológica, dependiendo del tipo y circunstancias que rodean al agente estresante. Sus puntos de vista son aceptados hoy en día y han sido denominados por Burchfield y colaboradores **Teoría Cognitiva del Estrés**, basada en la sensibilidad del sistema neuroendocrino a los factores psicológicos (como el llanto de un niño, un enfado conyugal o en el trabajo) que eran capaces de producir respuestas neuroendocrinas importantes (10).

La investigación psicoendocrina en el sistema pituitaria-adrenal ha puesto de manifiesto que el grado de respuesta al estrés viene determinado fuertemente por elementos como la novedad, incertidumbre, anticipación o predictibilidad (9).

Se han descrito un gran número de experimentos que muestran que cambios bioquímicos, fisiológicos y/o patológicos en un organismo no son causados por la naturaleza nociva del agente sino por la actitud del sujeto frente al estresante (ansiedad, tensión o grado de responsabilidad que presente durante la exposición) o el grado de capacidad o incapacidad de controlarlo; serán por lo tanto estos factores los que determinen el grado de respuesta individual y, por consiguiente, que experimente o no estrés. Efectos similares eran observados estudiando la predictibilidad o impredecibilidad del agente estresante; las condiciones no predecibles, aquellas a las que el individuo no se podía anticipar, eran más estresantes que las condiciones predecibles. En este sentido, el término de **agente estresante** debe referirse al grado de percepción por el sujeto del

estímulo como nocivo o incontrolable o impredecible más que como estímulo físico en sí (11).

En el laboratorio, animales que tenían la capacidad de poner fin a un agente estresante **-estrés eludible-** no desencadenaban una respuesta de estrés, mientras que animales sometidos al mismo agente, pero sin capacidad de control **-estrés ineludible-** sí lo hacían (12, 13). Laudenslager y colaboradores (12) encontraron que la proliferación de linfocitos murinos en respuesta a fitohemaglutinina y concavalina A estaba suprimida en animales sujetos a estrés ineludible, mientras que si era eludible la supresión no se producía. Este dato apoya la idea de que la controlabilidad del estrés es crítica en la respuesta. También Visintainer y colaboradores (13) encontraban que el rechazo de un tumor se reducía cuando el individuo no podía controlar el agente estresante. Uno de los más conocidos ejemplos presenta ratas sometidas a descargas eléctricas, aquellas que podían controlar el agente presentaban una menor patología inducida por el estrés (úlceras gástricas, pérdida de peso...) que los sujetos, que no podían eludir el agente. Estos últimos presentaban, además, mayores niveles de adrenalina, norepinefrina y corticosterona (14). Así pues, en la respuesta al estrés no influye únicamente la naturaleza, intensidad y duración del agente estresante, sino también otros factores como la controlabilidad, predictibilidad y actitud del sujeto (15,16).

En este contexto de subjetividad, quizás la definición más aceptada de estrés se debe a David Glass: "la percepción de amenaza contra el equilibrio físico o psicológico y la percepción de que las

respuestas del individuo son inadecuadas para enfrentarse a ella" (17).

Todos los factores que rodean la incidencia del estrés son complejos, lo que hace que hasta el momento no exista una definición de estrés totalmente válida. El término estrés ha sido usado para abarcar componentes diferentes del sistema utilizado al considerar los efectos de varios estímulos en los organismos. Algunos autores diferencian claramente los distintos términos, entendiendo agente estresante como un estímulo adverso o nocivo que excede los límites normales y provoca cambios, estrés como la exposición al agente y respuesta de estrés como los cambios fisiológicos inducidos por el estrés, determinada filogenéticamente y que refleja la experiencia de las especies adquirida durante la evolución (18,19).

En la definición de Selye, el término estrés es usado para describir la respuesta, pero frecuentemente, es utilizado como sinónimo de agente estresante, refiriéndose a acontecimientos o estímulos a los que el organismo está expuesto. Otras veces es utilizado para definir tanto el agente estresante, la reacción o las consecuencias.

Estrés es un término abstracto que ha sido usado (al menos implícitamente) como una explicación de estados psicofisiológicos alterados, y no tiene claras unidades de medida, a menos que el investigador pueda disponer de una variable cuantificable conocida que cambia cuando el organismo está expuesto a un agente estresante.

I.2.- TERMINOLOGIA UTILIZADA.

El estrés es uno de los términos más imprecisos en el léxico de la ciencia, sin embargo y con fines prácticos, aceptamos la definición propuesta por Vigas en 1980: "Estrés es la respuesta del organismo a agentes que ponen en peligro su integridad o que son percibidos como tales" (19).

Consideramos **estrés** como un estado del organismo y reservamos el término **agente estresante** o **estresante**, para cualquier estímulo, excesivo cuantitativa o cualitativamente, que produzca estrés. Conservaremos los términos **estrés de frío**, **estrés de inmovilización...** y **respuesta al estrés**, que aunque hacen referencia al agente estresante, son utilizados de forma generalizada en la bibliografía.

Tradicionalmente, el estrés se ha venido clasificando en **estrés físico** (ejercicio, hipoglucemia, descargas eléctricas, frío, inmovilización...) y **estrés psíquico** (situaciones difíciles o peligrosas, tensión, miedo, traumas...). Sin embargo, no distinguiremos entre **agentes estresantes físicos** y **agentes estresantes emocionales** por considerar a ambos componentes de un agente estresante, ya que todo estrés físico tiene un componente emocional más o menos pronunciado, y ambos desencadenan una respuesta similar (20).

Por el contrario, establecemos diferencia entre **agentes estresantes ineludibles**, que el animal no puede evitar y **agentes**

estresantes eludibles o susceptibles de ser controlados.

Por último distinguiremos según el tiempo de actuación del agente entre **estrés agudo** producido por una sola exposición y **estrés crónico** o prolongado, producido por exposiciones repetidas al agente estresante.

efectos psicológicos físicos y químicos

psíquicos = emocionales

I.3.- ESTRES Y ENFERMEDAD.

La investigación de las relaciones entre el estrés y la enfermedad es complicada debido a un gran número de factores, a los que hay que añadir una respuesta, a menudo variable. Hay estudios que mantienen tanto efectos nocivos como beneficiosos del estrés en humanos y animales de laboratorio. La capacidad del organismo de controlar el estrés parece un factor más crítico que la naturaleza del estrés en sí mismo.

Sin embargo, es conocido el papel fundamental del estrés en el inicio y desarrollo de enfermedades en las que la resistencia es inmunológica (infecciones y neoplasias) y de enfermedades asociadas a una disfunción inmunológica (alergias y autoinmunes). Existe una abundante bibliografía que describe numerosos casos en los que factores emocionales o físicos preceden al desencadenamiento de la enfermedad (21). Ya se sospechaba en el siglo II a.C. que variables psicológicas podían influir en el desarrollo del cáncer, y así el físico Galeno observaba que las mujeres melancólicas parecían más propensas a desarrollar cáncer que las mujeres sanguíneas (22). Además existen datos sobre el incremento de mortalidad médica asociada a situaciones traumáticas producidas por la muerte de un familiar, que actuaría como un estresante muy potente, o sobre la mayor incidencia de enfermedades respiratorias en estudiantes en época de exámenes (23).

El estudio de la relación causal entre estrés y enfermedad es

difícil, pues se debe recurrir a enfermedades cuyo grado de severidad pueda ser objetivamente medido (por ejemplo, el tamaño del tumor). Se han utilizado agentes estresantes muy diversos como el hacinamiento de ratones en jaulas, frío, inmovilización, ruido, transporte, descargas eléctricas eludibles o ineludibles... seguidos muchas veces de la introducción de un agente patogénico. La respuesta es muy variable y factores como la percepción por el individuo del agente estresante, la capacidad para controlarlo o la predisposición genética, juegan un papel decisivo. La dificultad del estudio se incrementa ante los problemas para interpretar ciertos trabajos, debido a la existencia de variables incontroladas e inadecuados tratamientos estadísticos, unido ésto a la ausencia de datos comparativos. Además, el trabajo experimental se ha desarrollado en diferentes especies, diferentes enfermedades y diferentes agentes estresantes.

I.3.1.- Efecto del estrés sobre la incidencia de enfermedades infecciosas.

Clínicamente se ha observado que los factores psicosociales modifican la resistencia a las enfermedades. Adicionalmente a estas observaciones, existen una cantidad de datos que soportan la hipótesis de que los factores emocionales influyen en el desarrollo de las enfermedades infecciosas. Rasmussen (24) demostró que el estrés emocional inducido incrementaba la sensibilidad del huésped a infecciones virales, producidas por los virus Herpes simplex, Coxsackie, Poliomieltis, Polioma..., y que se manifestaba por el incremento de la mortalidad y el decrecimiento del tiempo de supervivencia. El estrés físico también incrementaba la susceptibilidad de ratones al Herpes simplex y al virus de la Estomatitis vesiculosa (25).

Otros factores como el hacinamiento en las jaulas aumentaba la susceptibilidad de los animales a ciertos parásitos como Plasmodium berquei, Trichinella spiralis y Microphallus pygmaeus y también reducían el tiempo de supervivencia de animales que padecían tuberculosis (26). Es de particular interés el caso de la gingivitis aguda, en la que la flora bacteriana de la boca se hace invasiva, con situaciones de estrés agudo. Otro caso análogo es el del Herpes simplex, un virus latente en las células hasta que es activado por distintos factores como estrés, fiebre, luz ultravioleta o trauma emocional (25).

El estrés puede tener un efecto diferente en el estado de salud, dependiendo de si ocurre antes o después de que el organismo haya sido invadido por el patógeno. El estrés que ocurre antes de que el patógeno entre en el cuerpo tiene un efecto de vacuna, mientras que el que ocurre después resulta en un incremento en la severidad de la enfermedad y elimina los efectos beneficiosos precedentes (27). Además, el estrés agudo asociado con una infección aguda induce en el huésped una menor resistencia a la enfermedad, pero cuando la exposición al estrés y/o el proceso patológico es crónico, entonces el resultado de la infección o su dirección es difícil de prever (28).

Numerosos tipos de estrés han sido utilizados para demostrar el incremento de la susceptibilidad a las infecciones bajo condiciones de estrés. Sin embargo, hay excepciones a esta generalidad, variaciones en el huésped, agente y criterios utilizados que pueden afectar a esta conclusión anterior. La duración del estrés y las especies diversas del huésped pueden causar incremento, decrecimiento o inalteración en la susceptibilidad a la Poliomielitis (24).

Relacionado con esto, Plaut y Friedman (29) han descrito en una revisión sobre el tema, la gran variabilidad de respuestas (tanto en la incidencia como en la mortalidad) dependiendo de la naturaleza del agente infeccioso, la cantidad y calidad del estrés y factores ambientales y genéticos. Factores psicosociales influyen en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas como parte de la compleja respuesta del organismo a estímulos patogénicos.

I.3.2.- Efecto del estrés sobre la incidencia del cáncer.

La existencia de relaciones entre el estrés o ciertos estados emocionales y el cáncer ha sido señalada desde los tiempos de Galeno, sin embargo el mecanismo por el que sus efectos podrían ser mediados ha permanecido desconocido hasta los actuales avances en psiconeuroinmunología.

Factores internos y externos del huésped parecen jugar un papel importante en el desarrollo, curso e inicio de las enfermedades neoplásicas, ya sean espontáneas, químicas, por trasplante de tumor o por virus tumorales (24, 30). Hay considerables evidencias experimentales de factores que tienen no sólo una profunda influencia en el comportamiento y en la sensibilidad endocrina e inmunológica sino que influyen en el desarrollo del cáncer.

Riley observó que la incidencia de distintos tumores mamarios murinos estaba afectada por agentes estresantes tan leves como los encontrados en el ambiente normal del animalario. Estos tumores, sensibles a esteroides y prolactina, eran inducidos por virus y en su desarrollo parecía desempeñar un papel no muy claro el sistema inmune. En una revisión posterior este mismo autor concluía que en el desarrollo del crecimiento tumoral, el incremento se debía a una inmunosupresión y el decrecimiento del tumor a una inmunopotenciación (31, 32).

Por otro lado, el uso de agentes estresantes disminuía la leucemia

inducida por el virus de Rauscher (33), sin embargo la incidencia y el tamaño de los tumores producidos por el virus del sarcoma murino (MSV) incrementaban cuando eran aplicadas condiciones de vida estresantes, choque eléctrico o inmovilización, tras la inyección del virus. La mayoría de los animales que habían sufrido estrés, previamente a ser inyectados con las células tumorales, tenían tumores en un estado más regresivo que aquellos animales que habían recibido el estrés con posterioridad (34).

En aquellos diseños experimentales donde existía la posibilidad de control del agente estresante por el animal, el desarrollo del tumor era superior al del control en el estrés ineludible, mientras que era igual o incluso inferior en el estrés eludible (13, 35). Esto parece indicar que el animal con capacidad de controlar o poner fin a un estímulo nocivo no presenta el efecto negativo típico del estrés, sino un efecto favorable. El estrés "per se" no era oncogénico, sino que la incapacidad de controlarlo podía llevar al desarrollo y proliferación de las células tumorales.

Ante todos estos datos y tras una revisión bibliográfica LaBarba (30) concluyó que los tumores experimentales en animales podían estar influenciados por variables experimentales y ambientales y depender de las distintas especies objeto de estudio.

A mediados de los años 80, Alan Justice (18) elaboró una revisión del efecto del estrés sobre la incidencia del cáncer en animales de laboratorio, en la que explica que para predecir los efectos del

estrés sobre el crecimiento de tumores inducidos se deben tener en cuenta dos aspectos: el momento de aplicación del estrés, en relación a la inducción del tumor y la naturaleza o tipo de tumor. Justice propone cuatro hipótesis para explicar los patrones de crecimiento tumoral en respuesta al estrés, que constituyen la Teoría del Rebote, entendiéndose por rebote la respuesta fisiológica durante el tiempo que sigue a la exposición al estrés:

- Hipótesis inhibición-estrés: el estrés administrado durante el tiempo de crecimiento tumoral retarda este crecimiento en tumores de origen no viral.
- Hipótesis rebote-estrés: después de la terminación del estrés, hay una respuesta rebote que causa un crecimiento más rápido de los tumores no virales que en los animales no estresados.
- Hipótesis facilitación-inmune: los tumores virales crecen más rápido durante la exposición al estrés, debido a la inmunosupresión.
- Hipótesis rebote-inmune: después de la finalización del estrés, hay una respuesta rebote inmunopotenciadora que inhibe el crecimiento de los tumores virales.

Estas hipótesis se sumarian en el gráfico siguiente:

	Estrés	Rebote
Tumores virales	↑	↓
Tumores no virales	↓	↑

Así pues, los tumores virales y no virales responden durante la aplicación del estrés y en el rebote de forma opuesta. El crecimiento de los tumores virales parece mediado por el sistema inmune, una inmunosupresión en el estrés y una inmunopotenciación en el rebote. Así, el estrés anterior a la inyección del patógeno tiene un efecto vacuna o protector (27). El mediador para los tumores de origen no viral no está tan claro, la inhibición del crecimiento durante la exposición al estrés determina la existencia de otros factores implicados, además del sistema inmune (18).

Por último, no se ha considerado que la cronicidad del estrés "per se" sea un factor que afecte al crecimiento del tumor. El estrés crónico y agudo no tienen efectos cualitativamente diferentes en el crecimiento tumoral durante su aplicación, simplemente el estrés crónico extendería sus efectos y retrasaría el período de rebote (36).

I.3.3.- Efecto del estrés sobre la incidencia de enfermedades alérgicas.

Factores de estrés y personalidad están muy relacionados con la incidencia de enfermedades alérgicas como la dermatitis de contacto. Se ha demostrado que la represión de grandes emociones (como por ejemplo, contener el llanto) está muy unida a la aparición de urticarias (26).

Existe una amplia bibliografía sobre los aspectos psicosociales y psicofisiológicos en el asma bronquial. Ya desde hace mucho tiempo se considera asociado a conflictos familiares, estados de dependencia y estimulación emocional elevada; tanto estados placenteros como desagradables, como cólera y ansiedad, contribuyen al comienzo del ataque. Asimismo, la rinitis y la fiebre del heno pueden ser desencadenadas o exacerbadas por los acontecimientos estresantes. La presencia de polen no conseguía provocar síntomas en un sujeto con fiebre del heno, mientras que la combinación de polen y situaciones estresantes podía provocar ataques de asma. Además, los altos niveles de Inmunoglobulina E, presentes en pacientes asmáticos, podían ser conseguidos en animales de laboratorio tras la aplicación del estrés (23, 26). También experimentalmente, se ha comprobado que el estrés reduce la severidad de choque anafiláctico letal (26).

Finalmente se ha postulado que la alergia puede resultar de una inhibición de las células T supresoras, que normalmente actuarían como

amortiguador de la producción de anticuerpos. Los estresante actuarían reprimiendo la actividad de las células T y aumentando la respuesta de anticuerpos (26).

I.3.4.- Efecto del estrés sobre la incidencia de enfermedades autoinmunes.

La influencia de factores emocionales y estresantes sobre el inicio y el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, y en particular la artritis reumatoide sistémica (LES), ha sido revisada por Solomon y Amkraut (26). Estos autores observaban que en ratas con artritis, el estrés no sólo aceleraba el progreso de la enfermedad sino que también interfería en la recuperación. El inicio de esta enfermedad sigue a menudo a un período de estrés o a la interrupción de la capacidad de mantener unos patrones previos de defensa y adaptación por el individuo.

También han sido estudiados estos factores en la iniciación de otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, Lupus eritematosus, enfermedad de Graves, colitis ulcerosa... La rápida progresión de las enfermedades, el grado de incapacidad y la falta de respuesta a un tratamiento pueden estar relacionadas con la falta de defensas psicológicas, ansiedad y depresión. Así, problemas de finanzas, matrimonio o interrelación precedían al desarrollo de la esclerosis múltiple. Otros desórdenes con componentes autoinmunes, como la enfermedad de Graves o la colitis ulcerosa, están también influidos por componentes estresantes (26).

Basándose en todos estos hechos, se ha desarrollado una hipótesis que propone la existencia de una predisposición genética en las enfermedades autoinmunes, sólo los individuos con conflictos

emocionales, estrés y falta de defensas psicológicas desarrollarían la enfermedad (23, 26). Parece, pues, que el estudio de la personalidad de pacientes con enfermedades autoinmunes puede facilitar la comprensión de las complejas variables envueltas en la producción de una enfermedad.

I.3:5.- Efecto del estrés sobre el sistema inmune.

Estudios clínicos y epidemiológicos han puesto de manifiesto que situaciones descritas como estresantes pueden tener una gran variedad de consecuencias médicas. Algunas de éstas, son situaciones curiosas como la muerte del cónyuge, la pérdida del empleo, la emigración, los trabajos arriesgados (por ejemplo, aviadores o paracaidistas), estudiantes en exámenes finales..., que no producen, por sí mismas, efectos perniciosos en la salud, pero sí incrementan la probabilidad de aparición de enfermedades (37).

Quizás los efectos del estrés en enfermedades infecciosas y neoplasias puedan ser debidos a la alteración de mecanismos de respuesta humoral y celular (38). Ciertos cánceres y enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, son causados por una disfunción en las regulaciones inmunes.

El estrés afecta marcadamente al sistema inmune, activándolo o deprimiéndolo. Esta aparente contradicción es probablemente debida a una multiplicidad de factores que incluyen especie y tipo de animal, sexo y edad de los sujetos investigados, la cantidad y la calidad de los agentes estresantes empleados, los componentes particulares del sistema inmune estudiados y los tiempos de sacrificio de los animales durante la exposición al estrés. Todos estos factores, solos o en combinación, afectan al sistema inmune y proporcionan unos resultados difíciles de interpretar.

Durante el estrés se produce una depresión de la inmunidad humoral y celular, caracterizada por una involución del timo y el bazo, una marcada leucocitopenia y una reducción de la capacidad de respuesta celular (38). Sin embargo, no todos los tipos de leucocitos disminuyen en número, únicamente lo hacen los linfocitos, mientras que los neutrófilos y los linfocitos granulares aumentan y el número de monocitos permanece inalterado (39). Estos resultados parecen indicar que los componentes individuales del sistema inmune y sus actividades son selectivamente afectadas por el estrés y que además estas alteraciones no sólo ocurren durante el estrés, también pueden ser aparentes tras la finalización de dicho período.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto una íntima relación entre estrés y sistema inmune, asociada con alteraciones de los mecanismos inmunes como la reducción de la citotoxicidad mediada por linfocitos, reducción del número de anticuerpos circulantes, retraso del rechazo a injertos, supresión de las funciones de las células T auxiliares y supresoras, incremento en las funciones de las células B... Algunos de estos datos (23, 26, 28, 37-42), obtenidos en humanos y animales de laboratorio se resumen en la **Tabla 1**.

Aunque estas alteraciones inmunes parecen explicar la mayor incidencia de ciertas enfermedades, otros factores como el aumento del flujo sanguíneo, liberación de endorfinas, prolactina o el aumento de hormonas adrenomedulares y adrenocorticales, todos los cuales tienen lugar durante el estrés, podrían estar implicados. Podemos pues concluir que una gran variedad de cambios bioquímicos, posiblemente

relacionados con cambios en el sistema inmune (26), intervendrían en la modulación de la inmunidad inducida por el estrés. El sistema inmune responde al estrés por variados caminos que llevan al mantenimiento de la homeostasis y protección de la integridad o a facilitar el proceso de enfermedad.

TABLA 1: ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD TRAS LA APLICACION DE DIVERSOS AGENTES ESTRESANTES.

<u>EFEECTO OBSERVADO</u>	<u>AGENTE ESTRESANTE</u>	<u>ANIMAL DE EXPERIMENTACION</u>
Aumento inflamación	Ruido Hacinamiento	Ratas macho
Disminución IgG	Privación alimento	Ratas
Aumento IgE	Privación alimento	Ratas
Disminución placas frente a SRBC	Aceleración Anestesia con eter Inmovilización	Ratones
Aumento interferón	Varios agentes	Humanos
Disminución linfocitos circulantes	Descargas eléctricas	Ratas
Aumento IgM	Privación alimento	Ratas
Disminución de hipersensibilidad	Inmovilización	Ratones
Menor actividad NK bazo	Inmovilización	Ratones
Disminución fagocitosis y actividad macrófagos	Inmovilización Ruido Destellos luminosos	Ratones Monos
Disminución actividad T auxiliar y supresora	Inmovilización	Ratones
Aumento actividad células B de bazo	Inmovilización	Ratones
Disminución número T auxiliares y supresoras	Inmovilización	Ratas
Igual número neutrófilos y linfocitos granulares	Inmovilización	Ratas
Igual actividad NK bazo	Inmovilización	Ratas
Disminución estimulación linfocitos	Hacinamiento Inmovilización Descargas eléctricas	Ratas
Disminución respuestas 1 y 2 a flagelina	Hacinamiento	Ratas
Disminución producción anticuerpos	Hacinamiento Privación alimento Ruido Inmovilización	Ratas Ratones
Disminución rechazo injertos	Varios agentes	Ratones

I.4.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INMUNOMODULACION POR EL ESTRÉS.

Existen considerables evidencias que demuestran la relación entre estrés y sistema inmune, pero la modulación de la inmunidad por el estrés es compleja, pues incluye una gama de mecanismos inhibidores y potenciadores. Aunque durante estos últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de este tema, los mecanismos mediadores específicos aún no han sido aclarados. Una gran variedad de factores pueden estar implicados en las asociaciones entre estrés e inmunidad. El sistema endocrino, que es altamente sensible a situaciones estresantes, y la actividad neuroendocrina, a través del eje hipotálamo-pituitaria, pueden estar implicados en las alteraciones del sistema inmune inducidas por el estrés.

La secreción de corticosteroides ha sido considerada como el primer mecanismo modulador (4), pero mecanismos independientes de los corticosteroides también participan en la modulación, pues una gran variedad de hormonas, bajo el control de la pituitaria, están asociadas a procesos inmunorreguladores (43). Las interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune son muy amplias e incluyen hormonas, catecolaminas, otras monoaminas (por ejemplo, serotonina e histamina), neuropéptidos y opiáceos. La investigación de todos estos procesos nos llevará al entendimiento del estrés y la adaptación en estados de salud y enfermedad.

Cuando tienen lugar estímulos adecuados, las desviaciones de las funciones del organismo producidas son compensadas por los mecanismos

de control correspondientes. Sin embargo, si los estímulos producen cambios que alteran la homeostasia del organismo, se activan mecanismos de alarma a través del sistema nervioso central, que ordena al organismo los cambios que se deben realizar. El sistema inmune es considerado como la mayor red integradora implicada en la adaptación biológica y resultará afectado por estos cambios. Asimismo, también el sistema endocrino resultará afectado, produciéndose cambios en gran número de hormonas entre las que destacan corticosteroides y catecolaminas (**Esquema 1**).

AGENTE ESTRESANTE

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

FISICO

5. NERVIOSO PARASIMPATICO. -

5. NERVIOSO SIMPATICO. +

MEDULA ADRENAL

+ A NA

↑ LIPOLISIS
↑ GLUCOGENOLISIS
↑ ACCELERACION CARDIACA
↑ PRESION ARTERIAL

CEREBRO

CA (CATECOLAMINAS)

↑ CATABOLISMO

PSIQUICO

5. NEUROENDOCRINO

HIPOTALAMO

CRH, GHRH..

PITUITARIA ANTERIOR

+ ACTH

+ CORTEZA SUPRARENAL

+ GLUCOCORTICOIDES

↑ GLUCONEOGENESIS
↑ LIPOLISIS
↑ GLUCOLISIS
ACCION ANTIINFLAMATORIA
EFECTOS EN SISTEMA INMUNE

+ GH

↑ MOVILIZACION RESERVAS

+ PRL

GLANDULAS MAMARIAS

↑ MOVILIZACION RESERVAS

+ TSH

TIROIDES

TIROXINA

↑ MUSCULO HIGADO

- LH

GONADAS

ESTROGENOS
ANDROGENOS
PROGESTERONA

↑ INHIBICION DE PRODUCCION
↑ ALTERACIONES INMUNES

- FSH

PITUITARIA POSTERIOR

+ AVP

↑ PRESION ARTERIAL
↑ REABSORCION R
? MEMORIA

ESQUEMA

I.4.1.- Respuestas del sistema endocrino al estrés.

El estrés se caracteriza por un número de cambios endocrinológicos, que no se limitan únicamente a la secreción de catecolaminas y esteroides adrenales, y que están regulados a través de las interacciones del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal-gonadal.

I.4.1.1.- Sistema nervioso simpático.

Uno de los primeros efectos del estrés sobre el organismo es la estimulación del sistema nervioso simpático que prepara al organismo frente a la situación de alarma. Tanto estímulos físicos como psicológicos producen una liberación de adrenalina y noradrenalina por la médula adrenal. Las ventajas de la producción de catecolaminas, en respuesta a los agentes estresantes, no están muy claras, pero sus principales consecuencias son: por un lado la aceleración cardíaca y el aumento de la presión vascular y, por otro, el aumento de la lipólisis, (glucógenolisis y gluconeogénesis,) que preparan el sistema cardiovascular para una acción repentina y aumentan la producción de energía, respectivamente (44).

Con respecto a la secreción de catecolaminas, se ha observado que los niveles de adrenalina y noradrenalina son variables, dependiendo de los tipos concretos de estrés. Condiciones impredecibles producen aumentos de adrenalina, que reduce sus niveles cuando la situación es controlada por el sujeto, sin embargo, la noradrenalina permanece

elevada en este último caso (45). Durante el ejercicio, y dependiendo de la intensidad o duración, se produce la secreción de ambas catecolaminas, pero la noradrenalina se presenta como más sensible. El incremento de noradrenalina durante el ejercicio parece estar relacionado con cambios subjetivos, como el malestar percibido durante un trabajo físico pesado (44).

Durante el estrés también se producen cambios en las catecolaminas cerebrales, incrementándose en algunas regiones del cerebro su catabolismo. Su efecto no era alterado por adrenalectomía, lo que sugería que no estaba mediada por la acción de corticosteroides o catecolaminas (46).

I.4.1.2.- Pituitaria anterior.

La pituitaria anterior o adenohipófisis segrega un número importante de hormonas que están afectadas bajo condiciones de estrés. Los cambios hormonales en la pituitaria anterior se centran fundamentalmente en los cinco puntos siguientes:

a) Eje pituitaria-adrenal.

La idea de que todo estímulo nocivo resulta en la estimulación del córtex adrenal ha sido mantenida desde finales de la década de los cuarenta y bajo influencia de Selye (4). La secreción de glucocorticoides potencia la estimulación del sistema nervioso

simpático y restaura las reservas de carbohidratos, activando la gluconeogénesis hepática. Esta respuesta está mediada por la secreción de la hormona adenocorticotropa hipofisaria (ACTH), que tiene una acción movilizadora de grasas. Diferentes estudios en humanos han puesto de manifiesto la falta de importancia del mecanismo de retroinhibición negativo en el control de la activación del eje pituitaria-adrenal, inducida por el estrés (47).

La intensidad del estímulo (48) y factores como la ansiedad, tensión, exposición aguda a frío, hipoglucemia inducida, actividad muscular... determinan la respuesta adrenocortical al estrés. La exacta importancia de esta liberación de hormonas glucocorticoides no está muy clara. Desde el punto de vista metabólico, incrementan la razón de la gluconeogénesis hepática por un mecanismo, que de algún modo, incrementa la respuesta de la ruta gluconeogénica al AMP cíclico (44).

La liberación de ACTH está acompañada en ratas por la secreción de β -Endorfina; ambos péptidos son cortados, presumiblemente por la acción del factor liberador de la corticotropina (CRF), de una molécula precursora de gran tamaño, la β -Lipotropina (β -LPH) (49). La β -Endorfina, péptido opiáceo con potentes propiedades analgésicas en animales (50), está presente en el fluido cerebroespinal humano y está asociada con la analgesia producida en humanos por estimulación eléctrica del cerebro. Asimismo, es producida como respuesta a la cirugía en el hombre.

Otras dos endorfinas, la alfa y la gamma, con actividad morfinomimética han sido identificadas como derivadas de la β -LPH (51). Todos estos péptidos opiáceos intervienen en procesos regulatorios del sistema inmune, funcionando como neuromoduladores. Así, es probable que la estimulación del eje pituitaria-adrenal esté asociada con la liberación de péptidos opiáceos endógenos, que tienen efectos benéficos sobre el organismo estresado.

b) Hormona del crecimiento (GH).

Una gran variedad de situaciones que estimulan la secreción de ACTH provocan también la liberación de la hormona del crecimiento, pero los mecanismos control para ambas hormonas son independientes. Se ha observado que la administración del factor liberador de la corticotropina (CRF) sólo estimulaba la secreción de ACTH, y era inefectivo en estimular la liberación de GH, en el hombre. Por otro lado, hay pequeñas evidencias del papel de los péptidos opiáceos endógenos en el control de la GH (52).

Se ha demostrado la liberación de GH en respuesta a estímulos psicológicos, pero no es una respuesta inevitable a este tipo de agentes estresantes, ya que no aparece en todos los sujetos (53). La función de la secreción de GH, en respuesta al estrés, no está clara, pero durante el ejercicio es probable que lleve a la movilización de lípidos desde las grasas y de reservas de glucosa, restringiendo la entrada de metabolitos en el músculo y las células adiposas (52).

c) Prolactina (PRL).

Varias formas de estrés (factores psicológicos, inmovilización, cirugía, éter..) estimulan el incremento rápido de PRL en plasma, tanto en machos como en hembras. La importancia funcional de esta liberación, en especial en el hombre, permanece oscura, pero a causa de su papel como hormona osmorreguladora en peces, se ha sugerido la existencia de esta misma función en humanos. En altas dosis, la PRL tiene acciones metabólicas similares a la GH, pero sus patrones de secreción durante situaciones estresantes son diferentes (44). La regulación de la secreción de PRL difiere de los niveles iniciales de la PRL plasmática en las diferentes condiciones fisiológicas y parece no depender exclusivamente del eje pituitaria adrenal, a través de la liberación de corticosteroides (54).

d) Gonadotropinas.

Existen pequeñas evidencias que sugieren que las gonadotropinas están afectadas por el estrés. Han sido demostradas significativas reducciones en los niveles de plasma de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en los días siguientes a un proceso quirúrgico (55). El papel de estas hormonas en la respuesta inmediata al estrés no se conoce.

e) Tirotropina (TSH).

Estudios en animales sugieren que la hormona estimulante del

tiroides (TSH) es inhibida por el estrés, probablemente debido al efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la pituitaria y/o el hipotálamo. Este efecto supresivo de los glucocorticoides ha sido demostrado sobre la respuesta de TSH al factor liberador de la tirotropina (TRF), pero no está claro en situaciones de estrés en humanos (56).

Además, un incremento, aunque pequeño, de TSH ha sido observado en sujetos sometidos a estrés psíquico, lo que sugiere que ciertos factores psicológicos pueden estimular la secreción de TSH (44).

I.4.1.3.- Pituitaria posterior.

El estrés quirúrgico produce un incremento de la vasopresina arginina (AVP), en humanos. Por otro lado, el ejercicio estimula la secreción de AVP, pero al igual que las catecolaminas, el cambio está relacionado con la intensidad y la duración de éste. Bajo estas condiciones, su regulación depende probablemente de la osmolaridad (57). Aunque sus efectos primarios son ejercidos sobre el riñón y el sistema cardiovascular, aumentando la presión arterial, recientemente se ha sugerido que tiene efectos sobre la potenciación de la consolidación y recuperación de la memoria (58).

I.4.1.4.- Esteroides gonadales (Hormonas sexuales).

La aplicación de diversos agentes estresantes provoca una disminución de los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales: estrógenos, andrógenos y progesterona (59). El efecto inhibitorio del estrés en la reproducción, es mediado al menos en parte por el efecto de los glucocorticoides en la pituitaria, actuando sobre la secreción de LH pero sin alterar la de FSH, cuando las concentraciones de glucocorticoides son fisiológicas (60). Por otro lado, el estrés prenatal modifica el comportamiento sexual de ratas machos y hembras, al alterar la razón de adrenales a esteroides gonadales, durante los estados críticos de diferenciación sexual (61).

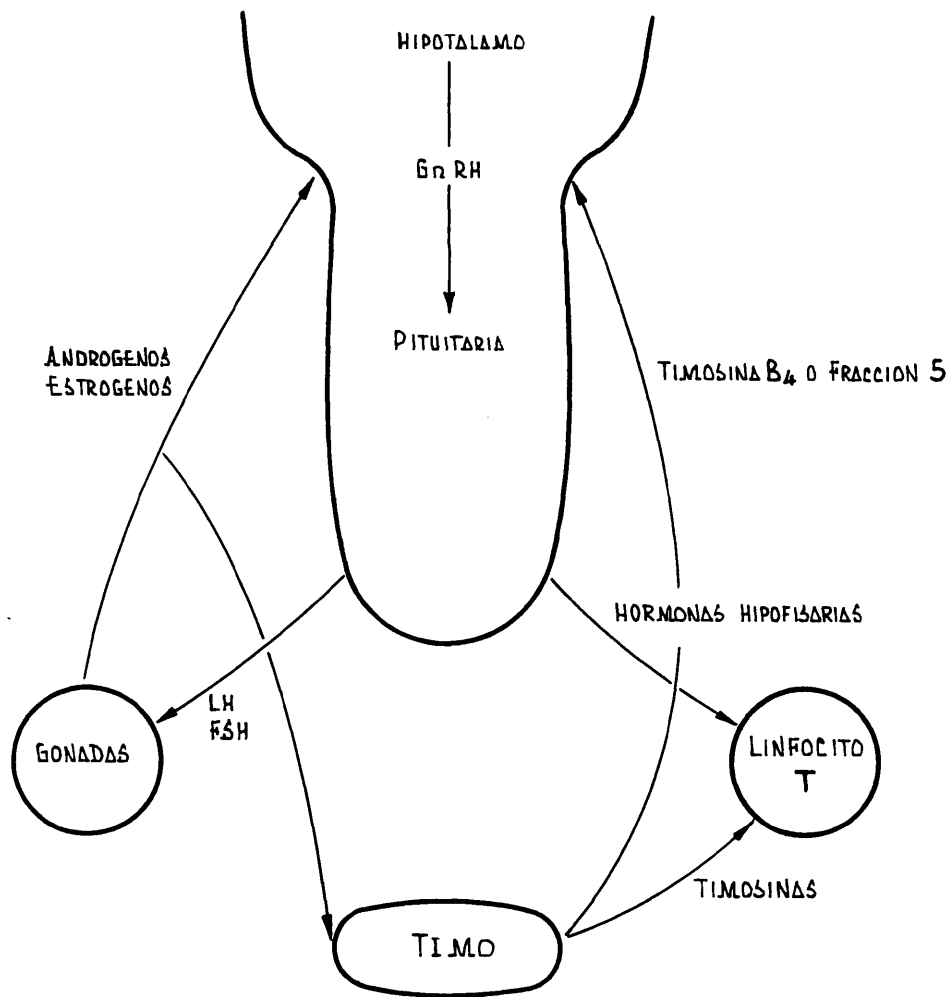
El sistema inmune está regulado por los esteroides gonadales, y al mismo tiempo los niveles circulantes de estos esteroides pueden estar también afectados por la función inmune. La hipótesis de que los esteroides gonadales regulan la función inmune está sustentada por las siguientes observaciones: a) dimorfismo sexual de la respuesta inmune, b) alteración de la respuesta inmune por gonadectomía y administración de esteroides sexuales, c) alteración de la respuesta inmune durante el embarazo, cuando aumentan estos esteroides y d) los órganos sensibles para la respuesta inmune contienen receptores específicos para los esteroides gonadales (62).

Todas estas interacciones parecen estar mediadas a través de un eje hipotálamo-pituitaria-adrenal-timo, donde dos hormonas, la fracción 5 de la timosina y la timosina β_4 , parecen jugar un papel

crucial, estimulando la liberación de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo (63). Observaciones hechas por diversos autores (64) apoyan la existencia de relaciones bidireccionales mediadas por hormonas entre el timo y el sistema reproductivo, así por ejemplo, el tratamiento neonatal con estrógenos altera los patrones de secreción de hormonas tímicas, que llevan a la modificación de la diferenciación de timocitos y a un desbalance en la función gonadal (**Esquema 2**).

Aunque los estrógenos y andrógenos pueden actuar como inmunoinhibidores e inmunoestimuladores, actúan principalmente suprimiendo el sistema inmune mediado por células, aunque no necesariamente suprimen el mismo tipo de subpoblaciones linfoides. Los estrógenos pueden ser estimuladores del sistema inmune humoral a través de la estimulación de las células auxiliares e inhibición de las supresoras. Los andrógenos también pueden estimular la inmunidad humoral, posiblemente a través de su conversión a estrógenos. La razón de estrógenos a andrógenos podría determinar que las hormonas circulantes actuaran como inmunoestimuladoras o inmunoinhibidoras.

Observaciones como la reaparición del timo después de la orquidectomía, en ratas de edad avanzada y la inhibición de esta regeneración por implantes de testosterona; la atrofia provocada por estradiol y progesterona, así como la depresión de la función de las células T por estrógenos, vienen a apoyar la idea de que los esteroides sexuales regulan la función inmune, desempeñando un papel fundamental el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal-timo (65-67).



INTERACCIONES DEL EJE

HIPOTALAMO-PITUITARIA-GONADAL-TIMO

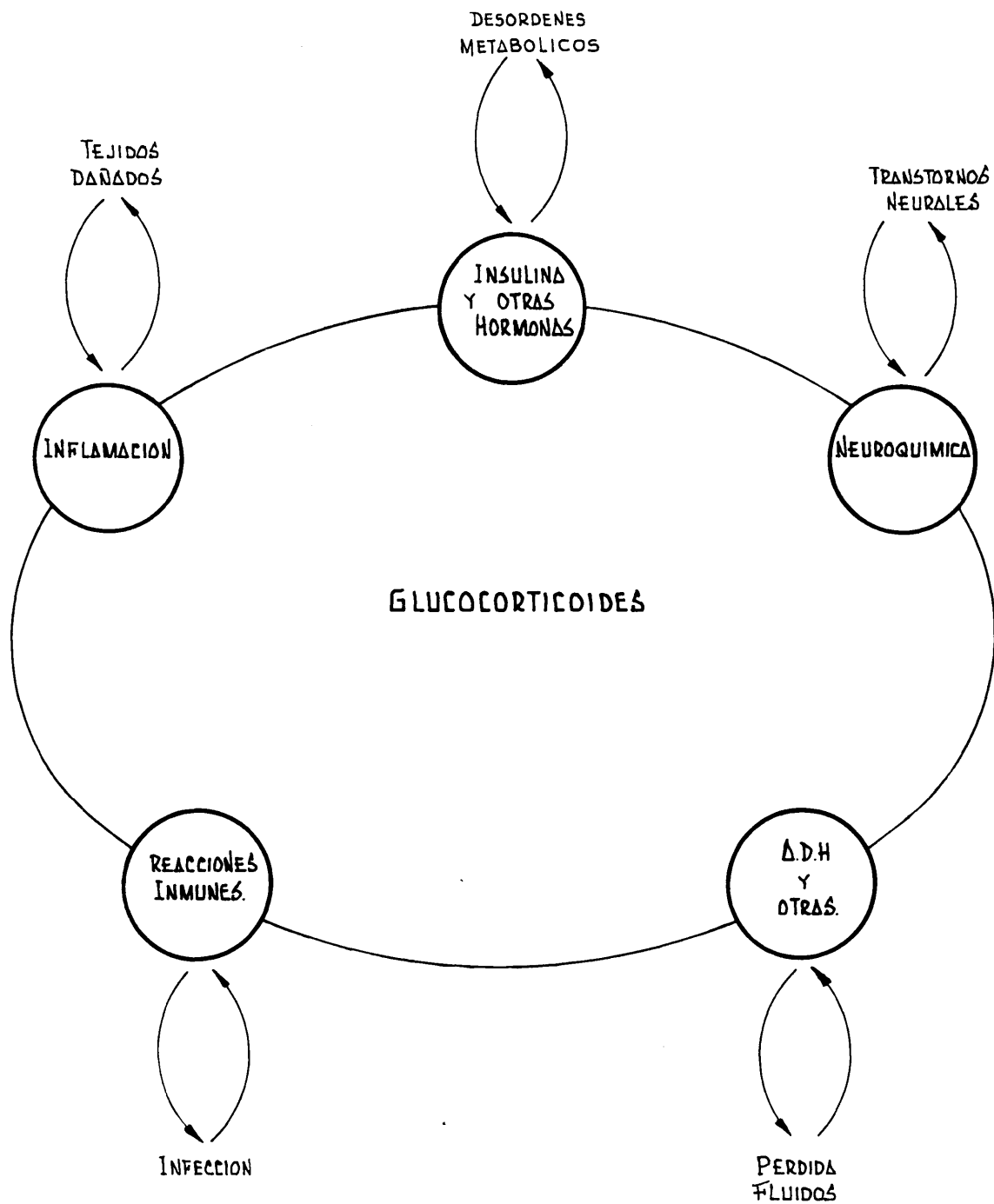
I.4.1.5.- Efectos de los glucocorticoides sobre los procesos inmunes.

Los glucocorticoides han sido considerados como el primer modulador de la inmunidad bajo condiciones de estrés. Tienen profundos y complejos efectos en la respuesta inmune, pero los mecanismos por los que inducen la inmunorregulación no están totalmente definidos, a pesar de los extensos estudios realizados en numerosos modelos animales. La extrapolación de resultados es compleja, ya que frecuentemente, los estudios "in vitro" han sido realizados con dosis suprafarmacológicas de glucocorticoides y los datos obtenidos en especies esteroide-sensibles, como la rata o el ratón, no pueden aplicarse de forma fiable en especies esteroide-resistentes, como el hombre. También ha sido encontrada diferente efectividad, según los glucocorticoides utilizados, apareciendo diferencias dentro de una misma especie por sexo, edad y tipo celular (28) e incluso por la fase del ciclo celular (68).

Tradicionalmente se ha asignado a los glucocorticoides la función de conferir resistencia al estrés. Las teorías de Selye (4) postulaban los efectos regulatorios de los glucocorticoides en el estrés. Posteriormente, Ingle y otros investigadores (69, 70) encontraron evidencias de que los glucocorticoides podían funcionar permisivamente, tolerando la expresión normal de ciertas respuestas al estrés. Estos efectos permisivos no requerían niveles incrementados de glucocorticoides para conferir la resistencia al estrés. Contrariamente al punto de vista tradicional de que los glucocorticoides potencian los mecanismos de defensa, resultados más

recientes, como el descubrimiento de la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides, apoyan la idea de supresión de los mecanismos normales de defensa, más que la potenciación. Actualmente, se aceptan las manifestaciones de las funciones fisiológicas de los glucocorticoides durante situaciones de estrés y, además, la evidencia de que estas hormonas confieren protección al organismo, en estas situaciones. Con respecto a esto, Munck y colaboradores (70) en una revisión del año 1984 proponen que el incremento producido en los niveles de glucocorticoides por el estrés protege no contra la fuente de éste en sí misma, sino contra las reacciones normales del cuerpo al estrés, que podrían llevar a la alteración de la homeostasia (Esquema 3).

La degeneración del timo y otros órganos linfoides, en respuesta al estrés, ha sido atribuida a la acción de las hormonas adrenocorticales liberadas durante este período, sin embargo existen datos que indican disminución del peso del timo y bazo en animales adrenalectomizados y gonadectomizados, sujetos a estrés con respecto a animales operados no estresados (59). El sistema inmune también puede influir en la función adrenal: la inyección de sobrenadantes con linfokinas causa un aumento de glucocorticoides circulantes, en ratones y humanos, y la administración de fracción 5 de timosina causa un incremento dosis-dependiente de la corticosterona (71). El efecto inmunosupresivo de los glucocorticoides puede ser contrarrestado por las hormonas tímicas, bloqueando la unión del esteroide a su receptor, convirtiendo linfocitos esteroide-sensibles en esteroide-resistentes (72), pudiendo considerarse así al timo como un órgano antiestrés.



ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Los efectos de los glucocorticoides en el sistema inmune son muy variados, a continuación vamos a exponer algunos de los más significativos:

A nivel subcelular: Los efectos intracelulares están mediados a través del receptor de los glucocorticoides. Los glucocorticoides se unen a un receptor citoplasmático específico, el complejo activado se transloca al núcleo, interactúa con el genoma en la modulación de la expresión génica, produciéndose la transcripción del RNA mensajero y la síntesis de proteínas. La presencia de estos receptores específicos no garantiza la sensibilidad de la células a los glucocorticoides, pues se ha encontrado que líneas celulares resistentes a los glucocorticoides presentan altos niveles de receptores (73). Por otro lado, estudios sobre la capacidad "in vitro" de los corticosteroides de afectar diferencialmente la proliferación de linfocitos, de distintos tipos celulares, sugieren que estas hormonas pueden regular la ruta de maduración intratímica y, aunque la relevancia de la alta expresión de receptores en células precursoras intratímicas no está clara, la densidad de receptores puede considerarse como un marcador de diferenciación para los linfocitos T (74). Sin embargo, no puede concluirse que parámetros relacionados con la densidad y la afinidad de unión sean importantes en las respuestas de las células a los glucocorticoides, ya que otros mecanismos subcelulares pueden intervenir en la inmunorregulación, como la razón del metabolismo del cortisol (diferente en células T y B, podría explicar la diferente

sensibilidad de ambos tipos celulares) (75) o la concentración del AMP cíclico (76) o alteraciones de membrana celular y nucleares (77).

A nivel celular: Diferentes observaciones sobre los efectos líticos de los glucocorticoides han intentado explicar los mecanismos de regulación inmune. La citolisis de los timocitos inmaduros, mediada por glucocorticoides a través de la degradación del DNA, podría producirse por inducción de un proceso autolítico en las propias células (78). Además, timocitos tratados con dexametasona inducen unos productos de genes líticos con actividad nucleasa (79). En estudios "in vitro" Cidowski (80) encontró degradación de RNA producida por dexametasona. También se producía degradación proteica en células de bazo murinas tras administración de glucocorticoides (81) y ratas tratadas con dexametasona presentaban degradación de DNA (82). Otros datos como la lisis producida en el linfoma S-49 por glucocorticoides, a través de la mediación de receptores, no es encontrada en otros linfomas y linfocitos normales, que presentan resistencia al efecto lítico a pesar de tener receptores (83). Resultados obtenidos por otros autores (84) apoyan la teoría de lisis celular, pero independiente de los glucocorticoides y producida por gránulos formadores de canales, llamados perforinas. Finalmente, la desaparición de células corticales tímicas por exposición sistemática a glucocorticoides parece no depender de éstos pues persiste en animales adrenalectomizados (85), lo que viene a apoyar una explicación más compleja del mecanismo de involución por el estrés.

Los glucocorticoides pueden mediar la liberación de factores

solubles, inhibiendo la producción "in vitro" de interleukina-2 (IL-2) (86), interleukina-1 (IL-1) e interferón (IFN) (70, 87, 88). Además suprimen la producción del activador del plasminógeno en monocitos e inhiben la liberación de histamina (70, 89). La modulación de la liberación de mediadores solubles puede ser un mecanismo potencial importante en la inmunorregulación.

Con respecto a la proliferación, distintos autores (68, 70, 90) han encontrado un efecto inhibitorio, mediado por la IL-2 a través de la inhibición de la liberación de ácido araquidónico y la liberación de leukotrienos. La adición de glucocorticoides a células de bazo murinas también deprimía la respuesta proliferativa (91). Las respuestas proliferativas de linfocitos a corticosteroides son muy variables, el tipo de cepa, sexo y la dosis empleada pueden influir en ellos. Dosis farmacológicas disminuían la estimulación de linfocitos por mitógenos (92), sin embargo eran requeridas dosis bajas para la proliferación (71), mostrando así un efecto diferente según la dosis. Sin embargo, la supresión, inducida por el estrés, de la estimulación de linfocitos esplénicos y periféricos con agentes mitóticos como la fitohemaglutinina (PHA), persistía en ratas adrenalectomizadas (93). Así, un mecanismo independiente de las glándulas adrenales debe influir en la supresión la inmunidad, bien por disminución de poblaciones T funcionales o redistribución en tejidos linfoides.

La producción de anticuerpos contra antígenos timo dependientes e independientes resultaba afectada con la presencia de implantes de corticosterona (94). Además, la disminución en el título de

anticuerpos contra eritrocitos de oveja también era observada en ausencia de cápsulas suprarrenales (95).

Los niveles de inmunoglobulinas G y A (IgG Y IgA) y en menor medida la inmunoglobulina M (IgM) disminuyen por los corticosteroides, mientras que los niveles de inmunoglobulina E (IgE) son aumentados. A estos efectos se suma la posible inducción de la maduración "in vitro" de las células B a células productoras de anticuerpos (89).

Sobre otros tipos celulares, los glucocorticoides ejercen efectos diversos entre los que se pueden enumerar: inhibición y potenciación de la actividad NK, tanto "in vivo" como "in vitro" (68, 89); inhibición de la actividad fagocitaria de leucocitos humanos y supresión de la sensibilidad de macrófagos al IFN y de la actividad humoral de éstos (87); retraso en el desarrollo de las células T supresoras, cuando eran adicionados previamente y sin efectos cuando la adición era posterior (89); y actuación sobre la función de las células T auxiliares en aves (94).

Cambios en la migración de las células linfoides: El papel de los esteroides adrenales en la regulación de la migración de células precursoras hemopoyéticas puede ser de importancia fisiológica. Esta migración, medida como formación de colonias endógenas, disminuía con el estrés e incrementaba con la adrenalectomía, desde la médula ósea a la sangre y de ahí al bazo (96). Parecía pues que el proceso estaba controlado en parte por el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Otros datos indican que los corticosteroides deprimen la blastogénesis de

las células precursoras, por lisis o alteraciones celulares (28).

La administración "in vivo" de glucocorticoides resulta en un incremento de los neutrófilos circulantes y dosis farmacológicas de corticosteroides, independientemente de la lisis celular, inhiben la migración "in vitro" de linfocitos periféricos y esplénicos, resultando más afectados los B que los T. El mecanismo de inhibición puede envolver procesos moleculares o subcelulares, afectando a un receptor de superficie, la actividad esterasa, niveles de nucleótidos cíclicos, inducción de ensamblaje de microtúbulos o actividad de microfilamentos (97).

Otros autores han apuntado que la redistribución podría estar alterada por migración de células de la circulación a la médula ósea o por una mayor liberación de células desde el timo, explicándose la existencia de poca cantidad de linfocitos en plasma, con altas concentraciones de glucocorticoides, como la adquisición por parte de las células de una vida media muy corta (92, 98). El mecanismo que induce la redistribución no está bien clarificado, alteraciones en la configuración molecular de la superficie de la membrana pueden resultar en cambios en los patrones de migración (97). La redistribución puede ser un mecanismo homeostático, en las respuestas inmunes normales y los cambios producidos por glucocorticoides pueden ser un mecanismo importante en el efecto inmunorregulador de estos agentes.

En resumen, estos fenómenos no parecen estar únicamente

relacionados con los esteroides adrenales (y también gonadales), ya que el estrés puede alterar componentes del sistema inmune en ausencia de estas hormonas (59).

I.4.2.- Relaciones entre el sistema nervioso central y el sistema inmune.

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios que han puesto de manifiesto la existencia de una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Ambos sistemas desempeñan una función similar en el mantenimiento de la homeostasis y la integridad del organismo con respecto al ambiente externo. Mientras que el sistema nervioso central está envuelto en el desarrollo de la función inmune, este último es un mediador potencial de los fenómenos psicósomáticos.

Esta interacción entre los procesos neuroendocrinos e inmunes se basa en numerosos estudios y evidencias, algunas de las cuales resumimos a continuación:

- Ambos sistemas están comunicados directamente a través de conexiones específicas. El sistema nervioso autónomo tiene conexiones con el timo, esta inervación podría ser necesaria para su desarrollo. Los nervios crecen hasta el momento, durante el desarrollo de la glándula, que empiezan a llegar células T inmaduras. Experimentalmente se ha observado que el timo rudimentario de ratones desnudos presenta una inervación anormal. El bazo, nódulos linfáticos y la médula espinal presentan, también, inervaciones nerviosas. Es una inervación precisa que generalmente finaliza en regiones ricas en células T, evitando las áreas que contienen células B en desarrollo. El camino por el que la inervación afecta la función inmune no se conoce muy

bien, pero podría ayudar a regular el movimiento celular en y a través de varios órganos inmunes. Podemos decir que, en un sentido anatómico, hay un ambiente propicio para la regulación neural directa del sistema inmune (99, 100).

- Las células inmunes poseen receptores de membrana que son capaces de responder a numerosas sustancias químicas, conocidas como transmisores o moduladores de señales nerviosas. Así, se han encontrado en timocitos y linfocitos receptores para hormonas controladas por el sistema nervioso central y neurotransmisores como acetilcolina, norepinefrina, péptidos opiáceos, somatotropina (STH)... Estos receptores son considerados como importantes para la diferenciación de los linfocitos y el control de su actividad. Además, estos agentes neuroactivos pueden alterar las funciones inmunes celulares, produciendo incremento o disminución según el agente usado y la célula que responde. Por ejemplo, ACTH, α -Endorfina y encefalinas suprimen la producción "in vitro" de anticuerpos y ACTH es necesaria para la transformación de timocitos en células inmunocompetentes (21, 26, 28, 99, 100).

- La función inmune puede ser alterada por tratamientos que destruyen áreas específicas del cerebro. Las lesiones producidas en la región anterior del hipotálamo decrecen una gran variedad de funciones, mientras que las lesiones en la amígdala o el hipocampo producen un incremento en estas mismas funciones. Stein y colaboradores (38) encontraron que lesiones en el hipotálamo basal anterior reducían la severidad de la respuesta anafiláctica en cobaya,

además de los títulos de anticuerpos y las respuestas de hipersensibilidad retardada. Los mecanismos inmunes pueden ser modificados por la interrupción de las rutas neuronales, aunque los cambios producidos en el número y función de las células de bazo, médula y timo pueden mediar también estas alteraciones. Finalmente, la estimulación de nervios periféricos o del cerebro también pueden alterar la función inmune (43, 99, 100).

- El sistema inmune también puede estimular al sistema nervioso. La estimulación antigénica produce cambios eléctricos en el hipotálamo con el incremento de las descargas neuronales. Así, los órganos y células inmunes pueden tener la capacidad de influir en las actividades neuronales, siendo el cerebro informado de la invasión de antígenos extraños a través del sistema inmune (21, 99, 100).

- También se ha sugerido que los cambios en la actividad neuronal eran causados por productos solubles, llamados linfokinas, que eran liberadas por linfocitos activados. Estos productos incluyen algunos agentes como IFN, IL, ... que tienen efectos neuronales (99). Hall y Goldstein han propuesto para éstos la denominación de **inmunotransmisores**, por analogía con los neurotransmisores, que transmiten señales nerviosas. Estos mismos autores han comunicado (71) que hormonas tímicas, que son necesarias para la maduración normal de las células T, tienen efectos en el cerebro. Ellos encontraron que la fracción 5 de la timosina actuaba a través del hipotálamo y pituitaria incrementando la concentración de corticosterona. Este resultado puede parecer contradictorio, considerando el efecto supresor en el sistema

inmune que pueden tener los esteroides, pero estos autores proponen que es parte de la regulación normal de las respuestas inmunes.

En un principio las timosinas podrían proteger a la respuesta inmune de los efectos supresores de los esteroides, induciendo la maduración de linfocitos (mucho menos susceptibles a los esteroides que las células inmaduras). Las timosinas, al aumentar los niveles de corticosterona, ayudarían a la reducción o finalización de la respuesta inmune, una vez que el agente invasor estuviese bajo control. La acción supresiva de los esteroides prevendría, así, la activación de linfocitos maduros adicionales, mientras que los ya activados seguirían actuando (71).

- Alternativamente, el efecto del sistema inmune en el sistema nervioso puede ser mediado por neurotransmisores más típicos, neuromoduladores u hormonas, que pueden ser producidos por los linfocitos activados, como ACTH, péptidos opiáceos.. Algunas de estas hormonas pueden funcionar como linfokinas en la regulación de otras linfokinas, así la vasopresina y oxitocina reemplazan a la IL-2 en la producción de IFN-gamma, mientras que ACTH la suprime. β -Endorfina y encefalina aumentan la mitogénesis y las rosetas en las células T (99, 100).

Basándose en todos estos datos, enunciados anteriormente, Blalock (100) considera que el sistema inmune puede servir como órgano sensorial para estímulos no reconocidos por el sistema clásico sensorial. Considerando todas las interrelaciones entre sistema

nervioso y sistema inmune con receptores, linfocinas y péptidos endocrinos comunes se ha propuesto, dentro de una lógica base bioquímica, que ambos sistemas comparten grupos similares de péptido señal y receptores. El sistema inmune tiene receptores que reciben estímulos no cognitivos (bacterias, virus, antígenos..) que no son reconocidos por el sistema nervioso central. Esta información es transmitida al sistema endocrino, mediante hormonas producidas por linfocitos, produciéndose un cambio fisiológico. Por otro lado, el sistema nervioso central reconoce estímulos cognitivos, que resultan en una información hormonal, que tras ser reconocida por receptores linfoides, produce cambios inmunológicos. Los dos sistemas forman por tanto un circuito integrado, cuyo estudio nos puede llevar al conocimiento de todos los procesos que envuelven a la enfermedad, la salud y los fenómenos de estrés (21, 99, 100).

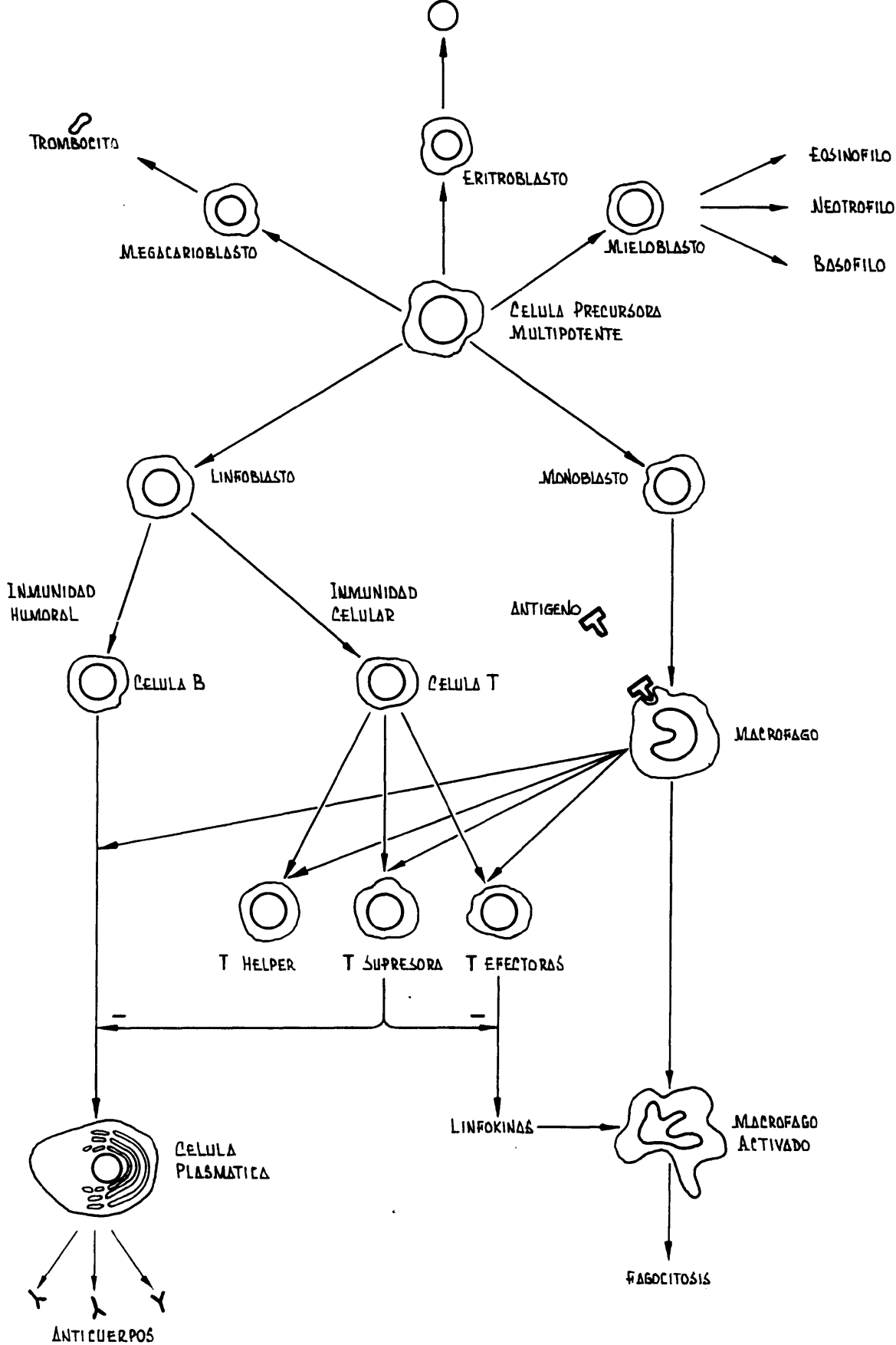
I.4.3.- Proceso de migración y diferenciación de las células linfoides.

El mantenimiento de los correctos patrones de migración y diferenciación de las células linfoides es de gran importancia para el desarrollo de la inmunocompetencia, por lo cual, la alteración de estos patrones podría explicar algunos de los efectos que ejerce el estrés sobre el sistema inmune.

I.4.3.1.- Origen de las células linfoides.

Las células precursoras linfoides proceden inicialmente de los islotes mesodérmicos (del saco vitelino) y del hígado fetal durante la embriogénesis y de la médula ósea después del periodo neonatal (101-103). Las células precursoras multipotentes migran hacia un órgano linfoide primario, el timo en el caso de las células T y la médula ósea (en mamíferos) o la bolsa de Fabricio (en aves), en el caso de las células B (101). (Esquema 4).

Las primeras células llegan al timo cuando aún no está vascularizado, por lo que deben atravesar el mesénquima tímico y finalmente invaden la membrana tímica hasta su inserción entre las células epiteliales. Con posterioridad, y después de la vascularización, prosigue la entrada de linfocitos en número exponencialmente creciente, ya a través de los vasos (85, 101).



ORIGEN Y DIFERENCIACION DE LAS CELULAS INMUNES
A PARTIR DE LOS PRECURSORES DE MEDULA OSEA

Esta migración de células, capaces de expresar marcadores de células T (104), ha sido demostrada por la capacidad de una subpoblación de células de médula ósea de repoblar el timo de un huésped irradiado, detectado mediante marcadores cromosómicos y fluorescencia (103). También, una población murina de médula ósea migraba "in vitro" frente a sobrenadantes producidos por timo neonatal o células epiteliales tímicas en cultivo (105).

La migración es una respuesta quimiotáctica específica a factores producidos por células epiteliales tímicas y, a partir de una segunda oleada celular, por timocitos residentes en la glándula, que generan una segunda señal complementaria a la del epitelio (106-109).

En el feto, los factores tímicos pueden funcionar como una molécula mensajera retroinhibidora que induce algunos tipos de células y mantiene o suprime otros, en órganos productores de células que entran en un procesamiento intratímico u órganos receptores de células ya procesadas (110). Algunos factores tímicos conocidos como la timulina, el factor tímico sérico (FTS) o la timopoyetina (TP-5) no mostraban actividad quimiotáctica en ensayos de migración "in vivo" e "in vitro" (105).

Muchos de los factores o péptidos quimiotácticos, aunque la gran mayoría no han sido identificados, parecen ejercer una función dual, controlando la migración orientada e induciendo comportamientos invasivos transitorios. Recientemente, Imhof y colaboradores (104) han obtenido un péptido quimiotáctico de epitelio tímico, llamado

timotaxina, que induce la migración de células hemopoyéticas de médula de rata, que eran capaces de expresar marcadores de células T, cuando entran en contacto con cultivos embrionarios de timo. Otro factor, el TCF (factor quimiotáctico de linfocitos T) ha sido purificado a partir de medio condicionado de leucocitos mononucleares de sangre humana, estimulados con PHA; este factor mostraba similitud en la secuencia aminoterminal con una proteína activadora de neutrófilos (NAP-1), que también era quimiotáctica para linfocitos T "in vitro" (111). Además, parece que el timo puede afectar indirectamente la producción de células precursoras, a través de los factores humorales tímicos que modulan la producción de factores estimulantes de colonias (112).

I.4.3.2.- La glándula tímica: un órgano linfoide primario.

El timo, que pertenece a la familia de las glándulas endocrinas, ejerce su función biológica al menos mediante dos mecanismos:

- proporcionando un microambiente en el que las células T precursoras de la médula ósea maduren y se diferencien.
- secretando un número de polipeptidos tímicos que ha sido mostrado que están implicados en la inducción de la maduración y diferenciación, así como la modulación de las respuestas inmunes de las células T (112).

El timo es una glándula que, en el hombre, está formada por dos lóbulos y que se encuentra situada en la parte anterior del tórax,

inmediatamente bajo el esternón y cuya función ha sido una incógnita durante muchos años. El estudio del papel del timo en el desarrollo del sistema inmune es una de las bases en las que se asienta la inmunología moderna. El timo es el lugar principal de generación linfoide, y determina, en parte, los patrones específicos de respuesta de las células T. La mayor parte de estas células linfoides mueren en el timo y sólo una pequeña porción es exportada a la periferia (113).

Factores como la raza, el sexo y edad de los animales influyen en el peso del timo y el número de células de éste (112). El timo está muy desarrollado en un animal joven, crece desde el nacimiento hasta la pubertad. En el ratón, su peso varía entre el 0.5% y 1% al inicio del período neonatal. En el hombre va aumentando de tamaño, en relación al crecimiento general, hasta los 8-10 años, a partir de entonces la glándula se retrasa y empieza a atrofiarse lentamente. Estas alteraciones de tamaño con la edad van acompañadas de alteraciones histológicas. En su estado más desarrollado el timo está constituido por una cápsula de tejido conectivo y una porción cortical y otra medular, constituidas por linfocitos y células epiteliales y unas estructuras de características únicas, los corpúsculos de Hassall. Además de la disminución constante del peso, se produce una disminución de la relación corteza-médula, una disminución de los corpúsculos de Hassall, pérdida del parénquima tímico y aparición de grasa. Todas estas alteraciones se conocen como involución por la edad (114). También se produce involución tímica durante los estados de gestación, que continúa durante la lactancia (115).

Muchos casos de enfermedades producen una involución tímica caracterizada por la pérdida de peso, este proceso es conocido como involución tímica por estrés y da lugar, también a cambios histológicos, con un aumento de formas quísticas en los corpúsculos de Hassall, aparición de agregados epiteliales en la médula tímica, pérdida de corteza tímica y aparición de células cebadas. El timo es uno de los órganos que más sufre los efectos del estrés; infecciones agudas, lesiones, irradiación... provocan una disminución del volumen tímico y, por tanto, una atrofia por estrés (116).

I.4.3.3.- Diferenciación intratímica de linfocitos.

El timo es el lugar de diferenciación primario para los linfocitos T y, además, juega un papel crítico en la generación de las células T inmunocompetentes. El microambiente tímico desempeña un papel crucial en la diferenciación de las células precursoras en células T; para esta maduración son necesarias interacciones directas célula a célula, especialmente entre linfocitos y células epiteliales (85). Así se ha demostrado recientemente que los timocitos humanos se unen a células epiteliales tímicas "in vitro" y que estas mismas células epiteliales pueden funcionar como accesorias para la activación de timocitos maduros (117).

Los protimocitos, que entran en el timo, experimentan una selección clonal, expansión y maduración. La región cortical, que

contiene los timocitos inmaduros proliferantes, es el lugar más activo para la linfopoyesis del organismo, que parece tener lugar de forma continua y sin estimulación antigénica. El estímulo procede probablemente del mismo timo, sin depender de influencias externas o mecanismos de autorregulación (118), con respecto a esto, evidencias de la estimulación de la linfopoyesis por células epiteliales tímicas fueron detectadas ya en 1956 por Grégoire y Duchateau (119).

En el proceso de proliferación las células son seleccionadas para la madurez inmunológica o la muerte. Se ha observado que los linfoblastos reemplazan el 25% de los timocitos por día, pero sólo el 1% de las células es exportado por el timo. Metcalf (120) ya comentaba que el 95% de los timocitos eran destruidos "in situ". Estos linfoblastos, retirados de la ruta de maduración, mueren gradualmente, permaneciendo en la fase G_0 o G_1 en el timo, hasta tres días después de la última división de los precursores blásticos. Se ha observado que aunque células corticales son lisadas por exposición sistemática a glucocorticoides, su muerte no depende de los esteroides, pues continua más o menos programada en animales adrenalectomizados (85, 121). La muerte programada envuelve un grupo de alteraciones enzimáticas, controladas en algunos casos por el nivel incrementado de síntesis "de novo" de proteínas (por ejemplo, la desoxinucleotidil transferasa terminal o TdT) (85).

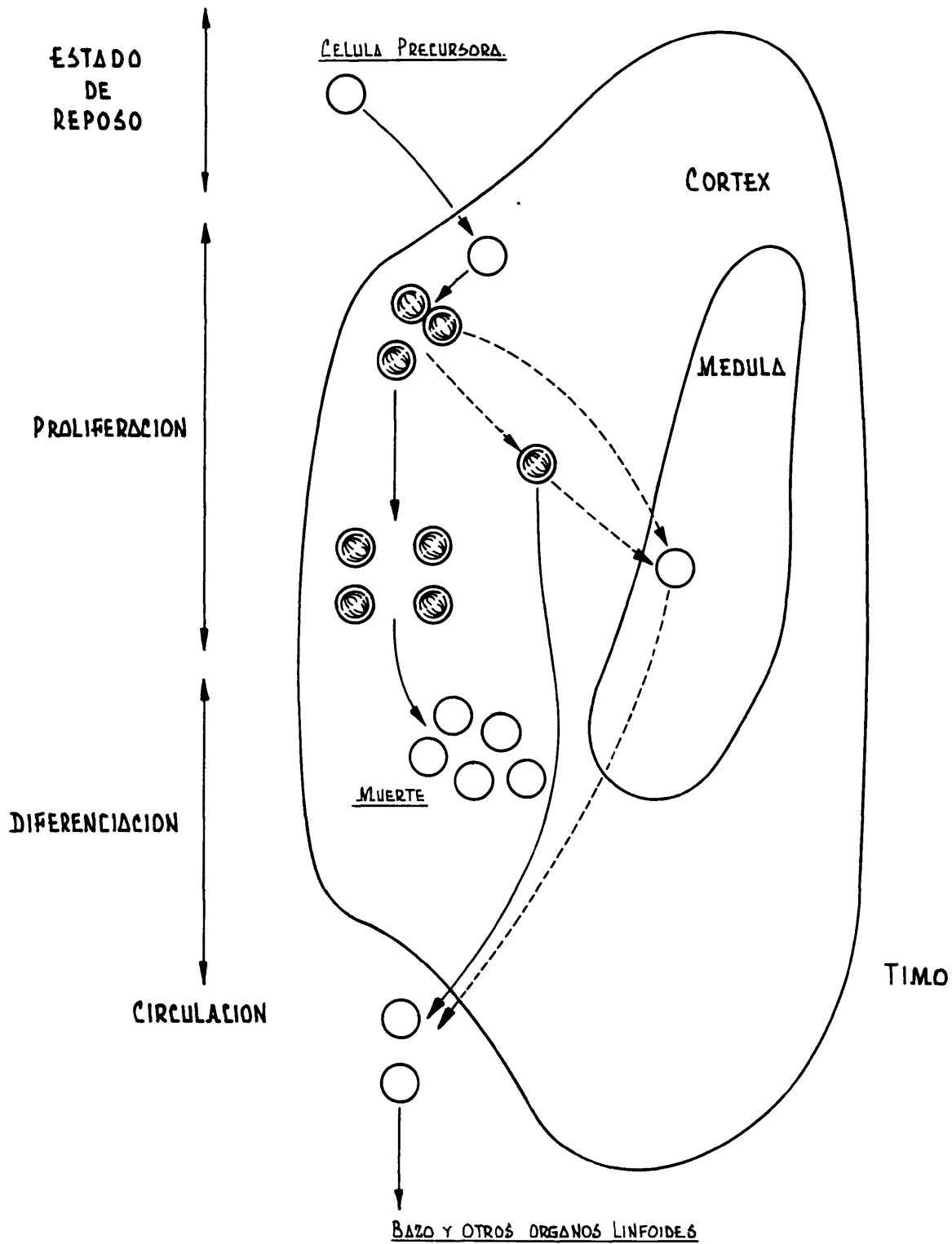
La presencia de una involución tímica prolongada (provocada por una situación de estrés crónico, por ejemplo) es achacada a la inhibición de esta mitosis linfocitaria o a una disminución en el

número de células repobladoras del timo a partir de la médula ósea (122).

El criterio de maduración tímica se basa en la aparición o desaparición de marcadores de diferenciación fenotípicos pero también en la actividad funcional en respuesta a mezclas de linfocitos y generación de células T citotóxicas. La diferenciación tímica envuelve la reordenación de genes que codifican los receptores antigénicos (TCR), capaces de interactuar con el antígeno, y la expresión de un grupo de proteínas de superficie de las células T, que dividen estas células maduras en las que suprimen y en las que potencian la producción de anticuerpos. Después de la reordenación de los genes de receptores, las células T están sujetas a mecanismos selectivos en el timo que llevan a la supervivencia de células capaces de responder (restricción) a antígenos extraños y la muerte de las células que reconocen (tolerancia) a antígenos propios. Este reconocimiento clonal no depende de antígenos específicos, sino que envuelve la adquisición de la restricción de reconocimiento de antígenos, en asociación con productos particulares del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Después de esto, los linfocitos T migran a través de la sangre periférica a otros tejidos y permanecen quiescentes hasta que contactan con sus antígenos afines. La iniciación de sus funciones inmunológicas comienza con la interacción del receptor antigénico con la combinación del antígeno y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, en la superficie de las células presentadoras de antígenos (123).

Pero en los procesos de maduración, además de las interacciones de linfocitos y células estromales, también factores solubles extraídos del timo poseen capacidad de promocionar o regular la diferenciación y maduración de la células pre-T en la médula y células inmaduras en el córtex. Ensayos "in vitro" han indicado que los timocitos inmaduros eran incapaces de expresar el marcador Thy-1, bajo la influencia inductiva de la fracción 5 de la timosina, timosina α_1 , factor tímico sérico (FTS) y timopoyetina (124, 125). Así pues, los factores humorales, alguno de los cuales están claramente modulados por el estrés, pueden modificar este medio interno y alterar los patrones normales de diferenciación (28). Se ha observado que el patrón alterado de la secreción de hormonas tímicas, tras la exposición neonatal a estrógenos, puede llegar a modificar la diferenciación de timocitos (64).

En resumen, la diferenciación intratímica de los linfocitos se regula a través de factores solubles sistémicos, hormonas tímicas epiteliales, IL-2 y mediante interacciones directas entre células T y células del estroma, modulados por receptores del MHC. Recientemente se ha caracterizado un complejo linfoepitelial denominado **célula nodriza tímica** (thymic nurse cell), que refleja esta asociación entre timocitos inmaduros y células epiteliales del córtex (126). En humanos, las células nodrizas contienen linfocitos vivos en su citoplasma, y su situación, próxima a los vasos sanguíneos, les confiere un papel clave en el tráfico de linfocitos intratímico.



CIRCULACION DE LAS CELULAS LINFOIDES

La mayor parte de las células maduras se encuentran localizadas en la médula tímica, pero algunas células no necesitan entrar en la médula para finalizar su maduración. (85). Además de este papel en la diferenciación, se considera que la médula desempeña funciones en el desarrollo de la memoria inmune (127). La maduración funcional se completa cuando las células T se unen al antígeno apropiado. Funcionalmente, la producción de IL-2 es una de las características notorias de las células maduras.

I.4.3.4.- Recirculación linfoide.

Los timocitos son liberados desde el órgano linfoide primario, experimentando una maduración adicional en tejidos linfoides secundarios, como bazo y nódulos linfoides, donde adquieren una competencia inmune completa para rechazar proliferaciones, neoplasias o transplantes (98). Este proceso de exportación celular no parece iniciarse hasta después del nacimiento, el timo continuará creciendo hasta la pubertad, a partir de la cual involuciona, aunque en casos especiales puede movilizar células T. Esta población de células emigrantes, ya definida en los años 60 por Weissman (128), posee marcadores fenotípicos y propiedades funcionales de las células maduras. Tras abandonar los órganos linfoides centrales, cada población linfocitaria se distribuye en áreas diferentes de órganos periféricos. Este proceso de segregación se conoce como **ecotaxis (homing)**.

Las células maduras linfoides circulan continuamente desde la sangre a órganos linfoides y por vía linfática de nuevo a la sangre; en esta recirculación el bazo parece desempeñar un papel fundamental (129). Aunque el tráfico de células maduras a la periferia está considerado como unidireccional, en ciertos casos los linfocitos periféricos pueden entrar nuevamente en el timo, como en el caso de células leucémicas, timo irradiado... Se encontró que células de líneas de linfocitos T, activas funcionalmente, pueden emigrar de nuevo al timo y persistir allí, en estado quiescente hasta su nueva activación por antígenos. El timo está, así, conectado con la periferia por un doble flujo de linfocitos efectores; estas células que retornan al timo parecen ser inducidas a hacerlo en respuesta a antígenos, estando relacionado con su estado linfoide, su capacidad de mediar efectos inmunológicos específicos e incluso con una posible función como memoria inmunológica (127, 130). El timo puede así regular el desarrollo del sistema de células T, no sólo por la población precursora producida que genera el sistema periférico sino regulando las poblaciones periféricas por medio de factores solubles circulantes (110).

I.4.3.5.- Antígenos de superficie y enzimas relacionadas con la diferenciación de las células T.

Un timo funcional es un requerimiento esencial para la maduración, proliferación, desarrollo y expresión de la competencia inmunológica de los linfocitos T. Aunque no está muy claro como el timo ejerce su

control sobre el desarrollo de las células T, un mecanismo hormonal puede ser uno de los componentes del mecanismo de control. Las células producidas por el timo difieren en su estado de diferenciación, siendo una de las características más destacadas de la ruta de diferenciación linfoide el cambio de receptores de superficie, pero también en su actividad funcional en respuesta a mezclas de linfocitos y generación de células T citotóxicas. Las hormonas tímicas ejercen un efecto en la expresión de estos marcadores de superficie y en las funciones de las células T (112).

El timo está subdividido en dos grandes compartimentos, cortical y medular. La diferente localización histológica ha sido utilizada para la clasificación de las distintas subpoblaciones linfoides. Los timocitos corticales (85-90% de timocitos totales) son frecuentemente pequeños y se consideran una subpoblación inmadura frente a los timocitos medulares (10-15% del total), frecuentemente de mayor tamaño y considerados como una subpoblación de timocitos maduros. Ambas subpoblaciones difieren en una serie de antígenos expresados en su superficie y en sus funciones inmunológicas, ya que los medulares contienen subpoblaciones funcionales como células T citotóxicas o auxiliares, y capaces de producir linfocinas tras estimulación (113, 131). La médula contiene la mayor parte de las células con fenotipo maduro, pero sin embargo, en el córtex aparecen células con fenotipos distintos, y algunas de las cuales no pueden considerarse inmaduras. Es probable que el flujo de diferenciación propuesto de córtex-médula-periferia no sea siempre así, pues hay evidencias de células que no necesitan entrar en la médula para su maduración (85),

parece pues que el proceso es más complejo.

La resistencia a esteroides ha sido considerada como un marcador de madurez. Los timocitos corticales eran cortisona-sensibles (CST) y los medulares eran cortisona-resistentes (CRT). Sin embargo, datos obtenidos por Reichert y colaboradores (132) indicaban la existencia de linfocitos cortisona-resistentes en el córtex y que, además, eran maduros. Esto refuta la hipótesis de que los timocitos maduros fenotípica y funcionalmente están restringidos totalmente a la médula. El timo exporta también linfocitos maduros corticales, cuyo fenotipo MEL-14^{h+} representa la proporción mayor de timocitos emigrantes, así pues córtex y médula pueden contribuir al grupo emigrante (132).

La unión a ciertas lectinas, especialmente a la aglutinina de cacahuete (PNA), que se fija a los residuos terminales de la D-galactosa de la membrana celular, ha sido usada como marcador de inmadurez para timocitos de rata y humanos. Los timocitos corticales o inmaduros pueden ser aglutinados por el PNA, mientras que los timocitos medulares o maduros no (113). Recientemente, han sido identificadas dos glicoproteínas de superficie (170-180 y 110 Kd.) en timocitos inmaduros que son receptores para el PNA (133, 134). La densidad de estos receptores parece influir en la capacidad del PNA de unirse a un determinado tipo de timocitos y no a otro y la expresión de estos mismos parece depender del estado de activación celular. Otras investigaciones realizadas sugieren que el contenido de receptores puede estar inversamente relacionado con el grado de maduración inmunológica, además, recientemente se ha observado

experimentalmente que el subtipo PNA⁻, en el hombre, es heterogéneo y comprende tanto timocitos maduros como inmaduros (134).

En cuanto a la expresión de distintos antígenos, los timocitos inmaduros presentan una alta cantidad de Thy-1 y TL y una baja cantidad de H-2, en su superficie celular. En los timocitos maduros y periféricos, TL está ausente, Thy-1 se reduce y se incrementa la expresión de H-2. Además, los timocitos inmaduros expresan simultáneamente Lyt-2 y L3T4, mientras que los maduros o periféricos expresan L3T4 ó Lyt-2, pero no ambos (28, 85, 131).

Además de los antígenos, el proceso de maduración de los linfocitos T va asociado a variaciones de los niveles de actividad de algunas enzimas. Estas actividades enzimáticas han sido usadas como marcadoras del grado de diferenciación y, además, como marcadoras de ciertas inmunopatologías, en las que presentan los niveles alterados (136). Así, por ejemplo, deficiencias en adenosina desaminasa (ADA) o purina nucleótido fosforilasa (PNP), que son dos enzimas secuenciales de la ruta degradativa de las purinas, resultan en inmunodeficiencias infantiles, lo que sugiere un papel de estas enzimas en la diferenciación de linfocitos. Entre las enzimas más importantes se encuentran: la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT); las enzimas del metabolismo de las glucidasas: N-acetil- β -glucosaminidasa (NABG) y β -glucuronidasa (BG); las enzimas del metabolismo purínico: la adenosina desaminasa (ADA), la purina nucleótido fosforilasa (PNP) y la 5'nucleotidasa (5'NT); y las serín esterases (SE).

TdT está asociada a los estados iniciales de maduración y su

actividad decrece con ésta. ADA decrece marcadamente en el curso de la diferenciación, mientras que PNP incrementa su actividad con la madurez. Los niveles de 5'NT alcanzan un mayor valor en los linfocitos periféricos. Las enzimas NABG y BG presentan una actividad que se incrementa con la madurez (136-138). Finalmente, las serín esterases presentan variados niveles de actividad en las distintas subpoblaciones linfoides, presentando un incremento de actividad después de la estimulación celular (139). Es conocido que el estrés modifica el recambio de algunas proteínas, así como los niveles de actividad de diversas enzimas en algunos tejidos. Gagnon y colaboradores (140) encontraron un incremento de la actividad de algunos mensajeros, que codifican para proteínas miofibrilares, tras la aplicación del estrés, este incremento de la síntesis proteica podía estar influenciado por cambios fisiológicos inducidos por los glucocorticoides o el estrés. Otros investigadores (141) observaron que otras proteínas, como la metalotioneína hepática, incrementaban su producción tras el estrés. Estos mismos autores (142) indicaron posteriormente el papel de las catecolaminas en la regulación de la metalotioneína en situaciones de estrés y rechazaron un posible papel crítico de los glucocorticoides y glucagón. Sin embargo no se conoce si existen variaciones en la actividad de enzimas marcadoras de la maduración y si este proceso tiene o no lugar en situaciones de estrés.

I.4.3.6.- Alteraciones de los patrones de migración linfoide.

Las células linfoides se desplazan continuamente a través del organismo, en gradientes de sustancias quimiotácticas (quimiotaxis), que orientan su trayectoria hacia el lugar de su producción (timo, focos antigénicos...). Esta migración se realiza de dos maneras:

- **Migración:** recorrido direccional hacia los órganos linfoides y los tejidos efectores extralinfoides. El timo está abierto a un tráfico bidireccional con los tejidos específicos, así linfocitos T activos pueden migrar hacia el timo y permanecer latentes hasta ser nuevamente activados. La migración de células precursoras es de gran importancia en la respuesta inmune y en la repoblación del timo y órganos periféricos tras irradiación.

- **Recirculación:** patrullaje continuo por los distintos tejidos, en su mayoría son células T de memoria, células B, células NK...

La disminución en el número de células linfoides, que acompaña a la involución tímica durante situaciones de estrés, ha sido frecuentemente achacada a la toxicidad inducida por los corticosteroides o a cambios en los patrones de migración. La posibilidad de que esta involución se deba a interacciones entre células y factores humorales, o que los factores humorales provoquen cambios en los patrones de migración está aún por dilucidar. Sin embargo, existen numerosos datos que indican cambios en los patrones de migración por una u otra causa (96-98, 143-147). Es conocido que

las células de médula ósea de ratones estresados por transporte no respondían frente a factores quimiotácticos, aunque presentaban una recuperación después de dos o tres días (104).

Los mismos linfocitos de rata son capaces de producir mediadores solubles que alteran los patrones de migración de otros linfocitos. McFadden y Vickers (147) encontraron que células de bazo estimuladas liberaban diversas linfokinas que alteraban la migración linfoide en rata, dos de ellas han sido identificadas, por estos mismos autores, encontrándose su actividad inhibidora y su capacidad de alterar también la migración de células mononucleares. La acción de estas linfokinas parecía requerir la presencia de actividad esterasa en la superficie de las células esplénicas.

Los esteroides adrenales podrían desempeñar un papel importante en la migración linfoide, ya que el contenido de células precursoras decrece en la médula ósea tras la adrenalectomía e incrementa en la periferia y bazo. La formación de colonias endógenas decrecía por estrés o administración de esteroides e incrementaba por adrenalectomía. Estos resultados pueden ser debidos al efecto de los órganos adrenales en la migración de las células precursoras y así, la razón de migración podría estar controlada, al menos en parte, por el sistema hipófiso-adrenal. La formación de colonias endógenas en ratón irradiado está suprimida por estrés, ACTH, o dexametasona, lo cual apoya la hipótesis anterior (96). También es conocido que la hidrocortisona, independientemente de la lisis celular, inhibe la migración de linfocitos T periféricos humanos y T esplénicos de ratón,

aunque también las células B murinas eran sensibles a la inhibición (97). El mecanismo de inhibición de la migración de linfocitos podría envolver algún proceso molecular o subcelular esencial para la migración (como receptores de superficie, actividad esterasa, niveles de nucleótidos cíclicos, ensamblaje de microtúbulos o actividad de microfilamentos) (97).

Otros datos experimentales (98) apoyan la existencia de una liberación de células del timo a la circulación y aunque en circulación aparecen pocos linfocitos, se explicaría por la adquisición por éstos de una vida media corta, por exposición a esteroides. En algunas situaciones especiales, como el embarazo y el postparto, se produce una involución tímica y un significativo incremento del número de células T periféricas que podría estar relacionado con la migración de células desde el timo a los órganos periféricos, especialmente al bazo (144). En otras situaciones, como infecciones bacterianas, timomas, tratamientos químicos..., las células migrantes eran funcionalmente inmaduras y su migración estaba relacionada con una disminución de los niveles de prostaglandinas. Aunque durante el embarazo no se observa una disminución de prostaglandinas, otros mecanismos como los elevados niveles de estrógenos y corticosteroides, podrían controlar la movilización de las células linfoides. Además, las células migrantes durante el postparto presentaban capacidad de suprimir la Ig del suero y tenían características de células T supresoras o células auxiliares (145). Las células T emigrantes durante el postparto podrían desempeñar su función en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune

materno durante el período comprendido entre el embarazo y el postparto.

Finalmente, experimentos realizados recientemente por Haar y colaboradores (146) indican que las células de médula ósea de ratones inmunodeficientes "viable motheaten", que se caracterizan por una involución tímica prematura, presentan una muy disminuida capacidad de migrar en respuesta a sobrenadantes tímicos normales. Así pues, la involución tímica prematura de estos ratones está relacionada con la incapacidad de sus células de responder a señales tímicas, ya que el timo mutante era capaz de atraer y ser repoblado por células de médula de donantes normales.

I.5.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

Los mecanismos moleculares responsables del proceso de capacitación inmunológica de los linfocitos T y la función de la glándula tímica y sus hormonas en la maduración linfoide han sido objeto de estudio desde hace varios años por nuestro laboratorio. Las situaciones estresantes ejercen profundos efectos en la respuesta inmune y aunque la modulación de la inmunidad por el estrés parece un fenómeno complejo, que envuelve posiblemente más de un mecanismo, en este trabajo nos proponemos estudiar los efectos del estrés sobre los mecanismos de maduración e inmunocapacitación linfoide, así como sobre la expresión de las distintas subpoblaciones de los linfocitos T, intentando conocer alguno de los procesos de inmunomodulación bajo condiciones de estrés.

Para todo esto nos proponemos:

1.- Investigar los efectos de tres diferentes agentes estresantes, sobre varios parámetros en el ratón C57BL/6 y estudiar la respuesta al estrés de subpoblaciones T del timo, determinando el tipo de subpoblaciones afectadas.

2.- Estudiar los mecanismos por los que el timo es inhibido por el estrés, buscando las condiciones óptimas que permitan discernir si se trata de mortalidad celular o de efectos en los patrones de migración.

. Determinar si los niveles de corticosteroides alcanzados durante

el estrés, pueden producir mortalidad celular, a través de la degradación del DNA, ya que es bien conocido que altas dosis de corticosteroides exógenos producen esta degradación en timocitos.

. Comprobar si la presencia de cápsulas suprarrenales es fundamental en la involución tímica inducida por el estrés, estudiando también la influencia de la adrenalectomía en otros parámetros utilizados como marcadores de estrés.

. Estudiar la influencia del estrés en la migración de las células precursoras al timo, analizando el efecto de los factores quimiotácticos tímicos y su capacidad de inducir la migración en ensayos "in vitro", intentando profundizar en los mecanismos por los cuales el timo es inhibido bajo situaciones de estrés.

3.- Determinar el efecto del estrés sobre la actividad de enzimas utilizadas como marcadoras bioquímicas de la maduración de los linfocitos T y sobre la evolución de estos marcadores enzimáticos en las subpoblaciones tímicas, que se encuentran en distintos estados de maduración.

Para la consecución de estos objetivos se procederá de la forma siguiente:

1.- Se someterán ratones C57BL/6 a tres tipos de agentes estresantes (inmovilización, frío y natación forzada) durante un período de tiempo

para conseguir un estrés crónico, manteniendo otros del mismo sexo y edad, como controles, bajo condiciones de mínimo estrés.

2.- Tras su muerte por decapitación se recogerá la sangre para la determinación de la concentración de corticosterona en plasma por técnicas fluorimétricas, también se extraerán el timo, bazo y cápsulas suprarrenales, que serán pesados. Los timos serán posteriormente disgregados mecánicamente para obtener una suspensión linfoide.

3.- Determinación del número de timocitos que componen las subpoblaciones madura e inmadura del timo mediante aglutinación selectiva con lectina de cacahuete y conteo en hemocitómetro.

4.- Extracción de DNA de alto peso molecular y análisis posterior mediante electroforesis en geles de agarosa de timocitos de ratones sometidos a distintos períodos de estrés, tanto agudo como crónico, y controles con el fin de determinar si los niveles de corticosteroides inducidos por el estrés son suficientes para producir degradación del DNA.

5.- Se realizarán adrenalectomías en ratones C57BL/6 que posteriormente serán sometidos a estrés de inmovilización o mantenidos en condiciones no estresantes.

6.- Tras el sacrificio por decapitación, se procederá de la forma ya especificada en los puntos 2 y 3, para observar los efectos del estrés en ausencia de glándulas adrenales.

7.- Para determinar los efectos del estrés sobre la migración linfoide de la médula ósea al timo, se realizarán ensayos de migración "in vitro" en cámaras Nuclepore donde se enfrentarán células linfopoyéticas con factores quimiotácticos tímicos procedentes de sobrenadantes de cultivos tímicos de neonatos y ratones adultos jóvenes, estresados y controles, estudiando la influencia que ejerce el estrés sobre los mecanismos de migración, bien a través de su acción sobre los factores quimiotácticos o sobre la capacidad de reconocimiento de éstos por las células precursoras.

8.- Se obtendrán extractos celulares tímicos para su posterior uso en la determinación de la actividad de enzimas marcadoras de la maduración de los linfocitos T. Se observarán los efectos del estrés sobre las actividades 5'NT, NABG, BG y SE, tanto en linfocitos T maduros como inmaduros.

II MATERIALES

II.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

En todos los experimentos se utilizaron ratones C57BL/6, procedentes del animalario de la Facultad de Biología.

En los experimentos de estrés se utilizaron ratones machos de 35 ± 2 días de edad y 19 ± 2 gramos de peso. También fueron utilizados ratones neonatos para la obtención de sobrenadantes tímicos.

II.2.- REACTIVOS ESPECIALES.

- Lectin from Arachis hypogaea (Peanut) (SIGMA CHEMICAL CO. USA).
- Corticosterone (SIGMA).
- Proteinase K (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH. GERMANY).
- RNase A (BOEHRINGER MANNHEIM).
- Agarose Seakem HGT (MARINE COLLOIDS DIV. FMC. CORPORATION).
- Lambda DNA / Hind III Fragments (BETHESDA RESEARCH LABORATORIES).
- Kit for β -Glucuronidase (SIGMA).
- Kit for 5'-Nucleotidase (SIGMA).
- Test for N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (Colorimetric method) (BOEHRINGER MANNHEIM).
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (GIBCO. BRL).
- Trypan blue stain (GIBCO. BRL).
- Penicillin (10.000 IU/ml) - Streptomycin (10.000 UG/ml) sol. (GIBCO. BRL).
- Foetal Calf Serum (GIBCO. BRL).

Los demás reactivos fueron todos de grado analítico y suministrados por SIGMA, MERCK, PROBUS y ANALEMA.

II.3.- APARATOS.

Las marcas y modelos de aparatos utilizados en este trabajo de experimentación son los siguientes:

- Balanzas analíticas electrónicas monoplato SARTORIUS modelos 2442 y básico y SALTER electroscale modelo KE-1200A.
- Phmetros CRISON modelo digit-501 y microdigit-2001.
- Homogenizador de cuchillas SORVALL modelo Onmi-mixer 17220.
- Sonicador SONIFIER modelo B-12, Branson Sonic Power Company.
- Centrífugas KONTRON modelo Henmle Z-364 y SELECTA modelo Meditronic.
- Centrífuga refrigerada BECKMAN modelo J2-21 con rotores JA-20 y JA-14.
- Espectrofluorímetro SHIMADZO modelo RF-501.
- Espectrofotómetros UV/VIS PYE-UNICAM SP6-550 y BECKMAN DU-20.
- Alimentador de electroforesis ATOM modelo 502.
- Transiluminador ultravioleta ULTRAVIOLET PRODUCTS modelo C-62.
- Incubador de CO₂ y estufa de cultivo SELECTA modelo 207.
- Campanas de flujo laminar TELSTAR modelo AV-100 y PBI MINIFLO.
- Microscopio óptico NIKON modelo SE e invertido WILOVERT.
- Cámara KONIKA modelo TC-X, con objetivo macro MEXANON AR-55mm. y filtro B-10 55E.
- Contenedor DEWAR para conservación en N₂ líquido.
- Baños termostatados ATOM modelo T-tronic y SELECTA PRECISTERM modelo S140/141.
- Vórtex ATOM modelo Atomixer.

- Agitadores SELECTA.
- Cámaras quimiotácticas de migración (BLIND WELL CHAMBERS)
NUCLEPORE modelo 440900 (Pleasanton).
- Arcón congelador de -80°C KOXKA modelo UE 800.
- Autoclave SELECTA modelo Autester S-437-G.

III METODOS

III.1.- ESTERILIZACION DEL MATERIAL.

El material de trabajo utilizado ha sido esterilizado de la forma siguiente:

- El material de vidrio fue autoclavado a 121°C y 1.2 atmósferas de presión, durante 20 minutos.

- El material de plástico fue irradiado con luz ultravioleta durante 12 horas o sometido a tres periodos de 7 minutos en un microondas.

- El material líquido fue filtrado por membranas Millipore con un tamaño de poro de 0.45 y 0.22 μm .

En la preparación de las distintas disoluciones se usó agua desionizada, bidestilada y esterilizada en autoclave.

Las suspensiones y extractos celulares se manipularon en hielo o en cámara fría a 4°C de temperatura. La cámara de flujo laminar fue utilizada en las manipulaciones que requerían esterilidad.

III.2.- MANTENIMIENTO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los ratones C57BL/6 fueron mantenidos en jaulas Panlab modelo JC-1012 de 50 x 25 x 15 cm., bajo condiciones controladas de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas (luz de 8.00 a 20.00), teniendo libre acceso a comida (dieta de mantenimiento IPM-R20 de LETICA) y agua.

A las cinco semanas de nacimiento, los machos fueron pesados y asignados al azar de 4-6 animales por jaula a los siguientes grupos experimentales:

- (CO) Los animales control eran mantenidos en el animalario bajo mínimas condiciones de estrés (148) durante el período experimental.
- (CA) Controles adrenalectomizados, los ratones eran operados, las glándulas adrenales extraídas y mantenidos bajo mínimas condiciones de estrés hasta la finalización del período experimental.
- (FA) Falsamente adrenalectomizados, los ratones eran operados bajo anestesia con éter pero las cápsulas suprarrenales no eran extraídas.
- (IS) Animales estresados por inmovilización.
- (NS) Animales estresados por aplicación de natación forzada.
- (FS) Animales estresados por frío (-20°C).
- (IA) Animales adrenalectomizados y estresados por inmovilización, los animales eran adrenalectomizados

bilateralmente y después de tres días de reposo se sometieron a estrés de inmovilización.

Los animales adrenalectomizados y estresados se mantuvieron separados de los animales control, procediéndose con ellos según lo especificado en los dos apartados siguientes.

Todos los animales fueron mantenidos en las condiciones recomendadas para este tipo de estudios (148). Además, para los grupos adrenalectomizados el agua fue suplementada con una concentración fisiológica de NaCl (0.15 M).

III.3.- ADRENALECTOMIA.

La adrenalectomía y falsa adrenalectomía fueron realizadas entre las 10.00 y 12.00 a.m., siguiendo el método propuesto por H.B. Waynforth (149).

El animal, previamente anestesiado por inhalación con éter, fue colocado con la parte dorsal hacia arriba, realizándose una incisión de unos 2 cm. desde la décima vértebra torácica hasta la segunda lumbar. La piel fue retirada hacia ambos lados y se efectuó una incisión lateral en la capa muscular. Se localizó la parte superior del riñón, donde se encuentra la cápsula suprarrenal, que fue retirada con unas pinzas. En la **fotografía 1** se señala la situación de la cápsula suprarrenal. La incisión se cerró con una aguja de sutura curva. La misma operación fue efectuada en el otro lado.

Una vez terminada la operación, el animal fue situado bajo una luz que lo mantiene caliente, contrarrestando así el descenso de temperatura producido por la anestesia con éter.

Con los animales falsamente adrenalectomizados se procedió de igual forma, pero sin efectuarse la extracción de las cápsulas.

La ausencia de tejido adrenal fue confirmada por necropsia y medición de los niveles de corticosterona en plasma.



Fotografía nº 1: Región dorsal de un ratón C57BL/6. La cápsula suprarrenal aparece como un masa pálida de tejido en la parte superior del riñón y está indicada mediante una flecha.

III.4.- PROTOCOLOS DE ESTRES.

La aplicación del agente estresante se realizó entre las 10.00 y las 12.00 a.m.

Se eligieron tres tipos de agentes estresantes, ampliamente citados en la bibliografía y de fácil aplicación y reproducción en nuestro laboratorio: inmovilización, natación forzada y frío.

Estrés de inmovilización (IS):

Los animales fueron inmovilizados, en posición supina mediante la sujeción de las cuatro patas, a un tablero durante 90 minutos diarios y catorce días ininterrumpidos.

Para los experimentos de análisis de DNA, se utilizaron dos tipos de estrés de inmovilización: un estrés crónico, anteriormente citado y con una duración de 90 minutos diarios, durante catorce días, y un estrés agudo, con una duración de 6 ó 24 horas, en un solo día.

Estrés de natación forzada (NS):

El estrés crónico de natación forzada consistió en introducir a los animales en un recipiente con agua (50 cm. de diámetro y 60 cm. de altura, temperatura 18°C), durante cinco minutos diarios y catorce días ininterrumpidos.

Estrés de frío (FS):

Los ratones eran introducidos en una cámara a -20°C , durante cinco minutos diarios y catorce días ininterrumpidos.

III.5.- OBTENCION DE SANGRE Y ORGANOS.

Todas las extracciones se realizaron entre las 10.00 y las 12.00 de la mañana.

Después del período de estrés o control, los animales fueron sacrificados por decapitación y la sangre fue recogida en un recipiente heparinizado y centrifugada a 400xg durante 10 minutos a 4°C. El plasma fue cuidadosamente retirado y almacenado a -20°C hasta su uso para la determinación de corticosterona.

El timo, bazo y cápsulas suprarrenales fueron extraídos, liberados del tejido conectivo, si lo tuvieran, y pesados.

III.6.- OBTENCION DE CELULAS LINFOIDES.

Estas células fueron obtenidas de ratones de siete semanas de edad, mantenidos bajo condiciones de mínimo estrés o sujetos a la acción de un agente estresante.

III.6.1.- Obtención de timocitos.

Tras ser pesados, los timos se depositaron en una placa Petri que contenía tampón fosfato salino (PBS) (PO_4HNa 0.01M y NaCl 0.15M, pH 7.4). La suspensión celular se obtuvo por suave disgregación mecánica sobre una malla metálica de acero inoxidable, que permite difundir los timocitos, y posterior filtrado a través de una gasa estéril para eliminar los agregados. Las células se recogieron por centrifugación a 400xg, durante 10 minutos.

Los eritrocitos se eliminaron por incubación con tampón de lisis (Tris-HCl 0.17M y NH_4Cl 0.16M, pH 7.2) a 0°C durante 10 minutos. Los timocitos se lavaron dos veces con PBS que contenía 1% (w/v) de seroalbúmina bovina (PBS-BSA 1%) para eliminar el tampón de lisis, y se procedió a su recuento y determinación de viabilidad.

III.6.2.- Separación de subpoblaciones de timocitos.

La separación de subpoblaciones tímicas que difieren en su estadio de maduración fue realizada mediante la aglutinación selectiva con lectina de cacahuete (PNA) y según el método descrito por Reisner y Sharon (150).

La lectina de cacahuete (PNA) es una proteína capaz de unirse a restos de glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares. Así, basándose en las diferencias fenotípicas de la superficie puede aglutinar a los timocitos inmaduros, por lo que ha sido muy utilizada en la separación de subpoblaciones corticales (no maduras) y medulares (maduras) de timocitos murinos.

Del orden de 200 millones de timocitos en 250 μ l. de PBS se incubaron con 250 μ l. de una disolución de PNA (1 mg/ml. PBS), durante 20 minutos a temperatura ambiente, en tubos pequeños de plástico.

Finalizada la incubación, la suspensión celular fue depositada cuidadosamente sobre un lecho de 8 ml. que contenía PBS y 20% de suero fetal de ternera (PBS-FCS 20%), en tubos cónicos de vidrio de 15 ml., y las células se dejaron sedimentar 30 minutos a temperatura ambiente. La fracción sedimentada en la parte inferior de tubo (PNA⁺) y la fracción superior que contenía los timocitos PNA⁻ fueron recogidas por aspiración de 1 ml. de lecho cada una con una pipeta Pasteur, y transferidas a tubos que contenían 5 ml. de una disolución de D(+)-Galactosa 0.2 M en PBS e incubadas 15 minutos a temperatura

ambiente. La galactosa disocia las células aglutinadas al competir con el PNA por la unión a los timocitos.

Después de la adición de 5 ml. de PBS, las células se recogieron por centrifugación a 400xg durante 10 minutos, se resuspendieron de nuevo en PBS-D-Galactosa y se lavaron dos veces con PBS, antes de efectuar su recuento y la determinación de viabilidad.

Las fracciones PNA⁺ y PNA⁻ se obtuvieron con un rendimiento aproximado de 50% y 6% respectivamente.

Hasta el momento de su uso para la determinación de actividades enzimáticas, estas subpoblaciones tónicas fueron almacenadas a -80°C en un tampón de lisis (Tampón fosfato 50 mM, EDTA 1 mM, β-Mercaptoetanol 1 mM, pH 7.7) y sin resuspender, para la determinación de las actividades BG, NABG y 5'-NT. En el caso de que la actividad determinada fuese SE los timocitos fueron almacenados a -80°C en un tampón de PBS con 0.5% de Nonidet P-40, también sin resuspender.

III.6.3- Obtención de células precursoras linfoides de médula ósea.

Los fémures de los ratones C57BL/6 estresados o controles fueron extraídos y depositados en PBS, tras ser limpiados con un bisturí de todos los restos de tejido. La suspensión celular de médula ósea fue obtenida mediante varios lavados a presión, introduciendo en la cavidad del hueso PBS-BSA 0.5% (w/v) mediante una jeringa. A continuación las células fueron resuspendidas en un tampón de Tris-NH₄ 0.05M, pH 7.7 e incubadas a 37°C durante 5 minutos para lisar eritrocitos, y se lavaron dos veces con PBS-BSA 0.5%. Después del último lavado las células fueron contadas con azul tripán y diluidas hasta una concentración de 5×10^6 células viables/ml en medio Iscove modificado de Dulbecco, sin suero (GIBCO), para su uso en experimentos de migración.

III.7.- RECUENTO CELULAR Y DETERMINACION DE LA VIABILIDAD.

Los recuentos celulares se realizaron por duplicado, mediante una cámara de Neubauer, y utilizando diluciones de 20 y 40 veces, considerando el valor medio de éstas.

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el método de exclusión del azul tripán, colorante que tiñe selectivamente a las células muertas. Sólo fueron utilizadas las suspensiones celulares que superaban el 95% de viabilidad.

III.8.- DETERMINACION DE CORTICOSTERONA.

La determinación de la concentración de corticosterona en plasma fue realizada según el método descrito por Zenker y Berstein (151). Este método fluorimétrico es sensible y específico para pequeñas cantidades de plasma.

Se analizaron alicuotas de 200 μ l. de plasma, que se llevaron a 2 ml. con agua bidestilada y estéril. Los patrones de corticosterona utilizados tenían concentraciones conocidas y fueron llevados hasta un volumen final de 2 ml. Los blancos utilizados contenían 2 ml. de agua estéril.

Para eliminar el plasma libre de esteroides, se añadieron 12 ml. de cloroformo a cada muestra, se agitó durante tres minutos y se centrifugó a 800xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, eliminándose la parte acuosa superior mediante aspiración con una pipeta Pasteur, conectada a vacío.

La fase orgánica restante se lavó añadiendo 2 ml. de NaOH 0.1 M a cada tubo, se agitó, centrifugó y se eliminó nuevamente la fase acuosa superior.

La fase orgánica lavada se sometió a una extracción de corticosterona, añadiendo a 10 ml. de esta fase 2.5 ml. del reactivo de extracción (H_2O :etanol:ácido sulfúrico en proporción 1:1:4.8). Se agitó, centrifugó y eliminó la fase orgánica superior.

Finalmente, 2 ml. de la fase alcohol-ácida resultante se dejaron reposar durante 2h. en oscuridad y a temperatura ambiente.

La fluorescencia se midió a una longitud de onda de incidencia de 450 nm. y de emisión de 520 nm. Con los valores de los patrones estándar se construyó una recta patrón, y los valores de las concentraciones de corticosterona de las muestras problemas se extrapolaron directamente de la gráfica.

La concentración final de corticosterona en plasma fue expresada en $\mu\text{g}/100\text{ml}$. y calculada por la fórmula:

$$C (\mu\text{g}/100\text{ml}) = A \times \frac{100}{V}$$

donde A es el valor de la concentración de corticosterona en la gráfica y V el volumen en ml. de la muestra.

HPLC

metodo | Analisis: p Cortisol en
| de sangre
| extractado. 200; 50:50
| plasma: 2 ml (muestra)
| en sistema, 0.2 ml

Podriolona, corticosterona, Progesterona

2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 200 ng/ml 3 μg (1 μg de muestra)

8 unidades

III.9.- OBTENCION DE FACTOR QUIMIOTACTICO TIMICO.

Los factores quimiotácticos tímicos, utilizados en los experimentos de migración, procedían de sobrenadantes de cultivos de timo de ratones neonatos y adultos jóvenes de 7 semanas de edad, tanto controles como estresados.

Los factores se obtuvieron de la forma siguiente:

Los timos de ratones neonatos fueron extraídos y cada lóbulo fragmentado en dos o tres trozos. Los fragmentos fueron lavados en PBS con 0.5% de BSA y cultivados en medio Iscove sin suero, que contenía penicilina y estreptomina (100 U/ml.), en placas Petri (35 x 10 mm., Falcon 1008), en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂ y a una concentración de 7 timos por 5 ml. de medio.

Después de 48 horas a 37°C, el medio de cultivo fue recogido, las células sedimentadas, y el sobrenadante filtrado para su esterilización a través de un filtro de tamaño de poro 0.22 µm. (Millipore). El sobrenadante fue almacenado en alícuotas de 1 ml. y a -70°C hasta su uso.

Para la obtención de factores quimiotácticos tímicos de ratones adultos se procedió de igual forma, pero en estos últimos casos el cultivo del timo, tanto estresado como control, se efectuó a una concentración de 1.25 ml. de medio por timo. Finalmente, para la obtención de factor quimiotáctico tímico de ratones adultos estresados

también se realizaron cultivos de timo donde el volumen de medio utilizado dependía del peso del timo estresado (teniendo como referencia la cantidad de 1.25 ml. de medio para un timo control), la concentración del cultivo se calcula, por lo tanto, dependiendo del peso y no del número de timos.

III.10.- ENSAYOS DE MIGRACION "IN VITRO".

Estos ensayos "in vitro" fueron realizados para medir la migración de células de la médula ósea de ratones estresados y controles (obtenidas según el protocolo descrito en el apartado III.6.3) frente a factores quimiotácticos, obtenidos por cultivo de timo de ratones neonatos y adultos, estresados y controles, según lo especificado en el apartado anterior.

En los experimentos se utilizaron cámaras quimiotácticas (Nuclepore, Pleasanton) de un volumen de 2 x 200 μ l., separadas por un filtro PC (Nuclepore, Pleasanton, mod. 110413 13mm.) de tamaño de poro 5 μ m. (Esquema 6). El factor quimiotáctico tímico fue situado en la cámara inferior y 200 μ l. de células de médula ósea (a una concentración de 5×10^6 células/ml.) fueron situadas en la cámara superior. Se realizaron diferentes experimentos utilizando tanto factores obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos de timo de ratones neonatos como de adultos estresados o controles.

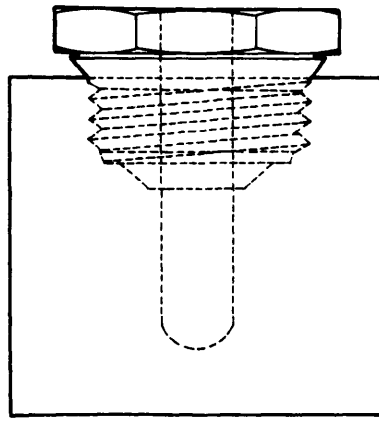
Los experimentos control de migración se llevaron a cabo situando medio Iscove (Gibco) en la cámara inferior, calculándose la migración no específica.

Las cámaras se incubaron 90 minutos a 37°C, en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Al final del período de incubación se recogieron las células de la cámara inferior y fueron contadas con un hemocitómetro.

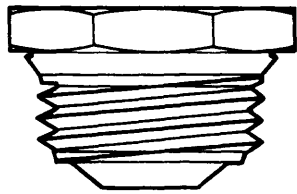
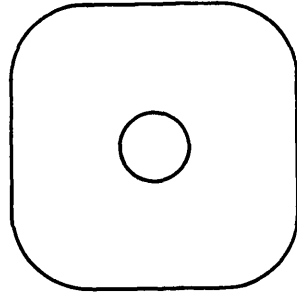
El porcentaje de migración de cada muestra se calculó dividiendo el número de células migradas recogidas, al que le fue restado el número de células que migraban de forma no específica, entre el número total de células de médula ósea dispuestas inicialmente en la cámara superior. Según la fórmula:

$$\% \text{ MIGRACION} = \frac{X - M}{T} \times 100$$

donde X es el número de células que migran frente al factor quimiotáctico, M es el número de células que migran frente al medio y T es el número total de células dispuestas inicialmente en la cámara superior.



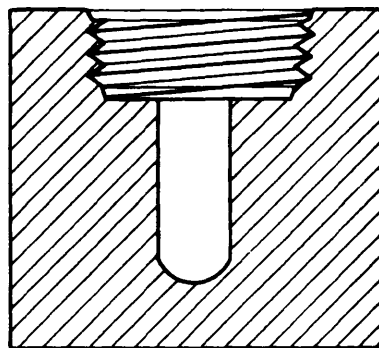
CAMARA QUIMIOTACTICA
NUCLEPORE



CAMARA SUPERIOR



FILTRO DE 5 μ m.



CAMARA INFERIOR

CAMARA QUIMIOTACTICA DE MIGRACION

ESQUEMA N° 6

ESCALA 2:1

III.11.- EXTRACCION DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR.

La extracción de DNA de alto peso molecular de timocitos fue realizada por el método fenol-cloroformo-enzimático (82, 152).

con ligeras modificaciones

Los timocitos (1×10^6) fueron resuspendidos en un tampón de lisis que contenía Tris 0.2 M, pH 8.5, EDTA 0.1 M, SDS 1% y proteinasa K (50 $\mu\text{g/ml.}$) e incubadas toda la noche a 37°C.

0.5% Sarkosyl

La muestra resultante fue extraída tres veces mediante agitación suave con un mismo volumen de fenol-cloroformo, en proporción 1:1 y 2% de alcohol isoamílico, y posterior centrifugación a 800xg, 5 minutos. Los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa, mientras que la fase orgánica que contenía proteínas y demás componentes celulares fue desechada. Esta fase acuosa fue reextraída varias veces con éter saturado con agua, procediéndose del mismo modo.

La muestra fue dializada en tubos de diálisis de límite de exclusión de 10.000 daltones, durante toda la noche en Tris 10 mM, pH 7.5 y EDTA 1 mM, a 37°C.

*(50 mM Tris pH 8.0
20 mM EDTA y 10 mM NaCl)*

(3 hrs)

Al día siguiente se incubó con RNasa (100 $\mu\text{g/ml.}$) durante 5 horas a 37°C y, posteriormente, con proteinasa K (50 $\mu\text{g/ml.}$) durante toda la noche a esta misma temperatura.

liberación de DNA

- esto es para

La muestra resultante volvió a ser extraída con fenol-cloroformo y éter saturado con agua según lo explicado anteriormente, dejándose

dializar toda la noche frente a la misma disolución de Tris y EDTA.

La fase acuosa resultante contenía el DNA de alto peso molecular y su concentración fue determinada por absorbancia a 260 nm. (1 U A_{260} = 50 μ g DNA/ml.).

III.12.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Las muestras de DNA de timocitos fueron analizadas en minigeles del 1.8% de agarosa en un tampón que contenía Tris-acetato 40 mM, pH 7.5, acetato sódico 20 mM y EDTA 1mM.

Para la preparación de los minigeles de agarosa, la disolución anterior se fundió en el autoclave durante 10 minutos a 121°C y 1.2 atmósferas de presión, y 10 ml. fueron vertidos sobre placas de vidrio de 5 x 7.5 cm. Los pocillos, donde se efectuaría posteriormente la carga de las muestras fueron realizados con un "peine" con dientes de 0.5 cm.

Como marcador de pesos moleculares se utilizó un digerido de DNA del fago lambda con el enzima de restricción Hind III.

Una solución que contenía un 0.25% de azul de bromofenol, EDTA 20 mM y sacarosa al 40% fue adicionada a las muestras antes de ser cargadas. Se realizaron distintos experimentos en los que la cantidad de DNA osciló entre 0.3 µg. en unos casos y 1 µg. en otros, tanto para el DNA del fago, ratones control, ratones sometidos a inmovilización crónica y ratones sometidos a inmovilización aguda de 6 y 24 horas. El volumen final de carga fue de 15 ó 25 µl., en los cuales una cuarta parte correspondía a la solución de bromofenol, EDTA y sacarosa, en los casos que era necesario el volumen se completaba con tampón de electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas de 170 x 90 mm. y con capacidad para 150 ml. de tampón de electroforesis, a 50 voltios y durante dos horas, previa adición de 1 µg/ml. de bromuro de etidio al tampón de electroforesis.

El DNA se visualizó por transiluminación con luz ultravioleta y se fotografió utilizando una película KODAK Plus-X.

III.13.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Los ensayos de actividad enzimática para las enzimas 5'-nucleotidasa, β -glucuronidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y serín esterasa se realizaron utilizando extractos celulares procedentes de subpoblaciones tímicas, separadas por aglutinación selectiva con PNA y obtenidas de ratones estresados por inmovilización y controles.

III.13.1.- Extractos celulares.

Para la determinación de las actividades enzimáticas de BG, NABG y 5'NT se utilizaron dos subpoblaciones tímicas, obtenidas según lo explicado en el apartado III.6.2.

Las células se resuspendieron en el tampón de lisis a una concentración de 15×10^6 células/0.6 ml. y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación, seguido de sonicación a 80 w. durante 5 segundos, en un sonicador Sonifier. Los extractos fueron agitados durante 10 minutos a 4°C, después de la adición de 0.5% de tritón X-100. Posteriormente se centrifugaron a 5000xg durante 20 minutos y a 4°C, en una centrífuga Beckman. El sobrenadante de esta centrifugación fue utilizado como fuente de enzimas para la determinación de actividades (137, 138).

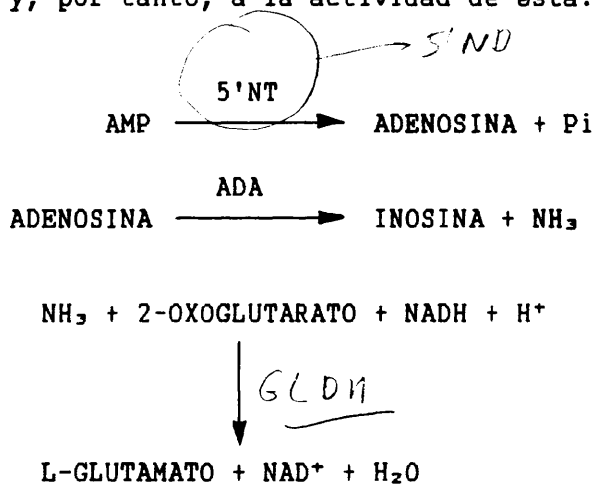
Para la determinación de la actividad serín esterasa, se utilizaron timocitos almacenados a -80°C como se indica en el apartado

III.6.2. Las células se resuspendieron en el tampón a una concentración de 2×10^7 células/ml. y se descongelaron a temperatura ambiente, seguido de una incubación en hielo durante 20-30 minutos con agitación en vórtex, produciéndose un lisado celular por disolución de la membrana, con la consiguiente liberación de la enzima.

III.13.2.- Determinación de la actividad 5'-nucleotidasa (5'-NT).

La actividad 5'NT (E.C. 3.1.3.5) se determinó con un juego de reactivos de la casa Sigma (ref. 260-UV) y basándose en el método de Arkesteijn (153).

Este método está basado en el acople de dos reacciones enzimáticas que permiten la obtención de NAD^+ , que es valorado siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm., siendo este descenso proporcional a la cantidad de adenosina formada en la reacción catalizada por la enzima 5'NT y, por tanto, a la actividad de ésta.



Una alícuota de 70 μl . de extracto celular se mezcló con 1 ml. de reactivo de Sigma para la determinación de 5'NT (AMP 3.2 mM, NADH 0.2 mM, 2-Oxoglutarato 3.7 mM, L-Glutamato deshidrogenasa 11.000 U/l, Adenosina desaminasa 400 U/l, β -Glicerofosfato y estabilizantes), leyéndose la absorbancia a 340 nm. inicialmente y al cabo de 5 minutos.

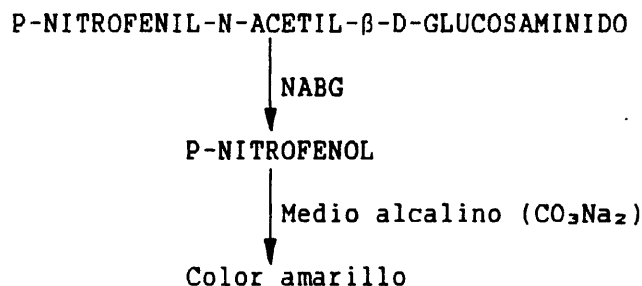
La actividad se expresó como $\text{mU}/10^8$ células, calculándose las U/l según la fórmula: $491.5 \times (A_{340} \text{ inicial} - A_{340} \text{ final})$.

La unidad de actividad de 5'NT fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato en un minuto y a 30°C .

III.13.3.- Determinación de la actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NABG).

¿cómo? Tabata

La actividad NABG (E.C. 3.2.1.30) se determinó usando un método colorimétrico (154), basado en la utilización de un sustrato artificial (P-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminido), que por acción de la enzima NABG libera P-nitrofenol, que es un producto coloreado valorable espectrofotométricamente.



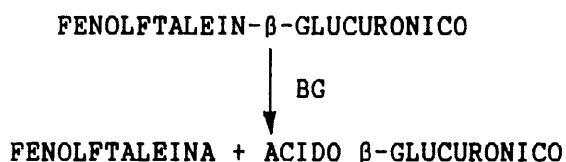
Una alícuota de 35 μl . de extracto celular se mezcló con 0.5 ml. de solución sustrato (el juego de reactivos utilizados pertenecía a la casa Boehringer, ref. 875406). La incubación se realizó a 37°C durante 3 horas. A continuación se adicionó 1 ml. del reactivo de parada (CO_3Na_2 0.3 M) y al cabo de 15 minutos el P-nitrofenol liberado se determinó leyendo la absorbancia a 580 nm. La actividad se expresó como mU/10⁸ células, calculándose las U/l según la fórmula: $6 \times A_{580}$.

La unidad de actividad de NABG se define como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μmol de sustrato en un minuto y a 37°C.

III.13.4.- Determinación de la actividad β -glucuronidasa (BG).

La actividad BG (E.C. 3.2.1.31) se determinó con un juego de reactivos de la casa Sigma (ref.325) según el método de Fishman (155).

Se emplea un sustrato artificial, fenolftaleín glucurónico, que por acción de la β -glucuronidasa libera fenolftaleína que es valorada espectrofotométricamente.



Una alícuota de 40 μ l. de extracto celular se mezcló con 120 μ l. de tampón acetato 0.2 M, pH 4.5 y 40 μ l. de ácido fenolftaleín glucurónico 30 mM, pH 4.5. La incubación se realizó a 37°C durante 1 hora. Inmediatamente después de la incubación se añadió a cada tubo 1 ml. de tampón AMP (2-amino, 2-metil, 1-propanol) 0.1 M, pH 11. A continuación se midió la absorbancia a 580 nm. La actividad de BG fue calculada según la fórmula: U/ml = Concentración de fenolftaleína (μ g/ml.) x 30.

La actividad se expresó como U/10⁸ células y una unidad de BG se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ g de fenolftaleína a partir de ácido fenolftaleín glucurónico durante 1 hora y a 56°C.

III.13.5.- Determinación de la actividad serín esterasa.

La actividad serín esterasa se determinó usando una reacción sensible que envuelve al N-benzil-oxicarbonil-L-lisina-tiobenzil éster (BLT), cuya hidrólisis por la enzima libera benzilmercaptano, que reacciona con el reactivo de Ellman produciendo el cromóforo tiofenóxido (139).

Una alícuota de 100 μ l. de diluciones apropiadas de los extractos celulares en PBS-NP40 se adicionó a 900 μ l. de una mezcla de reacción de Tris HCl 0.2 M, pH 8.1, BLT 0.2 mM, ditriobis (DT o ácido nitrobenzoico) 0.22 mM. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia a 412 nm. fue leída, usando 100 μ l. de PBS-NP40 más 900 μ l. de la mezcla de reacción como blanco.

Una unidad de actividad esterasa se define como una unidad de absorbancia a 412 nm. para 2.0×10^7 células.

III.14.- ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados son expresados como valores medios \pm el error estándar de la media (S.E.M.). Los datos derivados de la aplicación de distintos agentes estresantes y adrenalectomía fueron obtenidos de un mínimo de ocho experiencias con animales diferentes, tanto estresados como controles. En los experimentos de migración los datos se obtuvieron de diez ratones, siendo cada valor la media de tres medidas por animal. Los datos obtenidos en la determinación de las actividades enzimáticas oscilaron en el número de casos entre $n=5$ y $n=10$.

El análisis estadístico fue realizado mediante un análisis de varianzas "ANOVA", modelo I. En los casos en que éste reflejó diferencias significativas entre medias, se aplicó un test de Student-Newman-Keuls (SNK), y $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Para la representación mediante tablas de todas las posibles comparaciones entre medias de un modo sencillo, se adoptó una modificación del método de Sokal y Rikel (156), que consistió en señalar los grupos de medias significativas mediante subrayado. De este modo, una o varias medias sobre un mismo subrayado difieren de todas las demás fuera de éste, pero no entre sí. Dos medias sobre subrayados distintos son, por tanto, significativamente diferentes.

En las gráficas la significación viene señalada con un asterisco para $0.05 \geq p > 0.01$ y dos para $p \leq 0.01$.

IV RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo aparecen estructurados en los cinco puntos siguientes:

IV.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE TRES AGENTES ESTRESANTES SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.

Se compara la actuación de distintos tipos de estrés: inmovilización, frío y natación forzada, sobre los parámetros estudiados, especialmente sobre el timo y subpoblaciones tímicas.

IV.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE EL DNA DE TIMOCITOS MURINOS.

Se observa el efecto del estrés y los elevados niveles de corticosteroides endógenos que induce éste, sobre el DNA de timocitos.

IV.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA Y LA APLICACION DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.

Se intenta profundizar en los efectos que ejerce el estrés sobre los mismos parámetros del apartado 1, pero en ausencia de corticosteroides adrenales para lo cual se utilizan animales adrenalectomizados.

IV.4.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DEL INMOVILIZACION SOBRE LA MIGRACION DE CELULAS PRECURSORAS AL TIMO.

Se pretende investigar la posibilidad de que la involución tímica, derivada del estrés, se produzca por una inhibición de la migración de células precursoras al timo, bien porque los factores quimiotácticos se inactiven o porque las células precursoras no los reconozcan.

IV.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS MARCADORAS DE LA MADURACION DE LOS LINFOCITOS.

Se estudian los efectos del estrés sobre la actividad de ciertas enzimas, consideradas como marcadoras de distintos estados de diferenciación linfoide.

IV.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE TRES AGENTES ESTRESANTES SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.

En el presente apartado se exponen los efectos de la aplicación de tres agentes estresantes: inmovilización (IS), frío (FS) y natación forzada (NS) sobre una serie de parámetros, considerados como marcadores de estados de estrés.

Ratones C57BL/6 fueron sometidos a inmovilización, frío, natación o mantenidos bajo condiciones de mínimo estrés (ver apartados III.2 y III.4). Un número de ocho ratones por grupo fueron pesados al inicio y al final del período experimental, e inmediatamente después sacrificados, la sangre recogida y el plasma almacenado para la posterior determinación de la concentración de corticosterona (apartado III.8). Timo, bazo y cápsulas suprarrenales fueron extraídos y pesados. El timo fue utilizado para la obtención de distintas subpoblaciones linfoides, mediante la aglutinación selectiva con lectina de cacahuete (apartados III.5-7).

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

IV.1.1.- Incremento del peso corporal.

Los ratones fueron pesados al inicio y al final del período experimental, después de ser estresados (IS, NS, FS) o no (CO). Los datos se expresan como incremento de peso corporal en gramos,

calculado como el peso final menos el peso inicial.

El análisis de varianzas pone de manifiesto diferencias significativas debidas a los distintos agentes estresantes ($F(3.28)=165.94$, $p \leq 0.01$). El estrés de inmovilización produce una clara disminución del incremento del peso corporal frente al control ($p \leq 0.01$) y además, muestra diferencias significativas con respecto a los grupos de frío y natación ($p \leq 0.01$). Las diferencias significativas del estrés de natación y frío ($p \leq 0.05$) con respecto al control, son de grado menor que las del estrés de inmovilización. Finalmente, el incremento del peso corporal entre los grupos de frío y natación no resulta significativo.

En la tabla I se muestra la comparación entre las medias de los distintos grupos experimentales para el parámetro "incremento del peso corporal".

Las diferencias significativas de los diferentes grupos con respecto al control se representan en la figura 1.

TABLA I: INCREMENTO DEL PESO CORPORAL (g.)

CONTROL	INMOVILIZACION	FRIO	NATACION
8.51 ± 0.16	<u>2.79 ± 0.12</u>	<u>7.93 ± 0.31</u>	<u>7.70 ± 0.17</u>

INCREMENTO DEL PESO CORPORAL (g.)

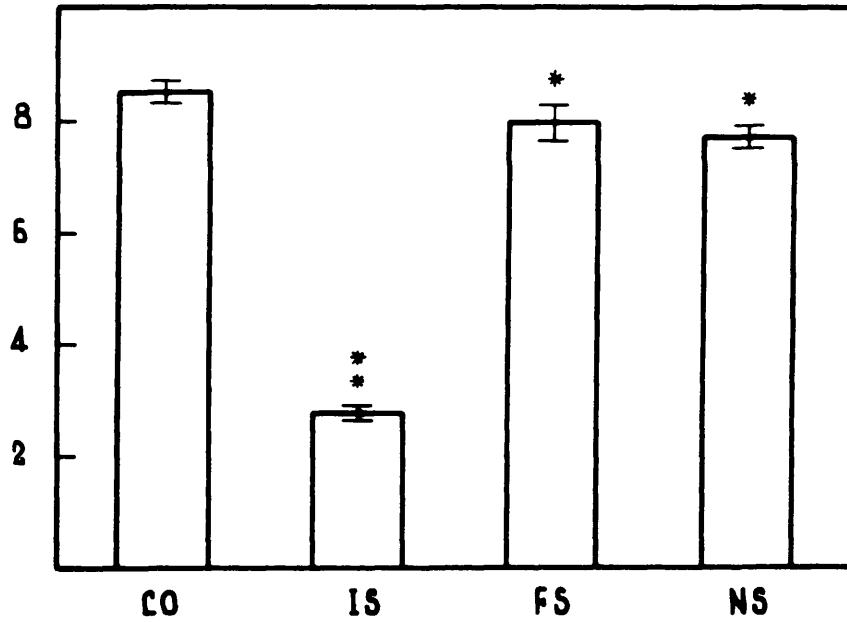


Figura 1: Efecto de distintos tipos de estrés sobre el incremento del peso corporal. Este parámetro (peso final-peso inicial) se determinó en ratones control (CO), estresados por inmovilización (IS), frío (FS) y natación (NS), y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones. * = $0.05 \geq p > 0.01$, ** = $p \leq 0.01$.

IV.1.2.- Peso del bazo.

El análisis de los datos muestra la existencia de diferencias significativas en el peso del bazo de los distintos grupos experimentales ($F(3,28)=36.82$, $p \leq 0.01$). El estrés de inmovilización produce una disminución significativa del peso del bazo con respecto al grupo control y también a los grupos de natación forzada y frío ($p \leq 0.01$). El estrés de natación forzada produce un decrecimiento en el peso del bazo, con respecto al control, que sin embargo no resulta significativo. Es de destacar el aumento del peso del bazo en el estrés de frío con respecto al control, y que resulta significativo ($p \leq 0.05$).

La comparación entre las medias del peso del bazo pertenecientes a los distintos grupos experimentales se muestran en la **tabla II**.

En la **figura 2** aparecen representadas las diferencias significativas de los diferentes grupos con respecto al control.

TABLA II: PESO DEL BAZO (mg.)

CONTROL	NATACION	FRIO	INMOVILIZACION
<u>91.74 ± 5.12</u>	<u>86.07 ± 1.83</u>	<u>100.59 ± 1.60</u>	<u>57.35 ± 2.43</u>

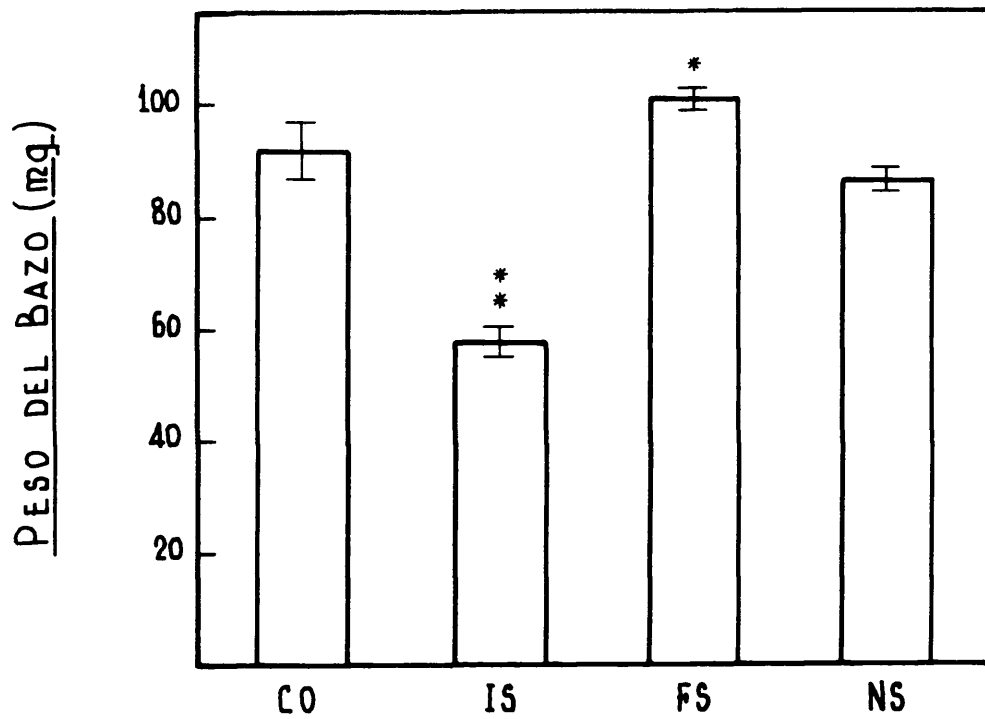


Figura 2: Efecto de distintos tipos de estrés sobre el peso del bazo. Este parámetro se midió en ratones control (CO), estresados por inmovilización (IS), frío (FS) y natación (NS), y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones. * = $0.05 \geq p > 0.01$, ** = $p \leq 0.01$.

IV.1.3.- Peso de las cápsulas suprarrenales.

Existen diferencias significativas en el peso de las cápsulas suprarrenales entre los distintos grupos ($F(3.28)=3.99$, $p \leq 0.05$). Todos los tipos de estrés producen un incremento en el peso de las cápsulas suprarrenales con respecto al control, pero únicamente el estrés de inmovilización produce diferencias significativas ($p \leq 0.01$) con el control y en menor medida con respecto al estrés de frío ($p \leq 0.05$).

Las diferencias significativas entre las medias de los distintos grupos para el parámetro "peso de las cápsulas suprarrenales" se indican en la tabla III. En la figura 3 se indican las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control.

TABLA III: PESO DE LAS CAPSULAS SUPRARRENALES (mg.)

CONTROL	FRIO	NATACION	INMOVILIZACION
5.07 \pm 0.41	5.40 \pm 0.40	5.73 \pm 0.40	6.64 \pm 0.31

PESO DE LAS CÁPSULAS SUPRARENALES (mg.)

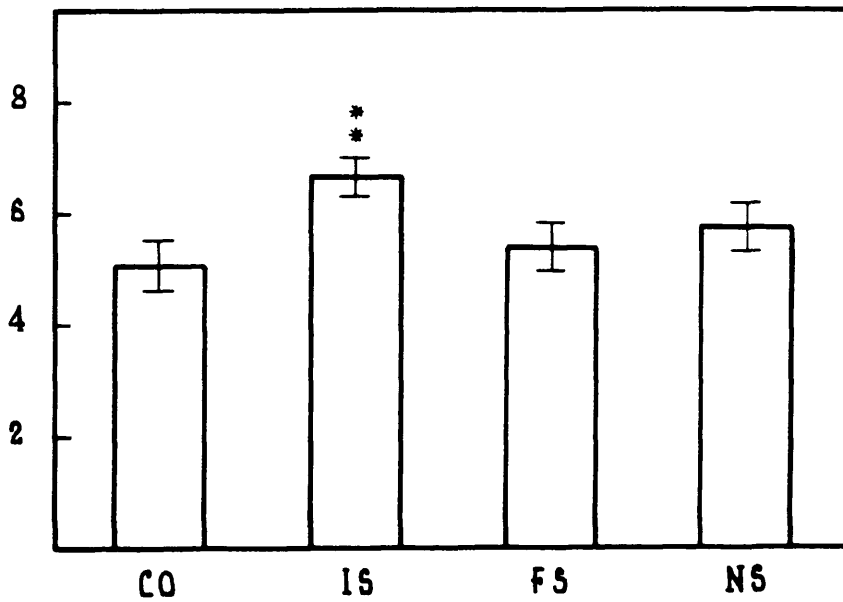


Figura 3: Efecto de distintos tipos de estrés sobre el peso de las cápsulas suprarrenales. Este parámetro se midió en ratones control (CO), estresados por inmovilización (IS), frío (FS) y natación (NS), y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.1.4.- Nivel de corticosterona en plasma.

El nivel de corticosterona en plasma se expresa en $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (apartado III.8). El análisis estadístico indica la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(3.28)=57.39$, $p\leq 0.01$). Los grupos estresados presentan unos niveles de corticosterona entre 4 y 8 veces más altos que los individuos control ($p\leq 0.01$). El estrés de inmovilización produce unos niveles de corticosterona significativamente superiores a los alcanzados con el estrés de natación forzada o frío ($p\leq 0.01$). Además, el nivel de corticosterona alcanzado con la aplicación del estrés de natación forzada es significativamente superior al producido por el estrés de frío ($p\leq 0.05$).

En la tabla IV se indican las diferencias significativas entre las medias de los distintos grupos para el parámetro estudiado.

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control se representan en la figura 4.

TABLA IV: NIVEL DE CORTICOSTERONA EN PLASMA ($\mu\text{g}/100\text{ml}$.)

CONTROL	FRIO	NATACION	INMOVILIZACION
4.50 \pm 0.29	<u>18.55 \pm 2.04</u>	<u>25.42 \pm 0.97</u>	<u>38.42 \pm 2.96</u>

NIVEL DE CORTICOSTERONA EN PLASMA ($\mu\text{g} / 100 \text{ mL}$)

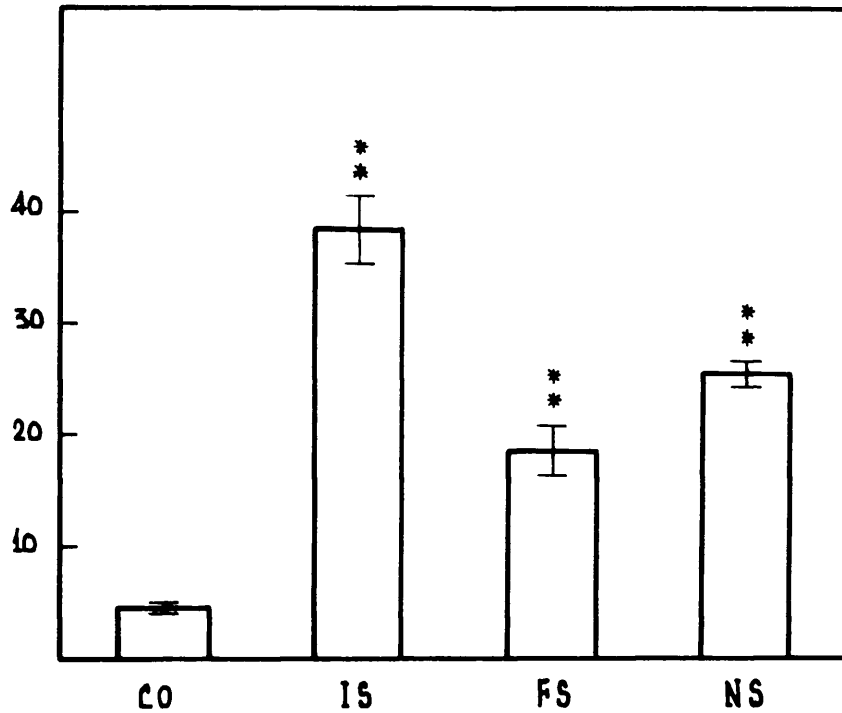


Figura 4: Efecto de distintos tipos de estrés sobre el nivel de corticosterona en plasma. Alicuotas de 200 μl . de plasma de ratones control (CO), estresados por inmovilización (IS), frío (FS) y natación (NS), se utilizaron para la determinación de corticosterona por el método de Zenker y Berstein (apartado 8 de métodos) y se representa como media \pm S.E.M. de $n=8$ ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.1.5.- Peso del timo.

El análisis de los datos revela la existencia de diferencias significativas en el peso del timo de los distintos grupos ($F(3,28)=48.33$, $p \leq 0.01$). La ligera disminución del peso del timo provocada por el estrés de natación no resulta significativa, únicamente el estrés de inmovilización y el de frío muestran diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.01$), aunque de distinto signo. Mientras que el estrés de inmovilización reduce el peso del timo hasta casi la mitad del peso de los controles, el estrés de frío provoca un aumento en este mismo parámetro.

En la tabla V se muestran las diferencias significativas entre las medias del peso del timo de los distintos grupos experimentales.

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control se indican en la figura 5.

TABLA V: PESO DEL TIMO (mg.)

CONTROL	NATACION	FRIO	INMOVILIZACION
<u>74.84 ± 2.14</u>	<u>70.79 ± 5.21</u>	<u>94.20 ± 1.93</u>	<u>42.50 ± 1.47</u>

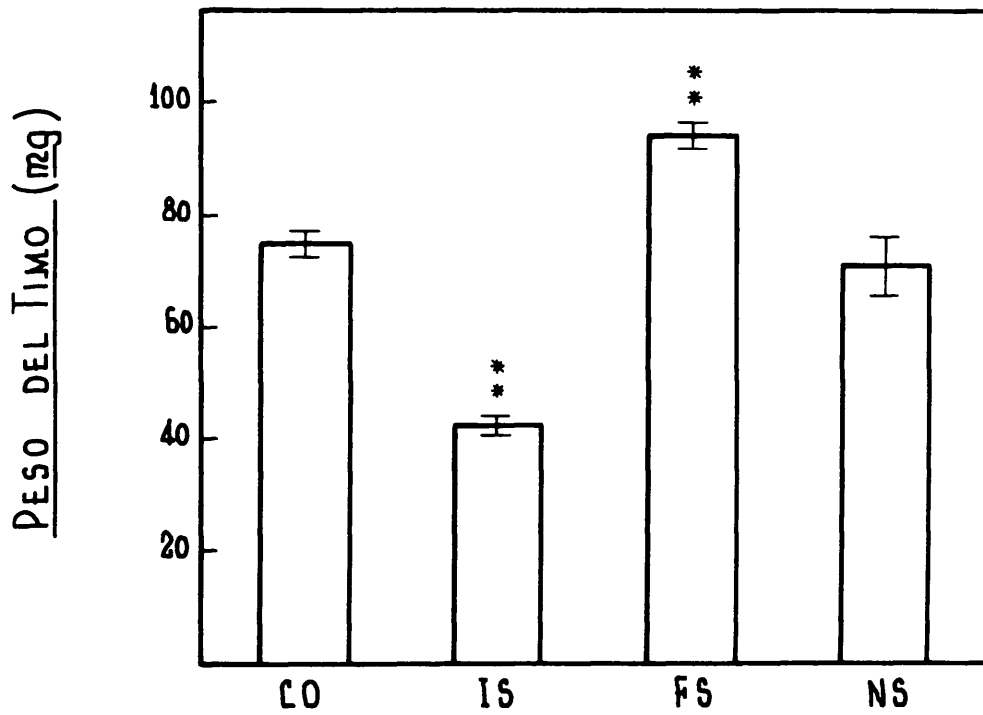


Figura 5: Efecto de distintos tipos de estrés sobre el peso del timo. Este parámetro se midió en ratones control (CO), estresados por inmovilización (IS), frío (FS) y natación (NS), y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.1.6.- Número y tipo de timocitos.

Existen diferencias significativas en el número de timocitos totales entre los distintos grupos ($F(3,28)=65.46$, $p\leq 0.01$). El estrés induce cambios en el número total de timocitos, relacionado con el peso del timo. El grupo sometido a estrés de inmovilización presenta el menor número de células (el 45.67% del número de células del control, $p\leq 0.01$) y, contrariamente, el estrés de frío produce un aumento significativo en el número total de timocitos (47.97% de incremento con respecto al control, $p\leq 0.01$). El grupo sometido a estrés de natación era el menos afectado, aunque muestra una disminución significativa (22.54%, $p\leq 0.01$) de este parámetro con respecto al control.

En cuanto al tipo de timocitos afectados, no aparecen diferencias significativas en el número de timocitos PNA^- (maduros) entre el grupo control y los distintos grupos de estrés ($F(3,28)=0.04$, NS), sin embargo sí existen diferencias significativas entre grupos en el número de timocitos PNA^+ (inmaduros) ($F(3,28)=32.38$, $p\leq 0.01$). El número de timocitos inmaduros disminuye significativamente en el estrés de inmovilización ($p\leq 0.01$) y el estrés de natación ($p\leq 0.05$) y aumenta significativamente en el de frío ($p\leq 0.01$). Es de destacar que el valor alcanzado por este último parámetro en el estrés de inmovilización es significativamente inferior al control y a los restantes grupos de estrés ($p\leq 0.01$). Estos datos indican que las diferencias en el número total de células son únicamente debidas al número de timocitos inmaduros.

Las diferencias significativas entre las medias del número de timocitos totales, PNA⁺ y PNA⁻ de los distintos grupos experimentales se indican en la tabla VI.

En la figura 6 se representan las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control.

TABLA VI: NUMERO DE TIMOCITOS (x 10 ⁻⁶)				
	CONTROL	FRIO	NATAACION	INMOVILIZACION
PNA ⁺	160.73 ± 13.13 92.90%	<u>243.99 ± 23.93</u> 95.30%	<u>121.88 ± 0.78</u> 90.92%	<u>49.98 ± 5.51</u> 81.0%
PNA ⁻	12.27 ± 1.19 7.1%	11.96 ± 1.17 4.7%	11.99 ± 0.08 9.08%	11.71 ± 1.23 19%
TOTAL	173.00 ± 11.99	<u>256.00 ± 12.08</u>	<u>134.05 ± 9.97</u>	<u>61.70 ± 3.68</u>

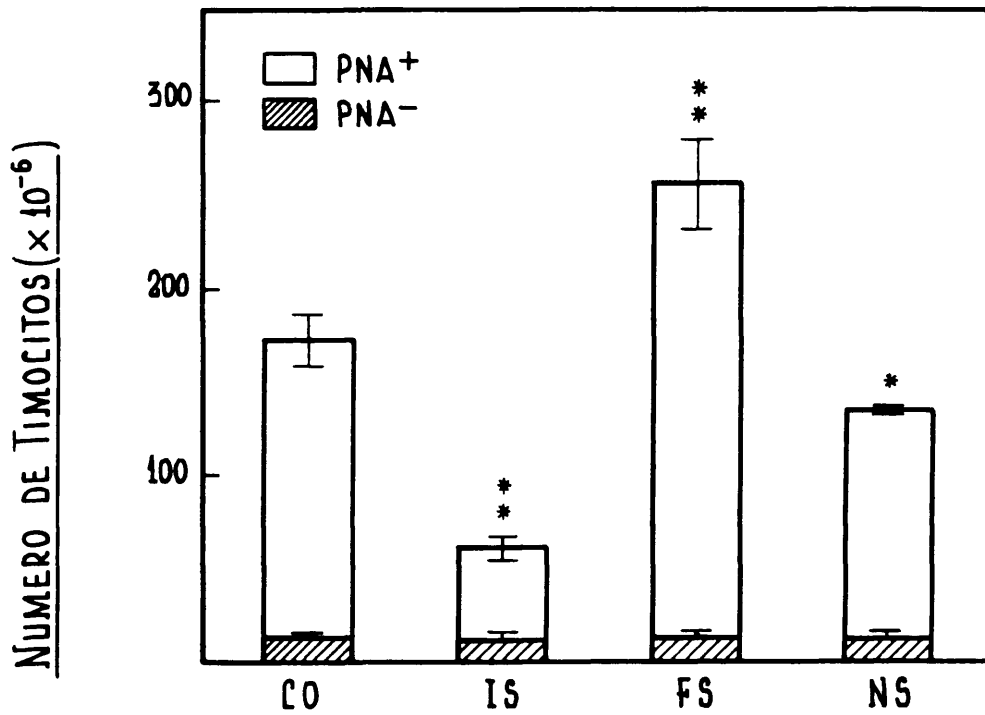


Figura 6: Efecto de distintos tipos de estrés sobre el número y tipo de timocitos. El número total de timocitos y de células PNA+ y PNA- (apartados 6, 7 y 5 de métodos) de ratones control (CO), estresados por inmovilización (IS), frío (FS) y natación (NS) se determinó en una cámara de Neubauer, y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones. * = $0.05 \geq p > 0.01$, ** = $p \leq 0.01$.

IV.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS DE INMOVILIZACIÓN SOBRE EL DNA DE TIMOCITOS MURINOS.

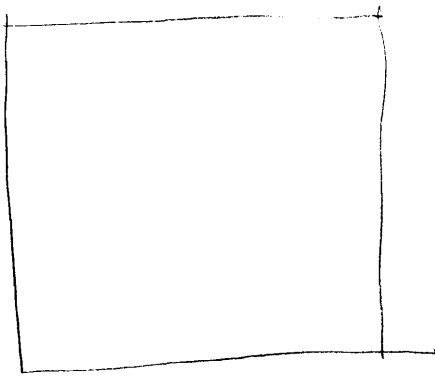
En este estudio se analizan los efectos del estrés de inmovilización crónico (90 minutos diarios durante 14 días consecutivos) y agudo (6 ó 24 horas en un solo día) sobre el DNA de alto peso molecular de timocitos del ratón C57BL/6.

Ratones C57BL/6 fueron sometidos a estrés de inmovilización (crónico o agudo) o mantenidos bajo mínimas condiciones de estrés (apartados III.2 y III.4). Inmediatamente después de la finalización del periodo experimental, los animales pertenecientes a los distintos grupos fueron sacrificados y los timos extraídos. El DNA de alto peso molecular se obtuvo, utilizando el método fenol-cloroformo-enzimático (apartado III.11), a partir de 1×10^8 timocitos. Para la extracción del DNA se utilizaron timocitos totales o células pertenecientes a distintas subpoblaciones tímicas (PNA^+ y PNA^-), obtenidas según el apartado III.6. Este DNA fue sometido a electroforesis en geles del 1.8% de agarosa, utilizando un digerido de DNA del fago lambda como marcador de pesos moleculares (apartado III.12).

La aplicación de los distintos tipos de estrés (crónico o agudo de 6 y 24 horas) no revela efectos detectables sobre la integridad del DNA de timocitos, el cual presenta una migración electroforética similar al DNA de timocitos de ratones control y esto tanto para DNA de timocitos totales como de timocitos PNA^+ y PNA^- .

En la fotografía 2 se muestra un análisis electroforético del DNA de timocitos de ratones control y sometidos a estrés agudo de inmovilización (6 y 24 horas).

latitud
de
aprox
log ~~ant~~
nucleótidos
pores



0.8%

distancia que
recorre en cm

1. Med

23,1

9,6

6,6

4,4

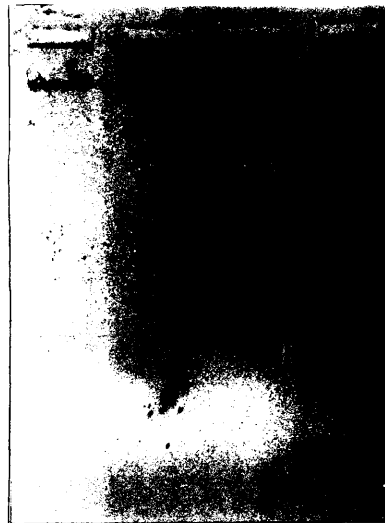
2,3

1,96

0,53

Kelobisis

1 2 3 4



0.3 — 60 kb — 5

0.6 — 20 — 1

Fotografía nº 2: Análisis electroforético en geles del 1,8% de agarosa de DNA de alto peso molecular de timocitos de ratones sometidos a estrés agudo de inmovilización. Se muestra el análisis electroforético del DNA de ratones control (banda 1) y de ratones sometidos a 6 horas (banda 2) y a 24 horas (banda 3) de inmovilización. Como marcador de pesos moleculares se utiliza DNA de fago λ cortado con Hind III (banda 4).

IV.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA Y LA APLICACION DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.

Observados los efectos que los distintos tipos de estrés ejercen sobre la integridad del DNA, en este apartado se muestran los efectos que ejerce el estrés de inmovilización, en ausencia de cápsulas suprarrenales sobre los mismos parámetros estudiados en el apartado IV.1. La adrenalectomía fue utilizada para evitar la presencia de los altos niveles de corticosteroides endógenos, inducidos por el estrés.

Ratones C57BL/6 machos fueron sometidos a estrés de inmovilización, por ser el que producía efectos más intensos en todas las variables estudiadas, y/o adrenalectomía, manteniéndose otros del mismo peso y edad como controles y bajo condiciones mínimas de estrés, según lo especificado en el apartado III.2. Un número de ocho ratones por grupo fueron pesados al inicio y al final del período experimental. Tras ser sacrificados, la sangre se recogió para la medición de corticosterona (apartado III.8). Timo, bazo y cápsulas suprarrenales, si las había, fueron pesados. Distintas subpoblaciones tímicas fueron obtenidas mediante aglutinación selectiva con lectina de cacahuete (apartados III.5-7).

Los resultados obtenidos para cada parámetro han sido los siguientes:

IV.3.1.- Incremento del peso corporal.

El análisis de los datos indica la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(3.28)=51.48$, $p \leq 0.01$). El estrés de inmovilización y la adrenalectomía inducen un descenso significativo en el incremento del peso corporal ($p \leq 0.01$) con respecto a los otros grupos. Este descenso es del mismo orden que el observado para animales inmovilizados y no adrenalectomizados y que aparece en el apartado IV.1.1 (2.79 g. en IS y 2.73 g. en IA). También los grupos controles adrenalectomizados (CA) y falsamente adrenalectomizados (FA) presentan un descenso significativo ($p \leq 0.01$) con respecto al control (CO), aunque las disminuciones observadas en ambos casos son menores.

En la tabla VII se muestran las comparaciones entre las medias de los distintos grupos experimentales.

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control se indican en la figura 7.

TABLA VII: INCREMENTO DEL PESO CORPORAL (g.)

CONTROL	CONTROL ADRENALECT.	FALSAMENTE ADRENALECT.	ADRENALECT. ESTRESADO
7.39 ± 0.23	<u>5.02 ± 0.16</u>	<u>6.14 ± 0.38</u>	<u>2.73 ± 0.29</u>

INCREMENTO DEL PESO CORPORAL (g.)

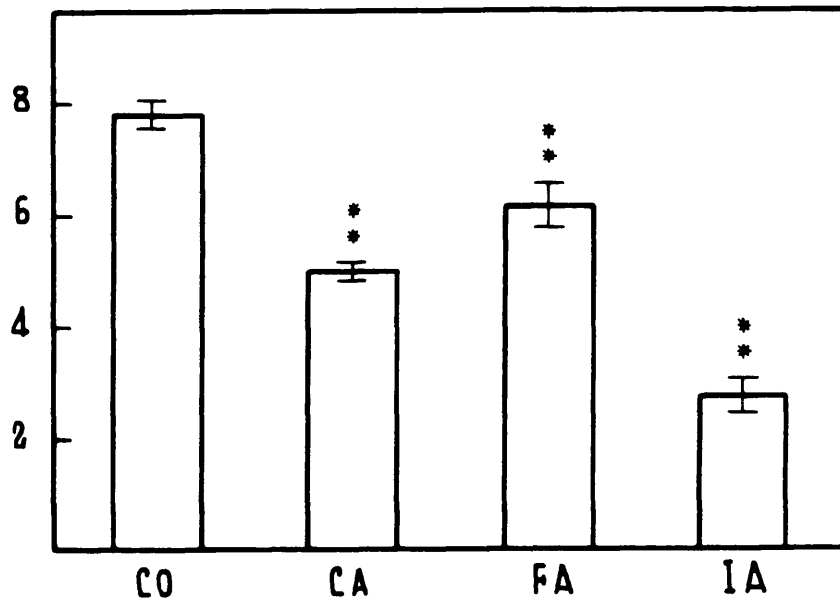


Figura 7: Efecto de la adrenalectomía y el estrés de inmovilización sobre el incremento del peso corporal. Este parámetro (peso final-peso inicial) se determinó en grupos control (CO), control adrenalectomizado (CA), falsamente adrenalectomizado (FA) y adrenalectomizado estresado (IA), y se representa como media \pm S.E.M. de $n=8$ ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.3.2.- Peso del bazo.

Con respecto al parámetro "peso del bazo", se observan diferencias significativas entre grupos ($F(3,28)=17.69$, $p \leq 0.01$). El grupo sometido a estrés de inmovilización y adrenalectomía (AS) presenta un descenso significativo en el peso del bazo ($p \leq 0.01$) con respecto a los restantes grupos. Los grupos controles adrenalectomizados (CA) y falsamente adrenalectomizados (FA) no presentan variaciones significativas con respecto al grupo control (CO).

Las comparaciones entre las medias del peso del bazo de los distintos grupos experimentales se indican en la tabla VIII.

En la figura 8 se muestran las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control.

TABLA VIII: PESO DEL BAZO (mg.)

CONTROL	CONTROL ADRENALECT.	FALSAMENTE ADRENALECT.	ADRENALECT. ESTRESADO
90.66 ± 4.77	90.84 ± 5.27	89.44 ± 2.30	61.79 ± 1.77

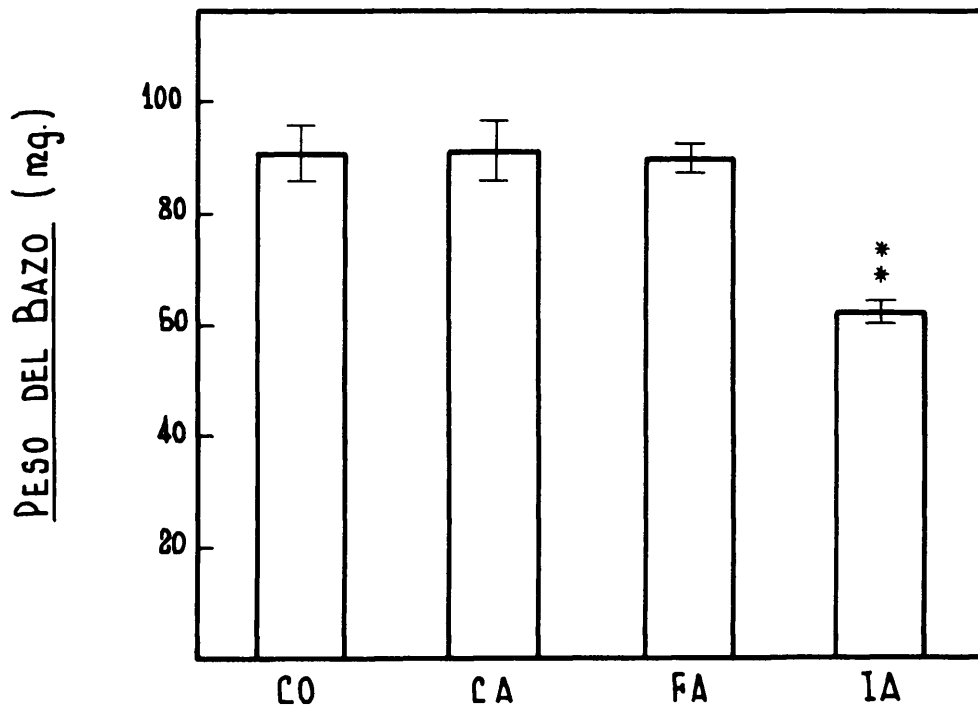


Figura 8: Efecto de la adrenalectomía y el estrés de inmovilización sobre el peso del bazo. Este parámetro se midió en grupos control (CO), control adrenalectomizado (CA), falsamente adrenalectomizado (FA) y adrenalectomizado estresado (IA), y se representa como media \pm S.E.M. de $n=8$ ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.3.3.- Peso de las cápsulas suprarrenales.

El análisis de varianzas para el parámetro "peso de las cápsulas suprarrenales" no revela diferencias significativas entre los grupos control y falsamente adrenalectomizados ($F(1.14)=0.64$, NS).

En la tabla IX se indican las comparaciones entre las medias de los distintos grupos para el parámetro "peso de las cápsulas suprarrenales".

En la figura 9 se representan los valores de la variable estudiada para los distintos grupos.

TABLA IX: PESO DE LAS CAPSULAS SUPRARRENALES (mg.)

CONTROL	FALSAMENTE ADRENALECT.
5.17 ± 0.37	4.83 ± 0.23

PESO DE LAS CÁPSULAS SUPRARENALES (mg.)

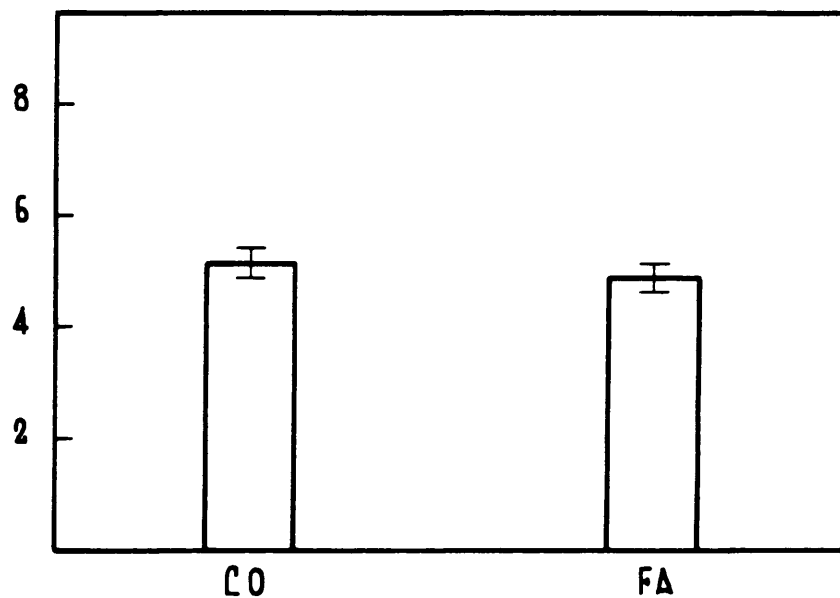


Figura 9: **Peso de las cápsulas suprarrenales.** Este parámetro se midió en grupos control (CO) y falsamente adrenalectomizado (FA), y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones.

IV.3.4.- Nivel de corticosterona en plasma.

Los niveles de corticosterona en plasma se expresan en $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (apartado III.8).

El análisis de varianzas refleja la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(1.14)=12.21$, $p \leq 0.01$) para el parámetro "nivel de corticosterona en plasma". El nivel de corticosterona en animales falsamente adrenalectomizados (FA) es significativamente mayor ($p \leq 0.01$) que en los animales control (CO).

Las comparaciones entre las medias de los grupos control y falsamente adrenalectomizados se muestran en la tabla X.

En la figura 10 se indican las diferencias significativas del grupo falsamente adrenalectomizado con respecto al control.

TABLA X: NIVEL DE CORTICOSTERONA EN PLASMA ($\mu\text{g}/100\text{ml}.$)

CONTROL	FALSAMENTE ADRENALECT.
6.15 \pm 0.65	<u>10.84 \pm 0.17</u>

NIVEL DE CORTICOSTERONA EN PLASMA ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)

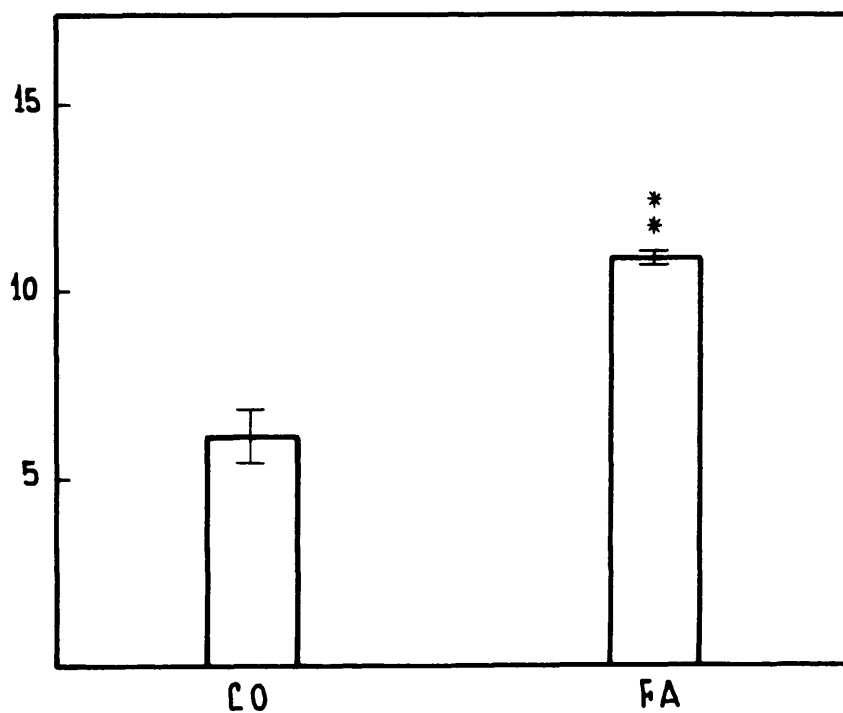


Figura 10: **Nivel de corticosterona en plasma.** Alicuotas de 200 μl . de plasma de grupos control (CO) y falsamente adrenalectomizado (FA) se utilizaron para la determinación de corticosterona por el método de Zenker y Berstein (apartado 8 de métodos), y se representa como media \pm S.E.M. de $n=8$ ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.3.5.- Peso del timo.

Existen diferencias significativas entre grupos en relación al peso del timo ($F(3,28)=87.32$, $p \leq 0.01$). El grupo adrenalectomizado y estresado por inmovilización (AS) muestra una disminución significativa en el peso del timo ($p \leq 0.01$) con respecto a los grupos controles. Esta disminución en el peso del timo es del mismo orden que la encontrada en animales inmovilizados, pero sin adrenalectomizar (ver apartado IV.1.5). Los restantes grupos controles adrenalectomizados (CA) y falsamente adrenalectomizados (FA) no presentan variaciones significativas con respecto al control (CO).

En la tabla XI se indican las comparaciones entre las medias de los distintos grupos para el parámetro "peso del timo".

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control se muestran en la figura 11.

TABLA XI: PESO DEL TIMO (mg.)

CONTROL	CONTROL ADRENALECT.	FALSAMENTE ADRENALECT.	ADRENALECT. ESTRESADO
68.45 ± 2.19	69.64 ± 1.19	68.11 ± 1.18	40.89 ± 1.15

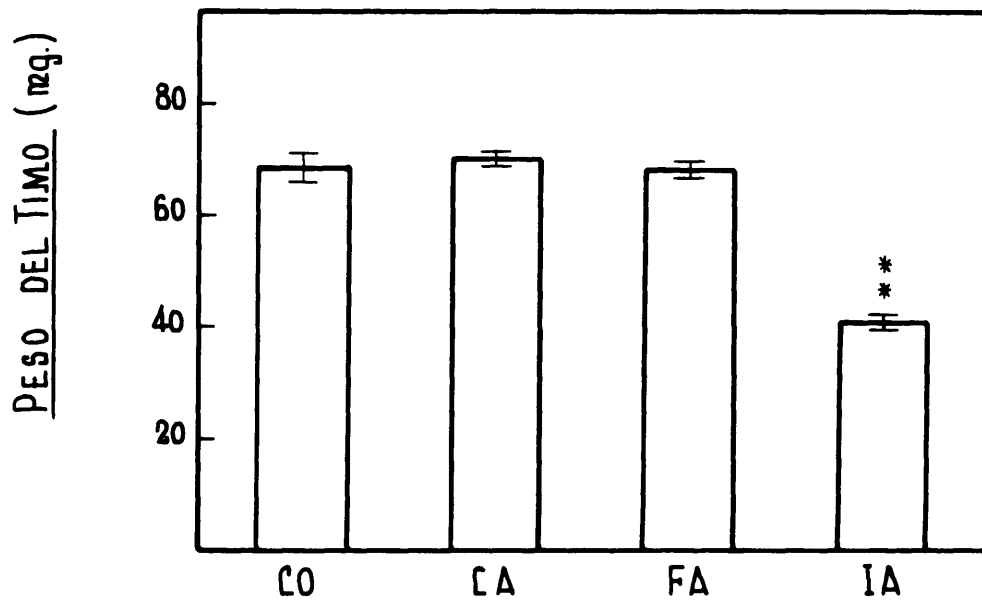


Figura 11: Efecto de la adrenalectomía y el estrés de inmovilización sobre el peso del timo. Este parámetro se midió en grupos control (CO), control adrenalectomizado (CA), falsamente adrenalectomizado (FA) y adrenalectomizado estresado (IA), y se representa como media \pm S.E.M. de $n=8$ ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.3.6.- Número y tipo de timocitos.

Con respecto al número total de timocitos, el estudio efectuado revela la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(3.28)=18.13$, $p \leq 0.01$). La adrenalectomía y el estrés reducen significativamente el número total de timocitos con respecto a los grupos control ($p \leq 0.01$), siendo la reducción máxima (51.30%) con respecto al grupo control (CO). Esta disminución en el número de células totales está en consonancia con la observada en el peso del timo. Asimismo, el grupo falsamente adrenalectomizado (FA) presenta una disminución significativa, aunque menor (29.73%) con respecto al control ($p \leq 0.01$) y al control adrenalectomizado ($p \leq 0.05$). La variación en el número total de células entre los grupos control (CO) y control adrenalectomizado (CA) no resulta significativa.

Se observan diferencias significativas entre grupos en el número de células PNA⁺ ($F(3.28)=16.87$, $p \leq 0.01$), que además siguen la misma pauta que las diferencias observadas para el número total de células. El estrés y la adrenalectomía inducen una significativa reducción del número de células inmaduras ($p \leq 0.01$) con respecto a los otros grupos. También, se observa una disminución en el grupo falsamente adrenalectomizado, que resulta significativa con respecto al control ($p \leq 0.01$) y al control adrenalectomizado ($p \leq 0.05$).

Finalmente, son observadas diferencias significativas entre grupos en el número de timocitos PNA⁻ ($F(3.28)=6.96$, $p \leq 0.01$). El número de timocitos maduros resulta disminuido significativamente por el estrés

y la adrenalectomía ($p \leq 0.01$) con respecto al resto de los grupos. Los restantes grupos controles no muestran variaciones significativas entre ellos.

Aunque la adrenalectomía y el estrés parecen afectar tanto a los timocitos PNA⁺ como PNA⁻, las diferencias en el número total de células se deben mayormente a los timocitos inmaduros.

Las comparaciones entre las medias del número de timocitos totales, PNA⁺ y PNA⁻ de los distintos grupos indican en la tabla XII.

En la figura 12 se representan las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control (CO).

TABLA XII: NUMERO DE TIMOCITOS ($\times 10^{-6}$)

	CONTROL	CONTROL ADRENALECT.	FALSAMENTE ADRENALECT.	ADRENALECT. ESTRESADO
PNA ⁺	<u>122.72 ± 9.76</u> 89.36%	<u>104.71 ± 6.40</u> 89.02%	<u>84.62 ± 4.43</u> 87.70%	<u>59.54 ± 4.35</u> 89.04%
PNA ⁻	14.61 ± 1.32 10.64%	12.91 ± 1.32 10.98%	11.87 ± 1.39 12.30%	<u>7.33 ± 0.37</u> 10.96%
TOTAL	<u>137.33 ± 10.45</u>	<u>117.62 ± 6.87</u>	<u>96.49 ± 4.98</u>	<u>66.87 ± 4.41</u>

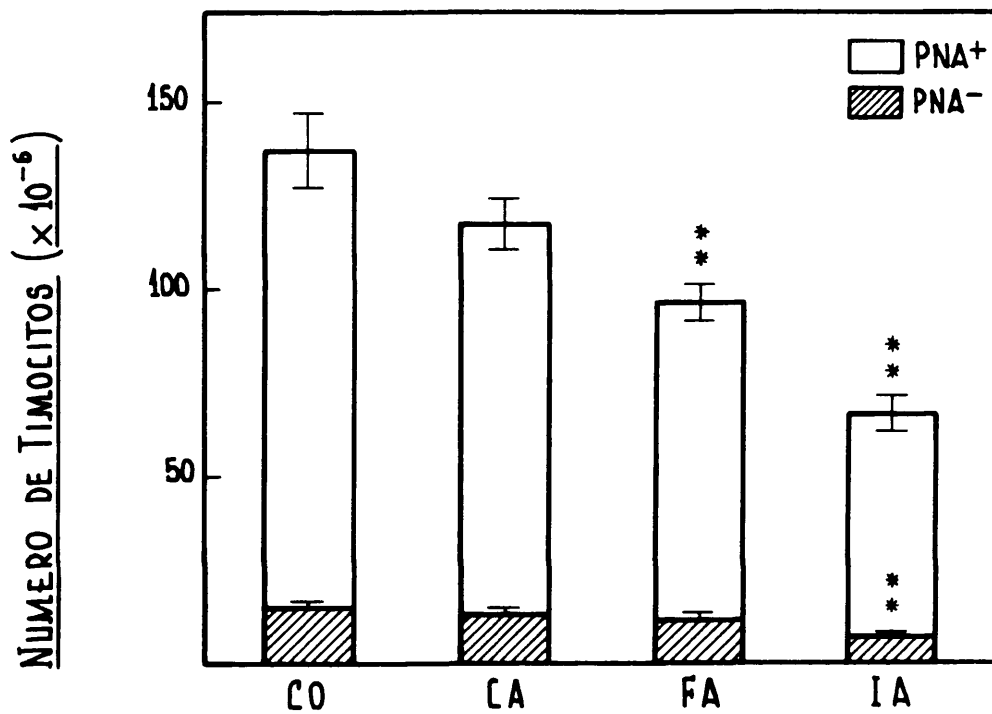


Figura 12: Efecto de la adrenalectomía y el estrés de inmovilización sobre el número y tipo de timocitos. El número total de timocitos y de células PNA+ y PNA- (apartados 6, 7 y 5 de métodos) de grupos control (CO), control adrenalectomizados (CA), falsamente adrenalectomizados (FA) y adrenalectomizados estresado (IA) se determinó en una cámara de Neubauer, y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 ratones. ** = $p \leq 0.01$.

IV.4.- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS DE INMOVILIZACIÓN SOBRE LA MIGRACION DE CELULAS PRECURSORAS AL TIMO.

Para profundizar en el estudio de los mecanismos que contribuyen a la modulación de la inmunidad por el estrés, se investiga, en este apartado, la posibilidad de que otros mecanismos, distintos a la corticosterona, puedan ser responsables de la involución tímica producida por el estrés.

Ratones C57BL/6 fueron sometidos a estrés de inmovilización o mantenidos bajo mínimas condiciones de estrés (apartado III.2 y III.4). Una vez finalizado el periodo experimental, los ratones en un número de diez, fueron sacrificados y sus fémures extraídos, obteniéndose las células precursoras linfoides de médula ósea según se explica en el apartado III.6. Estas células, en una concentración de 5×10^6 células/ml, fueron utilizadas en los ensayos de migración "in vitro" en cámaras quimiotácticas Nuclepore, frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes de cultivo de timo de ratones neonatos y adultos control o estresados (ver los apartados III.9 y III.10).

A continuación se indican los efectos que ejerce el estrés de inmovilización sobre la migración "in vitro" de células precursoras linfoides hacia el timo.

IV.4.1.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de neonatos.

En estos ensayos de migración se utilizaron células de médula ósea de ratones estresados y controles, y factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones neonatos, obtenidos según los apartados III.6 y III.9, respectivamente. La migración aparece expresada como células $\times 10^{-3}$ ó como porcentaje de migración (que se calcula como el cociente entre el número de células migradas recogidas, al que le fue restado el número de células migradas de forma no específica, y el número total de células de médula ósea dispuestas inicialmente en la cámara superior).

El análisis de varianzas indica la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(3.36)=63.87, p \leq 0.01$). La migración de células de la médula ósea de ratones control frente a factores quimiotácticos tímicos de neonatos (CN) es una respuesta quimiotáctica específica y difiere significativamente de la migración no específica de estas mismas células frente al medio (CM) ($p \leq 0.01$). El estrés de inmovilización induce una disminución significativa ($p \leq 0.01$) en el número de células de médula ósea que migran frente al factor quimiotáctico de neonatos (SN). Este número de células migradoras se reduce a más de la mitad por el estrés. La migración no específica de células de médula de ratones estresados no resulta significativa con respecto a la misma de los animales control.

El análisis de los datos revela que existen diferencias significativas en el porcentaje de migración de individuos estresados y controles ($F(1,18)=99.73$, $p \leq 0.01$). El estrés de inmovilización reduce el porcentaje de migración significativamente, casi cuatro veces ($p \leq 0.01$) con respecto al control.

En la tabla XIII se muestran las comparaciones entre medias de los distintos grupos para los parámetros "número de células migradoras" y "porcentaje de migración".

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control se representan en la figura 13a para el número de células y en la figura 13b para el porcentaje de migración.

TABLA XIII: MIGRACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA FRENTE AL FACTOR QUIMIOTACTICO TIMICO DE NEONATOS

	CN	CM	SM	SN
CELULAS MIGRADAS x 10^{-3}	130.57 ± 9.78	38.91 ± 4.64	28.09 ± 3.19	51.63 ± 2.84
% MIGRACION	9.16 ± 0.67			2.35 ± 0.10

CN = número de células de médula ósea de ratones control que migran frente al factor quimiotáctico tímico de neonatos.

CM = número de células de médula ósea de ratones control que migran frente al medio.

SN = número de células de médula ósea de ratones estresados que migran frente al factor quimiotáctico tímico de neonatos.

SM = número de células de médula ósea de ratones estresados que migran frente al medio.

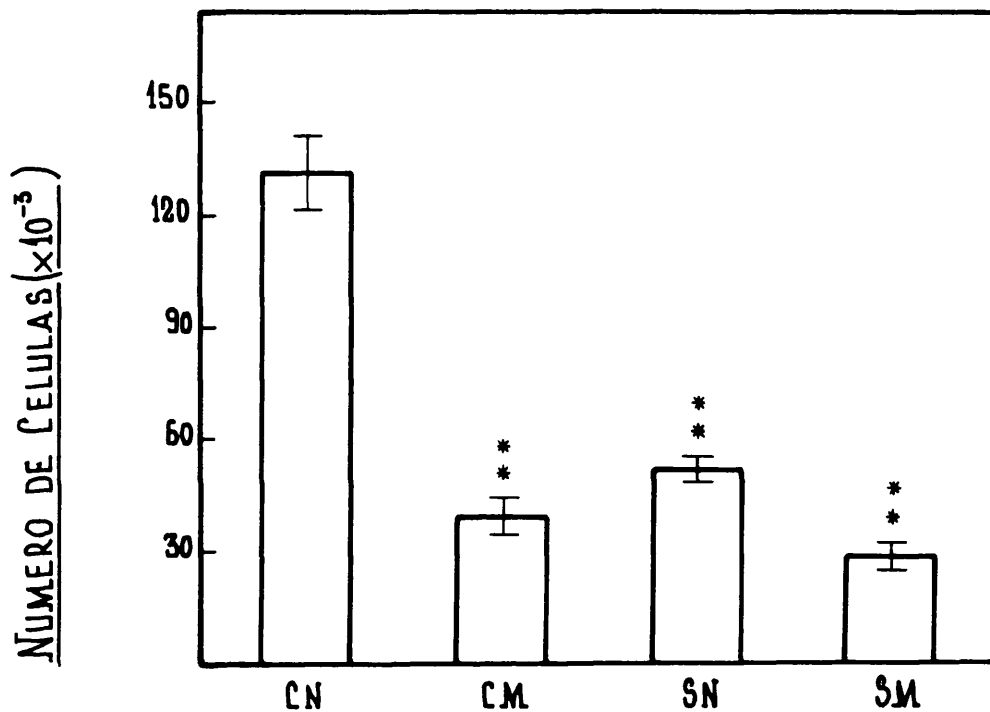


Figura 13a: Efecto del estrés sobre la migración de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos tímicos de neonatos. En los ensayos de migración 200 μ l. de células (5×10^6 cel./ml.) de médula de grupos control y estresados se enfrentaron con 200 μ l. de factor quimiotáctico tímico de neonatos o medio Iscove (apartados 6, 10 y 9 de métodos). Se representan células control migradas al factor (CN) y al medio (CM) y células estrés migradas al factor (SN) y al medio (SM), como media \pm S.E.M. de $n=10$ experimentos por triplicado. ** = $p \leq 0.01$.

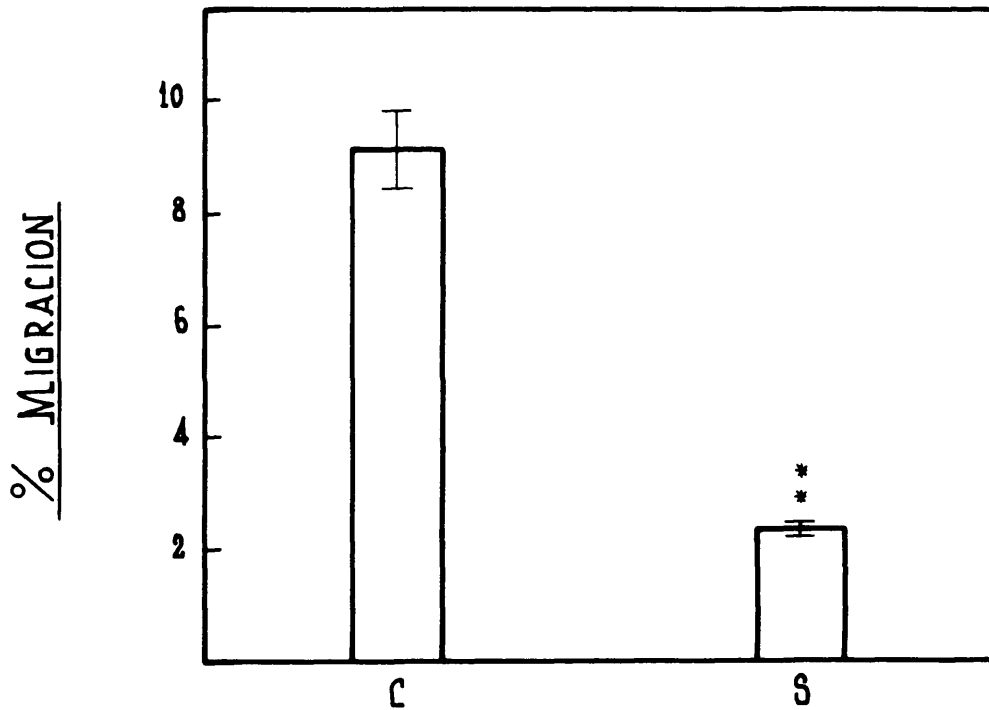


Figura 13b Efecto del estrés sobre el porcentaje de migración frente a factores quimiotácticos tímicos de neonatos. Los ensayos de migración se realizaron como se indica en la figura 13a. El porcentaje de migración (ver apartado 10 de métodos) de células control (C) y estrés (S) se representa como media \pm S.E.M. de $n=10$ experimentos por triplicado. ** = $p \leq 0.01$.

IV.4.2.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células precursoras de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones adultos estresados y controles.

En estos ensayos de migración se utilizaron células de médula ósea y factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes de cultivos de timos de ratones estresados y controles, obtenidos según se explica en los apartados III.6.3 y III.9, respectivamente. La migración aparece expresada mediante dos parámetros: número de células migradas $\times 10^{-3}$ y porcentaje de migración (calculado como hemos indicado anteriormente, restando la migración no específica).

a) Migración de células de médula ósea de ratones control.

En la tabla XIV se analiza la migración de células de médula ósea de ratones control frente a factores quimiotácticos tímicos de ratones estresados y controles, obtenidos de sobrenadantes de cultivo de timo a una concentración de 1.25 ml. de medio por timo, mostrándose las comparaciones entre las medias del número de células migradas de los distintos grupos. El análisis de varianzas indica la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(2.27)=99.34$, $p \leq 0.01$). El número de células que migran frente a factores quimiotácticos estresados (CS) es significativamente inferior ($p \leq 0.01$) al número de células migradas frente a factores control (CC). Además, ambos valores son significativamente superiores ($p \leq 0.01$) al valor de la migración no específica, frente a medio (CM).

Las diferencias significativas en el número de células migradas de los distintos grupos frente a ambos factores con respecto al control se analizan en la figura 14.

TABLA XIV: MIGRACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATONES CONTROL.

	CC	CS	CM
CELULAS MIGRADAS x 10 ⁻³	90.41 ± 4.01	<u>47.28 ± 3.52</u>	<u>23.54 ± 2.51</u>
% MIGRACION	6.68 ± 0.23	<u>2.36 ± 0.16</u>	

CC = número de células de médula ósea de ratones control migradas frente al factor quimiotáctico tímico de ratones control.

CS = número de células de médula ósea de ratones control migradas frente al factor quimiotáctico tímico de ratones estresados.

CM = numero de células de médula ósea de ratones control migradas frente al medio.

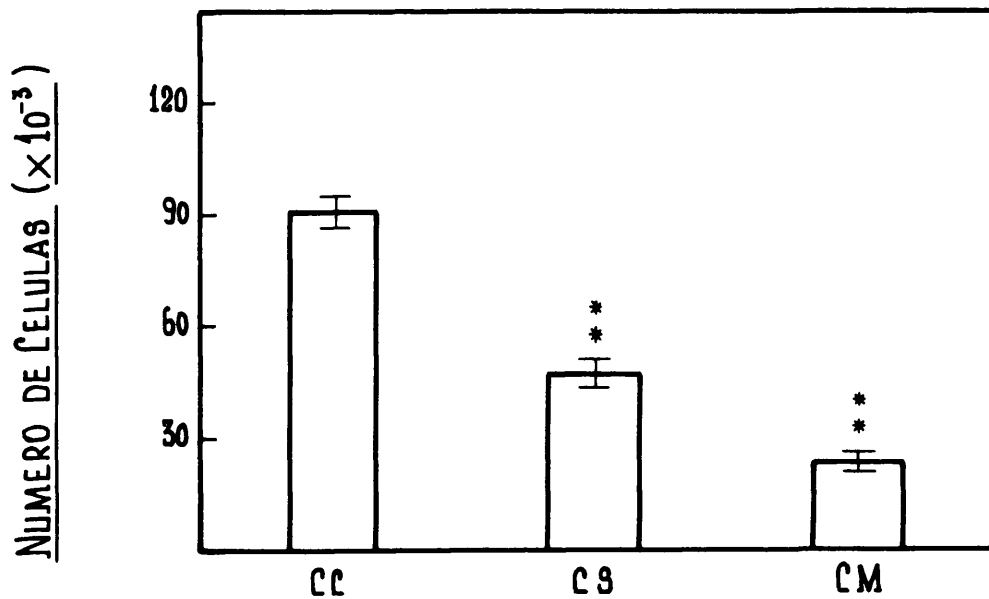


Figura 14: Migración de células de médula ósea control frente a factores quimiotácticos tímicos de ratones adultos estresados y controles. En los ensayos de migración 200 μ l. de células control (5×10^6 cel./ml.) se enfrentaron con 200 μ l. de factores quimiotácticos de ratones control y estresados o medio Iscove (apartado 6, 10 y 9 de métodos). Se representan células control migradas al factor quimiotáctico control (CC), al factor quimiotáctico estrés (CS) y al medio (CM) como media \pm S.E.M. de n=10 experimentos por triplicado. ** $p \leq 0.01$.

b) Migración de células de médula ósea de ratones estresados.

En la tabla XV se analiza la migración de células de médula ósea de ratones estresados frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones estresados y controles, obtenidos mediante cultivos de timo a una concentración de 1.25 ml. por timo, mostrándose las comparaciones entre las medias del número de células migradas de los distintos grupos. Existen diferencias significativas entre grupos ($F(2,27)=107.13$, $p \leq 0.01$). La actividad migradora de las células precursoras frente a los factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes control y estrés sigue el mismo patrón que en el caso de ratones control. El número de células migradas frente a factores quimiotácticos estresados es significativamente menor que frente a factores control ($p \leq 0.01$). Asimismo, la actividad migradora de estas células frente a factores quimiotácticos tímicos (sean de ratones control o estrés), es significativamente mayor que en la migración no específica frente a medio (SM).

En la figura 15 se indican las diferencias significativas en el número de células migradas con respecto al control.

SC = número de células de médula ósea de ratones estresados migradas frente al factor quimiotáctico tímico control.

SS = número de células de médula ósea de ratones estresados migradas frente al factor quimiotáctico tímico estresado.

SM = número de células de la médula ósea de ratones estresados que migran frente al medio.

TABLA XV: MIGRACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATONES ESTRESADOS.

	SC	SS	SM
CELULAS MIGRADAS x 10 ⁻³	80.30 ± 1.58	<u>53.68 ± 3.57</u>	<u>27.90 ± 1.99</u>
% MIGRACION	5.24 ± 0.10	<u>2.57 ± 0.18</u>	

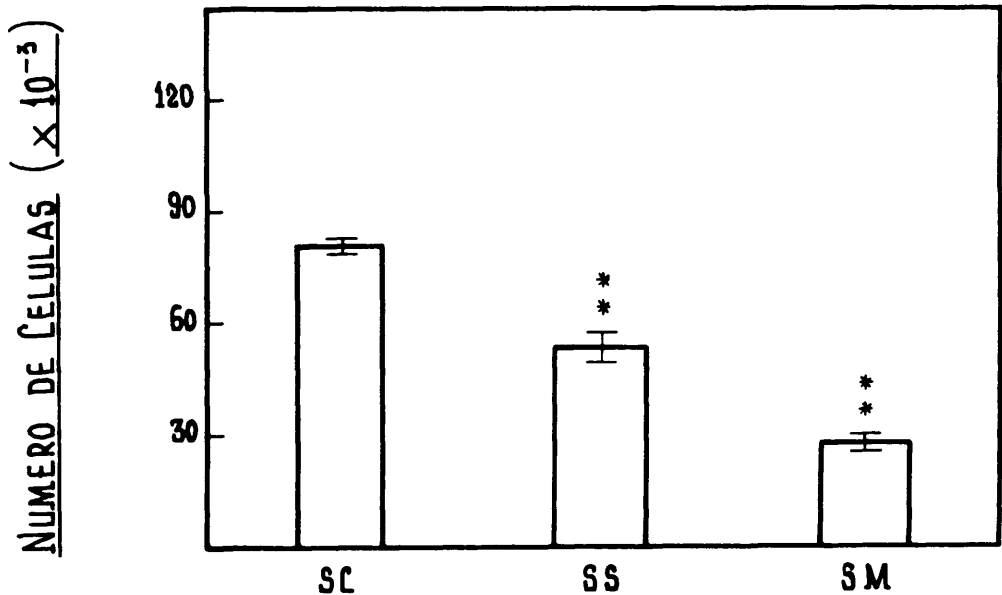


Figura 15: Migración de células de médula ósea estresada frente a factores sobrenadantes tímicos de ratones adultos controles o estresados. En los ensayos de migración 200 μ l. de células estrés (5×10^6 cel./ml.) se enfrentaron con 200 μ l. de factores quimiotácticos tímicos de ratones control y estresados o medio Iscove (apartado 6, 10 y 9 de métodos). Se representan células estresadas migradas al factor quimiotáctico control (SC), al factor quimiotáctico estrés (SS) y al medio (SM) como media \pm S.E.M. de n=10 experimentos por triplicado. ** = $p \leq 0.01$.

c) Porcentaje de migración de células de médula ósea de ratones control y estresados.

El análisis de varianzas para el parámetro porcentaje de migración de células precursoras de la médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones estresados y controles (timos cultivados a una concentración de 1.25 ml. de medio por timo) indica la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(3.36)=145.4$, $p\leq 0.01$). El porcentaje de migración de células precursoras de médula, tanto de ratones estresados (SS) como controles (CS), frente a factores quimiotácticos tímicos afectados por condiciones de estrés, disminuye significativamente (más de dos veces, $p\leq 0.01$) comparado con factores control (5.24% y 6.68% frente a 2.58% y 2.37%). Además, el porcentaje de migración de células estresadas disminuye significativamente ($p\leq 0.01$) con respecto a células control, cuando se utiliza un factor quimiotáctico tímico de ratones control. Cuando se enfrentan células control o estresadas con un factor quimiotáctico de ratones sujetos a estrés, no aparecen diferencias significativas en el porcentaje de migración.

En la tabla XVI se indican las comparaciones entre las medias de los distintos grupos para el parámetro porcentaje de migración y donde, ahora CC, CS, SS y SC vienen expresadas como porcentaje de migración.

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto a los controles se representan en la figura 16.

TABLA XVI: PORCENTAJE DE MIGRACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA FRENTE A FACTORES QUIMIOTACTICOS TIMICOS DE RATONES ESTRESADOS Y CONTROLES.

CC	CS	SS	SC
<u>6.68 ± 0.23</u>	<u>2.36 ± 0.16</u>	<u>2.57 ± 0.18</u>	<u>5.24 ± 0.10</u>

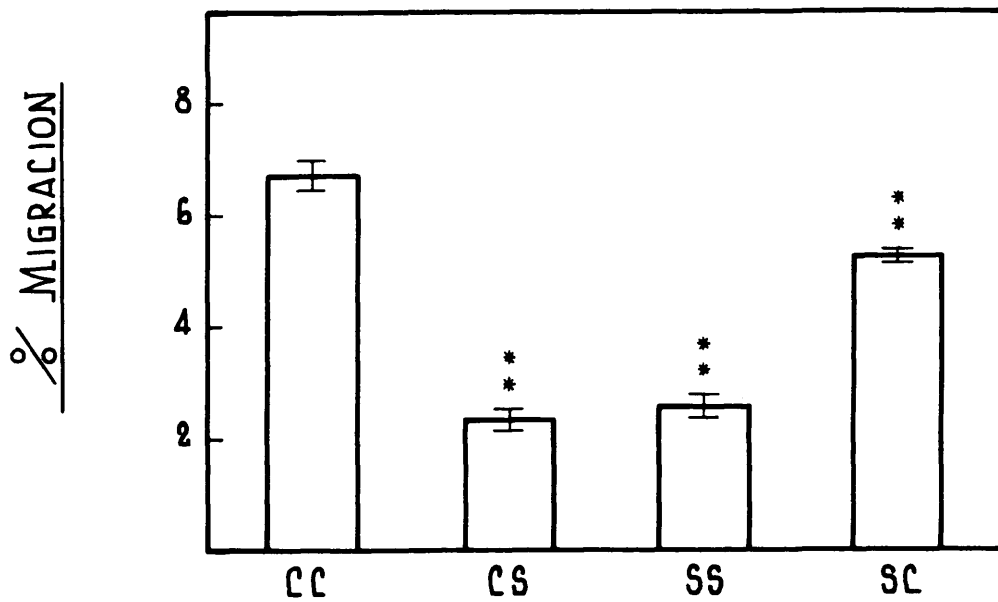


Figura 16: **Porcentaje de migración frente a factores quimio-tácticos tímicos de ratones adultos estresados y controles.** Los ensayos de migración se realizaron como se indica en las figuras 14 y 15. El porcentaje de migración (ver apartado 10 de métodos) de células control a factores control (CC) y a factores estrés (CS) y de células estresadas a factores control (SC) y a factores estrés (SS) se representa como media \pm S.E.M. de n=10 experimentos por triplicado. ** = $p \leq 0.01$.

d) Migración de células de médula ósea frente al factor quimiotáctico estresado.

En la tabla XVII se analiza la migración de células de médula ósea de ratones control y estresados frente a factores quimiotácticos tímicos, que fueron obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos de timo de ratones estresados, utilizando un volumen de medio ajustado al peso del timo. El análisis de varianzas indica la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(3.12)=32.03$, $p \leq 0.01$). El número de células control que migran frente a estos factores quimiotácticos estresados (CS) es significativamente superior ($p \leq 0.01$) al número de células estresadas migradas frente al mismo factor. También se observa que la migración no específica, tanto en células control (CM) como en células estrés (SM) difiere significativamente ($p \leq 0.01$) de la actividad migratoria de estas mismas células frente al factor.

El análisis de varianzas para el parámetro "porcentaje de migración", utilizando el factor quimiotáctico tímico estresado, revela la existencia de diferencias significativas entre grupos ($F(1.6)=32.77$, $p \leq 0.01$). El porcentaje de migración de células de ratones estresados disminuye significativamente ($p \leq 0.01$) con respecto a células control frente a este mismo factor.

Las diferencias significativas de los distintos grupos con respecto al control se representan en la figura 17a para el "número de células" y en la figura 17b para el "porcentaje de migración". En la

figura 17b, CS y SS aparecen expresados como porcentaje de migración.

TABLA XVII: MIGRACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA FRENTE AL FACTOR QUIMIOTACTICO ESTRESADO.

	CS	CM	SM	SS
CELULAS MIGRADAS x 10 ⁻³	90.79 ± 5.97	27.02 ± 1.63	27.54 ± 3.13	50.59 ± 3.85
% MIGRACION	6.37 ± 0.60			2.30 ± 0.38

CS = número de células de médula ósea de ratones control migradas frente al factor quimiotáctico estresado

CM = número de células de médula ósea de ratones control migradas frente al medio.

SS = número de células de médula ósea de ratones estresados migradas frente al factor quimiotáctico estresado.

SM = número de células de médula ósea de ratones estresados migradas frente al medio.

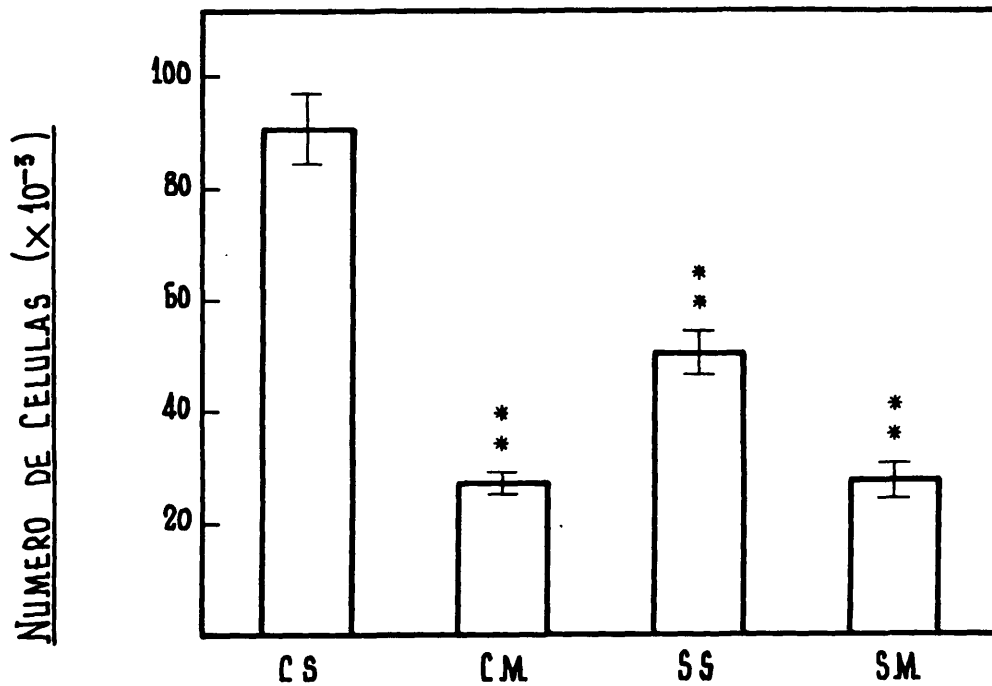


Figura 17a: Migración de células de médula ósea estresada y control frente a factores quimiotácticos tímicos de ratones adultos estresados. En los ensayos de migración 200 μ l de células control o estrés (5×10^6 cel./ml.) se enfrentaron con 200 μ l. de factor quimiotáctico de ratones estresados (apartados 6, 9 y 10 de métodos). Se representan células control migradas al factor (CS) y al medio (CM) y células estrés migradas al factor (SS) y al medio (SM) como media \pm S.E.M. de n=4 experimentos. ** = $p \leq 0.01$.

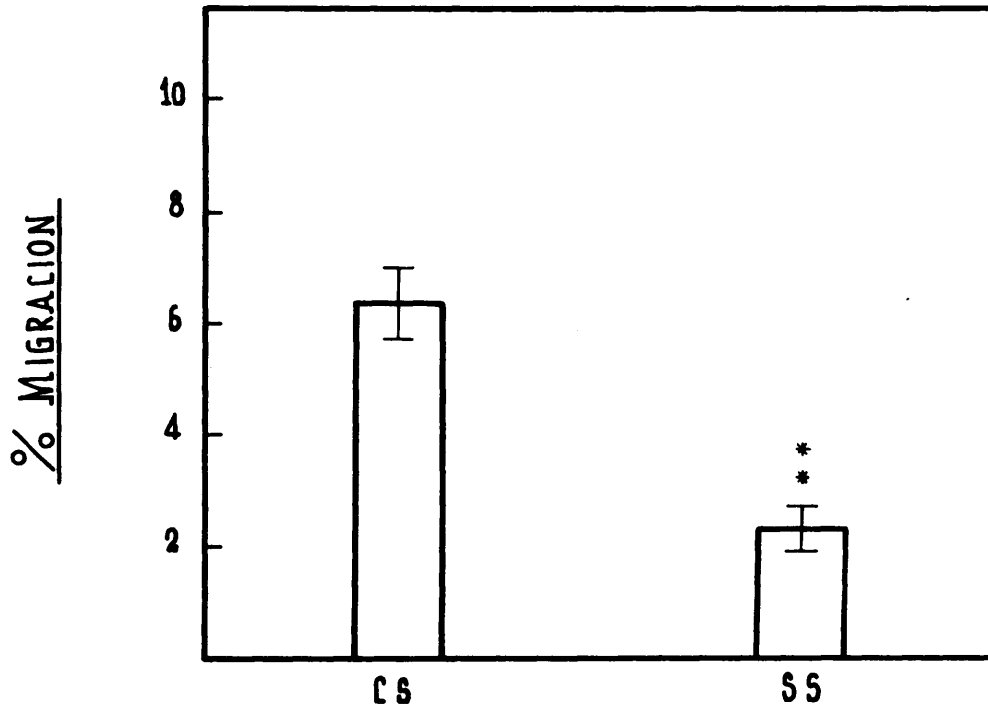


Figura 17b: Porcentaje de Migración frente a factores quimiotácticos tímicos de ratones adultos estresados. Los ensayos de migración se realizaron como se indica en la figura 17a. El porcentaje de migración (apartado 10 de métodos) de células control (CS) y células estrés (SS) se representa como media \pm S.E.M. de $n=4$ experimentos. ** = $p < 0.01$.

IV.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS DE INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS MARCADORAS DE LA MADURACION DE LOS LINFOCITOS T.

En este último apartado se presentan los niveles de actividad enzimática de cuatro enzimas, consideradas como marcadoras de la maduración de los linfocitos T: 5'Nucleotidasa (5'-NT), N-acetil- β -glucosaminidasa (NABG), β -glucuronidasa (BG) y Serín esterasa (SE).

Ratones C57BL/6 sometidos a estrés de inmovilización o mantenidos bajo mínimas condiciones de estrés (apartados III.2 y III.4) fueron sacrificados tras la finalización del período experimental. El timo fue retirado y se procedió a la separación de subpoblaciones tímicas (maduras e inmaduras, apartado III.6). Los extractos celulares se mantuvieron almacenados a -80°C hasta su utilización en la determinación de actividades enzimáticas (con un número de muestras que osciló entre 5 y 10, apartado III.13).

En todas las determinaciones las abreviaturas utilizadas son las siguientes:

S-PNA⁺ = actividad de cada una de las enzimas en células PNA⁺ de ratones estresados.

S-PNA⁻ = actividad de cada una de las enzimas en células PNA⁻ de ratones estresados.

C-PNA⁺ = actividad de cada una de las enzimas en células PNA⁺ de ratones controles.

C-PNA⁻ = actividad de cada una de las enzimas en células PNA⁻ de ratones controles.

IV.5.1.- Actividad 5'-nucleotidasa (5'-NT).

La actividad de la enzima 5'-NT, calculada por el método de Arkesteijn (apartado III.13.2) se expresa en mU/10⁶células.

Los resultados obtenidos indican que esta actividad en timocitos PNA⁺, no presenta diferencias significativas ($F(1.8)=0.88$, NS) entre ratones estresados y controles. Asimismo, tampoco se encuentran diferencias significativas en la subpoblación de timocitos PNA⁻ de ratones estresados y controles ($F(1.8)=0.73$, NS). Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre timocitos de ratones estresados y controles, tanto en células PNA⁺ como PNA⁻, con respecto a los niveles de actividad enzimática 5'-NT.

Finalmente, se puede observar que los timocitos PNA⁺ presentan menores niveles de actividad que los PNA⁻, lo que indica que la actividad de esta enzima se incrementa con la maduración, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (138).

En la tabla XVIII se muestran las comparaciones entre las medias de los valores de actividad de la enzima 5'-NT para los distintos grupos experimentales.

Las variaciones de actividad de la enzima 5'-nucleotidasa en los grupos estresados con respecto al control aparecen representados en la figura 18.

TABLA XVIII: ACTIVIDAD 5'NT (mU/10⁶células)

S-PNA ⁺	C-PNA ⁺	S-PNA ⁻	C-PNA ⁻
<u>30.00 ± 1.46</u>	<u>32.08 ± 1.67</u>	<u>47.50 ± 3.15</u>	<u>54.60 ± 7.90</u>

ACTIVIDAD 5'-NT (mU / 10⁸ CELULAS)

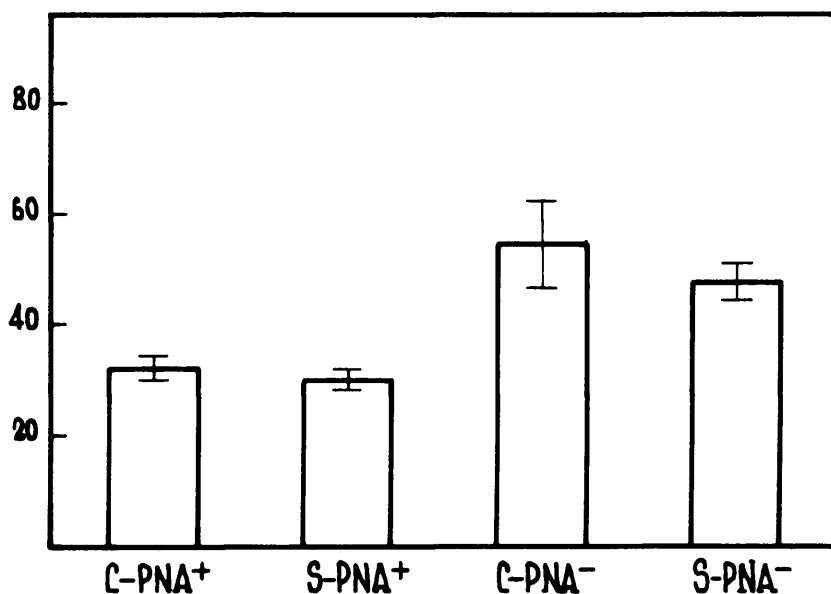


Figura 18: Efecto del estrés sobre la actividad 5'-NT. Alícuotas de 70 μ l. de extractos de células PNA+ estresadas (S-PNA+) y controles (C-PNA+) y células PNA- estresadas (S-PNA-) y controles (C-PNA-) se utilizaron para medir la actividad 5'-NT por el método de Arkesteijn (apartado 13.2 de métodos), y se representa como media \pm S.E.M. de n=5 experimentos.

IV.5.2.- Actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NABG).

La actividad NABG se determinó en las subpoblaciones tímicas PNA⁺ y PNA⁻, utilizando el método de Yakata (apartado III.13.3). La actividad de la enzima NABG se expresa en mU/10⁶células.

El análisis de varianzas indica que no existen diferencias significativas en la actividad de la enzima N-acetil- β -glucosaminidasa de ratones controles y estresados, y tanto en células PNA⁺ (F(1.18)=1.33, NS) como en células PNA⁻ (F(1.8)=0.02, NS).

Si existen variaciones de esta actividad entre timocitos maduros e inmaduros, observándose un aumento entre 4 y 5 veces de células PNA⁻ a células PNA⁺ (de 3.22 y 2.69 a PNA⁺ hasta 13.44 y 14.14 en PNA⁻, de ratones estresados y controles respectivamente), confirmando que esta actividad enzimática incrementa con la madurez de las subpoblaciones tímicas (137).

Las comparaciones entre las medias de los niveles de la actividad NABG de los distintos grupos experimentales se indican en la tabla XIX.

En la figura 19 se representan las variaciones de actividad de la enzima NABG en los grupos estresados con respecto al control.

TABLA XIX: ACTIVIDAD NABG (mU/10⁶células)

S-PNA ⁺	C-PNA ⁺	S-PNA ⁻	S-PNA ⁻
<u>3.22 ± 0.31</u>	<u>2.69 ± 0.31</u>	<u>13.44 ± 2.4</u>	<u>14.14 ± 3.84</u>

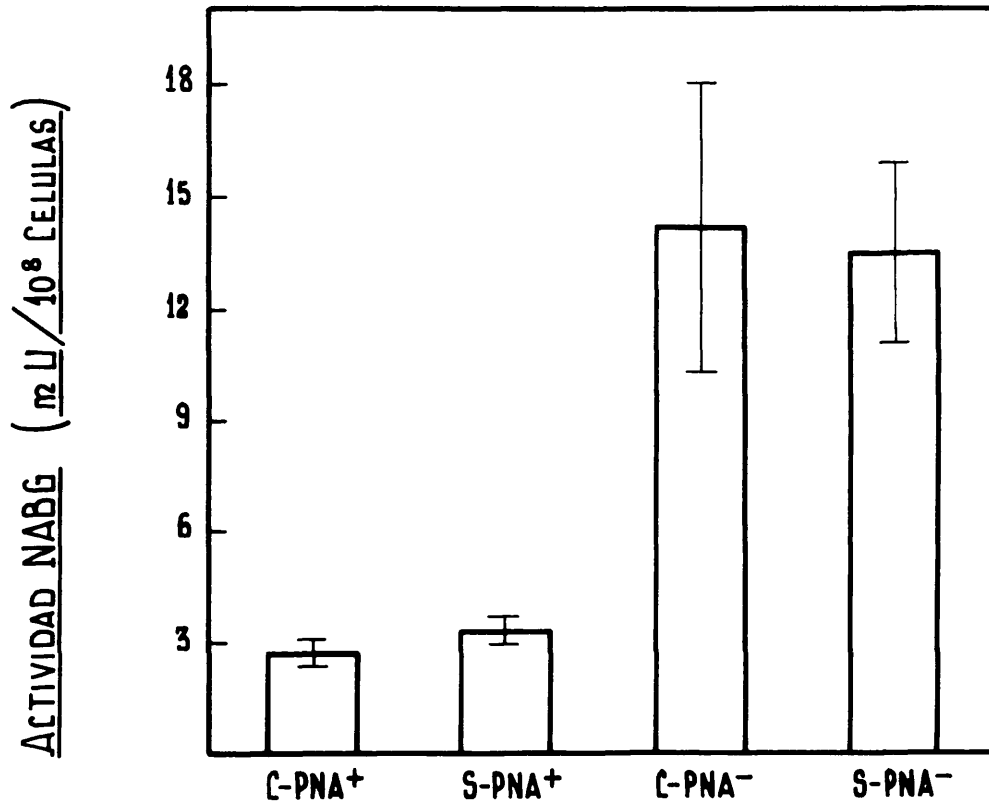


Figura 19 : Efecto del estrés sobre la actividad NABG. Alícuotas de 35 μ l. de extractos de células PNA+ estresadas (S-PNA+) y controles (C-PNA+) y células PNA- estresadas (S-PNA-) y controles (C-PNA-) se utilizaron para medir la actividad NABG por el método de Yakata (apartado 13.3 de métodos), y se representa como media \pm S.E.M. de n=5 (PNA-) y n = 10 (PNA+) experimentos.

IV.5.3.- Actividad β -glucuronidasa (β G).

La actividad de la enzima BG se expresa en U/10⁶células y fue determinada en subpoblaciones típicas de ratones estresados y controles siguiendo el método propuesto por Fishman y colaboradores (apartado III.13.4).

La aplicación del estrés no revela diferencias significativas con respecto a ratones control ($F(1.14)=0.48$, NS) de la actividad BG en timocitos PNA⁺. Tampoco se observan diferencias significativas ($F(1.8)=0.2$, NS) en los niveles de actividad enzimática en timocitos PNA⁻ de ratones estresados frente a controles.

Esta glucidasa, al igual que la enzima NABG, presenta un incremento de su actividad con la madurez (137). Nuestros resultados indican un aumento entre dos y tres veces de timocitos PNA⁺ a timocitos PNA⁻ (8.41 y 6.75 frente a 33.84 y 40.26, respectivamente), observándose un aumento del mismo orden ya sean ratones estresados o controles.

En la tabla XX se representan las comparaciones entre las medias de los valores de esta actividad enzimática de los distintos grupos experimentales.

Las variaciones de actividad de la enzima β -glucuronidasa en los grupos estresados frente al control se indican en la figura 20.

TABLA XX: ACTIVIDAD BG (U/10⁶células)

S-PNA ⁺	C-PNA ⁺	S-PNA ⁻	C-PNA ⁻
<u>8.41 ± 2.09</u>	<u>6.75 ± 1.17</u>	<u>33.84 ± 8.18</u>	<u>40.26 ± 11.68</u>

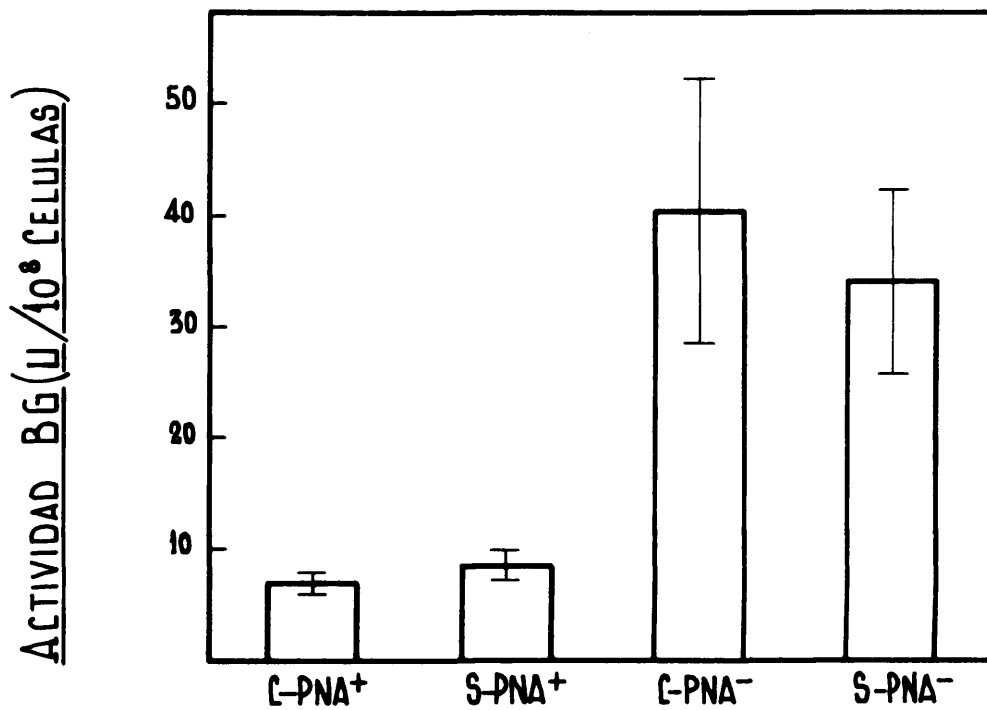


Figura 20 : Efecto del estrés sobre la actividad BG. Alicuotas de 40 μ l. de extractos de células PNA⁺ estresadas (S-PNA⁺) y controles (C-PNA⁺) y de células PNA⁻ estresadas (S-PNA⁻) y controles (C-PNA⁻) se utilizaron para medir la actividad BG por el método de Fishman (apartado 13.4 de métodos), y se representa como media \pm S.E.M. de n=8 (PNA⁺) y n = 5 (PNA⁻) experimentos.

IV.5.4.- Actividad serín esterasa (SE).

La actividad de la enzima SE se expresa en $U/2 \times 10^7$ células (apartado III.13.5) y se determinó siguiendo el método utilizado por Pasternack y Eisen (139).

El análisis de varianzas indica que no existen diferencias significativas en los niveles de actividad enzimática de timocitos de ratones estresados y controles, y esto tanto en subpoblaciones PNA⁺ ($F(1.14)=2.12$, NS) como subpoblaciones PNA⁻ ($F(1.8)=0.19$, NS).

Finalmente, los resultados obtenidos muestran que la actividad serín esterasa se duplica de timocitos PNA⁺ a PNA⁻, observándose que la aplicación del estrés de inmovilización no modifica este incremento de la actividad observado en los ratones control.

En la tabla XXI se indican las comparaciones entre las medias de los valores de actividad serín esterasa de distintos grupos experimentales.

Las variaciones de actividad de la enzima SE en timocitos de ratones estresados con respecto a los individuos control se representa en la figura 21.

TABLA XXI: ACTIVIDAD SE (U/2x10⁷células)

S-PNA ⁺	C-PNA ⁺	S-PNA ⁻	C-PNA ⁻
<u>0.0571 ± 0.0042</u>	<u>0.0655 ± 0.0040</u>	<u>0.1258 ± 0.0105</u>	<u>0.1186 ± 0.01288</u>

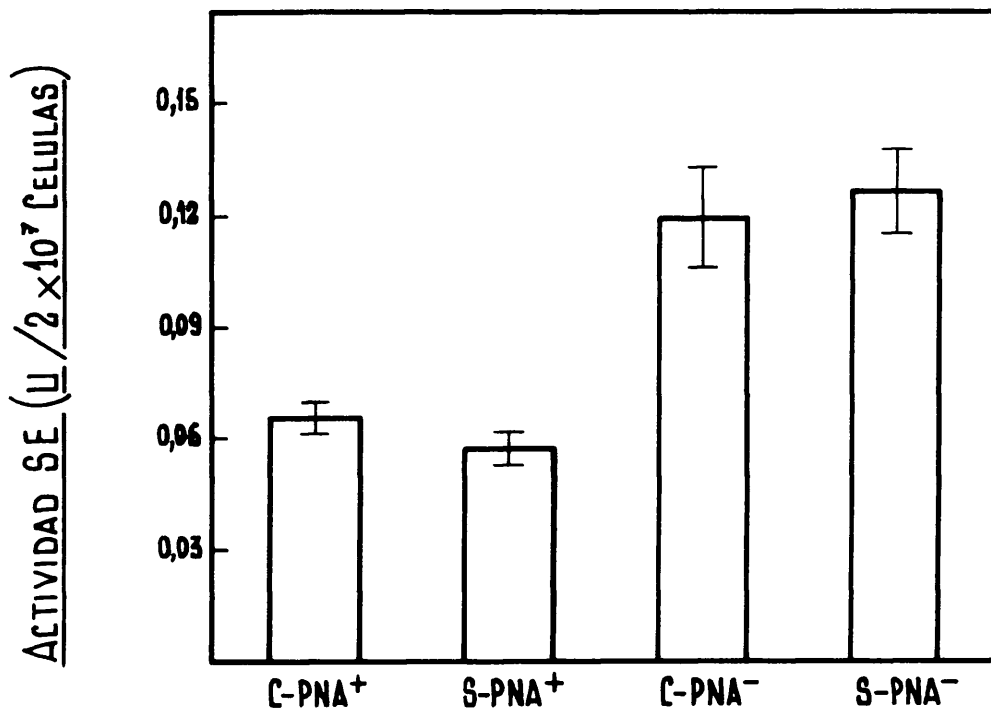


Figura 21 : Efecto del estrés sobre la actividad SE. Alicuotas de 100 µl. de extractos de células PNA⁺ estresadas (S-PNA⁺) y controles (C-PNA⁺) y de células PNA⁻ estresadas (S-PNA⁻) y controles (C-PNA⁻) se utilizaron para medir la actividad SE (apartado 13.5 de métodos), y se representa como media ± S.E.M. de n=8 (PNA⁺) y n = 5 (PNA⁻) experimentos.

V DISCUSSION

La búsqueda de un modelo adecuado de estrés es uno de los mayores problemas que se plantean en este tipo de estudios, ya que se deben tener en cuenta tanto las numerosas variables que determinan que las condiciones establecidas sean estresantes o no, como los efectos que el estresante escogido ejerce sobre parámetros diversos. En trabajos de experimentación con animales, no siempre está claro si el grupo que es considerado como control (es decir, mantenido bajo mínimas condiciones de estrés) está expuesto, de hecho, a agentes estresantes no controlados o desconocidos por el experimentador. Existen una gran variedad de factores externos, presentes en las condiciones normales de laboratorio, que pueden resultar estresantes para el animal, por lo que las condiciones de mantenimiento de los animales deben estar bien establecidas pues varían las respuestas y comportamientos animales según las diferentes condiciones (21). La simple manipulación de los animales lleva inherente la presencia de niveles de estrés, que producen variaciones de los mecanismos inmunes (26), por lo que se tuvo la precaución de no manipular innecesariamente a los animales.

Los animales se mantuvieron en un número entre cuatro y seis por jaula para evitar los efectos estresantes que producen factores sociales como el aislamiento o el hacinamiento (157), ya que han sido observadas respuestas inmunes diferentes en animales que viven solos o en grupos (36) y comportamientos alterados en ratones bajo condiciones de hacinamiento (158), a la vez que se observan respuestas de anticuerpos reducidas y elevación del nivel de esteroides (26). Un

parámetro como el peso de las cápsulas suprarrenales, que es considerado indicativo de estados de estrés, varía con el número de animales por jaula (159).

Por otro lado, se tuvo la precaución de mantener en habitaciones separadas los animales control y los sujetos a condiciones de estrés (160) para evitar la existencia de estímulos olfativos y auditivos procedentes de otros animales, impidiendo así la comunicación del estrés de ansiedad a los individuos control, ya que han sido observadas respuestas semejantes en ambos grupos, cuando eran mantenidos en la misma habitación (161).

Los animales se decapitaron de forma inmediata a la finalización de la aplicación del estrés o una vez concluido el período experimental, no transcurriendo desde el inicio del proceso más de tres minutos y la sangre se recogió para la determinación de corticosterona, con ello se pretendió evitar el aumento de esta hormona en sangre observado por algunos autores después de cinco minutos de manipulación (28, 93, 148). Así, los niveles basales de corticosterona no excedieron los 5 $\mu\text{g.}/100\text{ ml.}$, siendo la media de 4.5 $\mu\text{g.}/100\text{ ml.}$ (frente a los valores de 0-3.5 $\mu\text{g.}/100\text{ ml.}$ que presentan animales mantenidos en sistemas antiestrés, a prueba de ruidos y olores) (148).

Todos los experimentos y la muerte de los animales se realizaron a la misma hora del día para reducir la interferencia de los posibles ritmos circadianos. Son bien conocidas las variaciones diarias de

hormonas como la adrenalina, noradrenalina y corticosterona, que indican una periodicidad circadiana en el funcionamiento del eje pituitaria-adrenal, así han sido observadas variaciones diurnas en los contenidos plasmáticos basales de ambas catecolaminas y, además, una variación circadiana de la corticosterona que presenta un pico coincidente con el inicio de la actividad física (162). La aplicación del estrés fue realizada siempre entre las 10.00 y las 12.00 a.m. para evitar, así mismo, los efectos circadianos. Relacionado con esto son conocidas las diferencias de actividad de los animales según el ciclo de luz, siendo la actividad diurna menor en el caso de los roedores. La simple reversión en los ritmos de actividad del comportamiento, producida por la aplicación diurna del estrés, ya actúa como estresante (163) y, así, existen datos que indican tanto la mayor incidencia de úlceras en ratas sometidas a inmovilización nocturna, es decir, cuando su actividad es mayor (164) como la existencia de mayores efectos derivados de la aplicación del estrés por la mañana en lugar de la tarde (165).

Otra de las variables que se deben tener en cuenta en los modelos de estrés es la raza utilizada, ya que existen predisposiciones genéticas que controlan una respuesta determinada. Por ello nosotros hemos circunscrito nuestro trabajo a una raza murina muy utilizada en estudios inmunológicos, la C57BL/6.

También se debe señalar que la edad es un factor importante en la producción de cambios en la función endocrina que pueden alterar la respuesta del sistema inmune al estrés (166), así como la existencia

de involución tímica con la edad; para evitar en lo posible todo esto los estudios se realizaron en adultos jóvenes (entre 5 y 7 semanas de edad).

Finalmente, se debe tener en cuenta la importancia del sexo como variable en los estudios de estrés, ya que existe una respuesta diferencial al estrés según el sexo. Numerosas observaciones apoyan la existencia de esta respuesta dependiente del sexo, así los roedores hembras presentan mayores niveles de inmunoglobulinas que los machos (62) y además, poseen adrenales más grandes y más elevados y variables niveles de corticosterona (28). También el timo presenta en las hembras un peso superior (65) y, asimismo, es bien conocido el hecho de que hormonas como glucocorticoides y progesterona son sexodependientes (167). Por todo esto, nosotros hemos realizado este estudio utilizando únicamente ratones machos de la raza C57BL/6.

La unión a la aglutinina de cacahuete (PNA) ha sido considerada como marcador de inmadurez para timocitos de rata y ratón e incluso humanos, y ha sido utilizado como método adecuado para la separación de subpoblaciones linfoides tímicas, ya que más del 95% de los timocitos aglutinados son inmaduros, mostrando un fenotipo TL⁺, Lyt 1⁺2⁺3⁺, mientras que la fracción no aglutinada, que es más heterogénea, presenta mayormente los fenotipos más diferenciados TL⁻, Lyt 1⁻2⁺3⁺ (12%) y TL⁻, Lyt 1⁺2⁻3⁻ (60%), comúnmente maduras circulantes, a pesar de contener un 10-20% de células maduras (84, 134, 150).

V.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE TRES AGENTES ESTRESANTES SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.

Nuestros resultados indican que todos los parámetros estudiados resultan afectados por los tres tipos de estresantes aunque con diferentes signos e intensidad dependiendo del estresante utilizado.

Encontramos que el estrés de inmovilización es el único que correlaciona sus respuestas con los efectos apuntados por Selye: involución del timo y del bazo, disminución del peso corporal, incremento en el peso de las glándulas adrenales y altos niveles de corticosterona en plasma. Estas consecuencias fisiológicas, mediadas por el estrés, tienen efectos adversos en elementos importantes del sistema inmunológico, que pueden dar lugar a situaciones de inmunocompetencia en procesos cancerosos, infecciones víricas y otras enfermedades bajo control inmunológico (148). Durante este tipo de estrés se produce un descenso significativo del incremento del peso corporal con respecto al control, no relacionado según otros autores con una menor ingestión de comida (168), indicando que afecta a la razón de crecimiento del individuo. Por otra parte, el aumento de hasta ocho veces del nivel de corticosterona en plasma, que es un importante marcador de situaciones de estrés, va acompañado de hipertrofia adrenal.

La natación forzada es el agente estresante con menor influencia en los parámetros estudiados; produce efectos en la misma dirección

que el estrés de inmovilización pero que únicamente resultan significativos con respecto al control en el incremento del peso corporal y sobre todo en el nivel de corticosterona en plasma (que se ve aumentado hasta 5 veces). Esto puede ser debido a dos factores: uno de ellos es la capacidad de control del agente estresante por el individuo que puede influir en los distintos parámetros metabólicos (169), la posibilidad de movimiento y respuesta en el estrés de natación con respecto al de inmovilización podría influir en la mayor respuesta observada en este último tipo de estrés. El otro factor puede ser la duración del estrés, diferente según el agente estresante utilizado y que determina la intensidad de la respuesta (42, 48), y que en el caso del estrés de natación es de cinco minutos frente a los 90 minutos del estrés de inmovilización.

El estrés de frío no muestra la típica respuesta de estrés ya que induce un incremento de peso de las glándulas linfoides estudiadas, al contrario que los otros dos agentes estresantes utilizados. Este aumento del peso de las glándulas va acompañado de un incremento en el número de linfocitos con respecto al control, que podría producir una inmunopotenciación que explicaría los resultados de Burchfield y colaboradores (27) sobre la disminución del tamaño de tumores virales en ratas sometidas a estrés de frío. Estos resultados no parecen relacionar el aumento de corticosterona (hasta cuatro veces el valor del control) con la involución tímica. El incremento de corticosterona podría ser explicado como una respuesta emocional o neurogénica a un ambiente novedoso y desagradable más que una respuesta al frío en sí mismo, ya que individuos sometidos a frío, en los que se ha eliminado

el componente emocional, muestran inhibición de la secreción de corticosteroides adrenales (170).

La aplicación de los tres tipos de estrés de forma aguda, es decir una exposición frente a las 14 del estrés crónico, (datos no mostrados) no revela diferencias significativas con respecto al control en los parámetros estudiados, excepto en los niveles de corticosterona, que alcanzan valores semejantes a los obtenidos en el estrés crónico, lo que parece indicar que se requiere una exposición continuada para producir efectos depresores en el sistema inmune, pero no para una estimulación adrenocortical.

También hemos encontrado que los cambios inducidos en el peso del timo por los distintos agentes estresantes están relacionados con variaciones en el número de timocitos inmaduros (PNA⁺) mientras que el número de timocitos maduros (PNA⁻) se mantiene constante. Estos resultados indican que el mecanismo sugerido por Hall y colaboradores (72) no tiene lugar. Este mecanismo postula que las hormonas tímicas contrarrestan los efectos inmunosupresores de los corticosteroides bloqueando la unión del esteroide a su receptor y convirtiendo linfocitos esteroide-sensibles en linfocitos esteroide-resistentes, lo que tendría que reflejarse en un incremento del número de células maduras.

La involución tímica y la linfocitopenia provocada por la aplicación de algunos agentes estresantes como el de inmovilización podría ser explicada al menos mediante tres posibles mecanismos:

disminución de la migración de células precursoras linfoides desde los tejidos linfopoyéticos al timo (96, 122), aumento de la emigración de los timocitos desde el timo a la circulación y otros órganos linfoides (92, 144) y muerte celular en la glándula tímica (78, 82). Aunque tradicionalmente la teoría más aceptada ha sido la muerte celular, producida a través de la degradación del DNA por altos niveles de corticosteroides, existen otras teorías que se deben tener en cuenta, por ello hemos intentado estudiar y eliminar, si se pudiese, alguna de estas posibilidades.

V.2.- EFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE EL DNA DE TIMOCITOS MURINOS.

La involución tímica y la desaparición de pequeños timocitos corticales (inmaduros) han sido asociadas, durante mucho tiempo, con la elevación de los corticosteroides adrenales (28), y el hecho de que los timocitos inmaduros, afectados por el estrés, sean sensibles a la corticosterona parece indicar un efecto de los altos niveles de corticosterona alcanzados durante el estrés sobre estos timocitos. Así, apoyando la teoría de muerte celular existen datos, obtenidos por diversos autores, que indican la degradación de proteínas, RNA y DNA de linfocitos de rata, por inyección de corticosteroides exógenos (80-82). El DNA era degradado mediante la producción de cortes en lugares internucleosomales que generan un conjunto de fragmentos de DNA de bajo peso molecular. Estas degradaciones constituirían una de las fases del proceso endógeno suicida provocado por la actividad

linfocitolítica de los glucocorticoides (78, 79).

Sin embargo, el análisis del DNA de timocitos de ratones C57BL/6, sometidos a estrés de inmovilización, que era el que producía efectos más intensos y unos mayores niveles de corticosterona en plasma, no revela señal alguna de degradación apareciendo el DNA como una única especie de alto peso molecular en el análisis electroforético, y esto tanto en timocitos totales como en subpoblaciones maduras e inmaduras. Así pues, los niveles de corticosterona alcanzados durante el estrés, parecen no ser suficientes para producir la degradación del DNA, aunque la muerte celular podría producirse por alguna otra causa. Esta última idea está sostenida por observaciones como la presencia de atrofia tímica y desaparición de células corticales no abolidas por adrenalectomía (171) o los datos obtenidos por McPhee y colaboradores (121) indicando que la lisis de células corticales por exposición sistemática a glucocorticoides no dependía de éstos, pues continuaba en animales adrenalectomizados.

V.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA Y LA APLICACION DEL ESTRES DE INMOVILIZACION SOBRE DIFERENTES PARAMETROS.

Con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos implicados en la modulación del sistema inmune por el estrés, realizamos experiencias de aplicación de estrés de inmovilización en animales adrenalectomizados y, así, poder observar los efectos que la ausencia de corticosteroides produce en el sistema inmune del animal

. estresado.

En los resultados expuestos anteriormente encontramos que todos los parámetros estudiados resultan afectados por el estrés de inmovilización y la adrenalectomía. Los efectos en timo, bazo e incremento del peso corporal siguen la misma dirección que los observados en ratones estresados y no adrenalectomizados. El estrés de inmovilización produce un descenso significativo del incremento del peso corporal en animales adrenalectomizados, que es del mismo orden que el observado en animales sin operar y sometidos a inmovilización. Asimismo, los grupos control adrenalectomizado y falsamente adrenalectomizado presentan un descenso, aunque menor, en el peso corporal con respecto al control, que puede ser explicado por los efectos derivados del estrés quirúrgico (44, 47, 55, 57). En cuanto a los dos órganos linfoides, timo y bazo, la ausencia de cápsulas suprarrenales no evita la involución tímica provocada por el estrés, que además es del mismo orden que la observada en presencia de adrenales. Los grupos controles sometidos a cirugía no presentaban efectos depresores en los dos órganos linfoides estudiados, quizá debido a los efectos agudos del estrés quirúrgico y al tiempo transcurrido desde la operación, necesitándose una exposición más continuada para inducir la involución. Es de destacar el mayor nivel de corticosterona en plasma encontrado en animales falsamente adrenalectomizados con respecto al control no operado, posiblemente derivado del estrés quirúrgico pero que no va acompañado de hipertrofia adrenal. Este último dato es coincidente con los obtenidos por otros autores en individuos sujetos a estrés de hacinamiento

La disminución en el peso del timo, está acompañada por una disminución en el número de linfocitos T, que afecta tanto a la subpoblación madura como a la inmadura, aunque las diferencias en el número total de células se deben mayormente a los timocitos inmaduros.

La ausencia de involución tímica en animales sometidos a estrés de frío (que sin embargo presentan altos niveles de corticosteroides), el análisis del DNA de alto peso molecular de timocitos de ratones estresados y los resultados obtenidos en animales adrenalectomizados sometidos a estrés, indican que la corticosterona parece no estar implicada en el proceso de involución tímica ligado al estrés, sugiriendo que puede existir algún otro agente distinto que sea responsable de estas involuciones, lo que es de gran importancia al ser el timo fundamental en la inmunocapacitación del individuo.

Otros datos como la supresión de la estimulación de linfocitos por mitógenos, inducida por el estrés, independientemente de la existencia de cápsulas (93) apoyan la participación de mecanismos independientes de los corticosteroides adrenales en la modulación de la inmunidad por el estrés. La regeneración del timo en animales viejos orquidectomizados, incluso utilizando tratamientos con corticosterona, indica que el córtex adrenal no parece desempeñar un papel fundamental e introduce una posible función de las gónadas, en especial los testículos (64-66). Además, es bien conocida la atrofia tímica producida por esteroides gonadales (67). Otras alteraciones hormonales

adicionales podrían explicar los efectos del estrés en el sistema inmune.

Ante estos resultados nos propusimos estudiar la posible participación de otros mecanismos, independientes de los corticosteroides, en la involución tímica producida bajo condiciones estresantes.

V.4.- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS DE INMOVILIZACIÓN SOBRE LA MIGRACION DE CELULAS PRECURSORAS AL TIMO.

Es bien conocida la importancia del proceso de migración en el desarrollo de la inmunocompetencia y capacitación de los linfocitos T en el timo. La alteración de los patrones de migración podría ser, por tanto, fundamental en la explicación de los efectos que ejerce el estrés en el sistema inmune. Esta migración de células precursoras es una respuesta quimiotáctica a ciertos factores tímicos que orientan esta migración e inducen comportamientos celulares invasivos. Los factores quimiotácticos, que hemos utilizado en los ensayos de migración, proceden de sobrenadantes de cultivos de timo de ratones recién nacidos o adultos, estresados y controles, y presentan una actividad quimiotáctica específica que ha sido probada previamente por otros autores (105, 146), que, además, lo han purificado parcialmente (105), concluyendo que el factor activo es un pequeño péptido con un peso molecular menor de 10.000 daltons.

V.4.1.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de neonatos.

Los ensayos de migración realizados confirman que la migración hacia los factores quimiotácticos tímicos es un proceso quimiotáctico, es decir un desplazamiento orientado gracias a una sustancia quimiotáctica, pues difiere significativamente de la quimiocinesis o movimiento no específico y no direccional hacia el medio Iscove y esto, tanto para células de ratones estresados como controles. Aunque las células de médula ósea de ratones estresados presentan una migración no específica menor que los controles, ésta no resulta significativa. El estrés de inmovilización induce una disminución del número de células precursoras de médula ósea que migran específicamente frente al factor quimiotáctico (130.57 frente a 51.63 x 10⁻³ células) con respecto a las células de individuos control. Esta disminución puede explicar ese 50% de involución tímica presente en ratones estresados (173.0 frente a 61.70 x 10⁻⁶ células). Cuando los datos se presentan en porcentaje de migración, la reducción de la migración con el estrés se eleva hasta aproximadamente cuatro veces (de 9.16% a 2.35%), pues se ha restado la migración no específica, que en individuos estresados es menor aunque no resulta una disminución significativa con respecto al grupo control.

La inhibición de la migración bajo condiciones de estrés puede deberse a que los factores quimiotácticos disminuyan su actividad o su producción o a que las células precursoras estén alteradas o presenten

alteraciones en su sistema de reconocimiento. Los resultados obtenidos utilizando factores quimiotácticos de neonatos indican que esta inhibición es célula-asociada, pues los mismos factores quimiotácticos han sido usados en todos los experimentos. Podría ser que el sistema de reconocimiento inherente a la propia célula estuviese afectado, lo que estaría apoyado por los datos obtenidos por Haar y colaboradores (146) sobre la capacidad migratoria disminuída de células de médula ósea de ratones "motheaten" en respuesta a sobrenadantes tímicos. Estos ratones inmunodeficientes presentan una involución tímica prematura, que no se debe a una actividad defectiva de los factores, ya que los sobrenadantes tímicos "motheaten" son quimioattractivos para células normales, sino más bien está relacionada con la incapacidad de esas células de responder a las señales del timo, a lo que hay que añadir el hecho de que los timos "motheaten" pueden ser repoblados por células de donadores normales y no por células "motheaten".

V.4.2.- Efecto del estrés sobre la migración "in vitro" de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones adultos estresados y controles.

Para profundizar más sobre el tema hemos estudiado el efecto del estrés de inmovilización sobre los factores quimiotácticos y su capacidad de inducir la migración, intentando dilucidar si esta inhibición de la migración es debida a alteraciones de los factores quimiotácticos, para ello se realizaron experimentos de migración utilizando factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes de

cultivos de timo de ratones adultos estresados y controles, a una concentración de 1.25 ml. de medio por timo. Cuando se utiliza un factor quimiotáctico tímico control se observa una disminución significativa (11.2%) en el número de células migradoras de ratones estresados frente a células control, que aunque no alcanza el valor observado en respuesta a factores procedentes de neonatos (60.4% de disminución) apoya la idea de inhibición célula-asociada. Los datos expresados como porcentaje de migración siguen el mismo patrón de variación que se observa en el número de células. Hay una disminución significativa del porcentaje de células estresadas que migran frente a factor control con respecto a células control (5.24% frente a 6.68%) pero que no alcanza la disminución observada frente a factores quimiotácticos de neonatos. Sin embargo, aparentemente parece que estos factores están afectados pues la capacidad migratoria de las células control y estrés decrece significativamente frente a la utilización de un factor quimiotáctico tímico de ratones control. Esto podría ser debido a una menor actividad quimiotáctica o a una menor producción del factor por timos estresados. No obstante debemos apuntar que esta aparente menor actividad del factor quimiotáctico estresado posiblemente se debe a la menor concentración de éste con respecto al control, ya que la misma cantidad de medio fue utilizada en el cultivo (1.25 ml/timo) y se debe tener en cuenta que los timos estresados presentan aproximadamente la mitad del peso y del número de células que los timos control (42.50 mg. y 61.7×10^{-6} células en estresados frente a 74.84 mg. y 173×10^{-6} células en controles).

Para comprobar si esta inhibición era debida a la presencia de un

menor número de células en el timo estresado, hemos obtenido factores quimiotácticos a partir de sobrenadantes procedentes de cultivos de timos estresados, donde la cantidad de medio utilizado en el cultivo se calcula a partir del peso del timo (teniendo como referencia 1 timo control/1.25 ml. de medio) y hemos encontrado que la respuesta migratoria de células de médula ósea control y estresada, frente a estos factores quimiotácticos procedentes de sobrenadantes tímicos de ratones estresados, es diferente. Mientras que el número de células de médula ósea control migradas es de 90.79×10^{-3} células, del mismo orden que frente a un factor quimiotáctico control (90.41×10^{-3} células, apartado IV.4.2), la médula ósea estresada presenta una respuesta significativamente menor que la médula control frente a estos mismos factores estresados (50.59×10^{-3} células). En los datos expresados como porcentaje, se observa esta misma disminución de las células estresadas con respecto a las células control (2.3% frente a 6.37%) y, además, que el porcentaje de migración de las células de médula ósea control frente a este factor estresado (6.37%) es del mismo orden que frente a un factor control (6.68%, apartado IV.4.2).

Finalmente se observa una disminución del número de células migradoras frente a factores quimiotácticos tímicos de ratones adultos control (90.41×10^{-3}) en comparación con los factores de neonatos (130.57×10^{-3}), lo que parece razonable dada la necesidad de una mayor actividad quimiotáctica durante el período fetal y en el momento del nacimiento para poblar el timo (102). Esta disminución de la migración también es observada en porcentaje de migración (6.68% frente al 9.16% encontrado con factor quimiotáctico de neonatos).

Por otro lado y en relación con el estudio de los cambios en los patrones de migración, se ha postulado el papel de los factores tímicos en la alteración de estos patrones. Apoyando esto, existen datos observados por algunos autores como Skotnoski (112) sobre el incremento en la producción del factor inhibidor de la migración por linfocitos periféricos, debido a hormonas tímicas. Así, variaciones de estas hormonas como la fracción 5 de timosina o α_1 por el estrés podrían regular estos patrones de migración. Monokinas e IL-1 inhiben y aumentan respectivamente la migración de linfocitos humanos (147) y factores tímicos afectan indirectamente a la hemopoyesis (112). Relacionado con esto, la realización de estudios sobre la producción de mRNA y péptidos de timocitos y células epiteliales tímicas bajo condiciones de estrés puede ser interesante para profundizar en el papel de estos factores en la migración y capacitación de los linfocitos T. La involución tímica podría deberse a una regulación génica que afectaría a la síntesis de determinados péptidos, siendo probablemente las hormonas tímicas las más afectadas por su participación en la maduración de los linfocitos T.

Inciendo en este tema, a pesar de los datos que indican la presencia de involución tímica en animales adrenalectomizados sometidos a estrés y el aumento del peso tímico en presencia de altos niveles de corticosterona en animales sujetos a estrés de frío, algunos autores han puesto de manifiesto la importancia de los glucocorticoides en la inhibición de la migración, a través de la disminución del número de células repobladoras del timo a partir de la

médula ósea (122). Otros datos implican a los glucocorticoides como inhibidores de migración de linfocitos T esplénicos y periféricos (97), independientemente de la lisis celular, aunque otros procesos moleculares o subcelulares como receptores de superficie, actividad esterasa, niveles de nucleótidos cíclicos, ensamblaje de microtúbulos o actividad de los microfilamentos podrían estar implicados (97). Además, según Khaitov y colaboradores (96) la eliminación de la función adrenal resulta en un incremento de la migración de las células precursoras desde la médula ósea a la sangre y de ahí al bazo. Parece que el eje hipófiso-adrenal controla al menos en parte esta migración, pues se ha comprobado que el estrés y la inyección de ACTH inhiben la migración (96) y contrariamente las catecolaminas la inducen, pudiendo producir una redistribución de los tipos celulares que resulta en una supresión de la respuesta a mitógenos (43).

Por último y para finalizar con este complejo tema se debe notar que algunos autores (145) achacan la involución tímica observada en situaciones de embarazo, postparto, infecciones y tumores a otras causas como la migración de linfocitos desde el timo a órganos periféricos, como el bazo, elevándose el porcentaje de migración normal desde el timo. La disminución del número de células linfoides en sangre no explicaría esta mayor liberación a la circulación, aunque algunos autores lo justifican por la adquisición de una vida media corta (98). Esta redistribución es explicada por Cohen y Crnic (172) como una circulación y secuestro de los linfocitos desde la sangre a tejidos como médula ósea.

**V.5.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRES SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS
MARCADORAS DE LA MADURACION DE LOS LINFOCITOS T.**

En la parte final de este trabajo hemos intentado profundizar en el estudio de la actividad de ciertas enzimas consideradas como marcadoras de distintos estados de maduración linfoide. Aunque los patrones de maduración de los linfocitos no están totalmente clarificados, es bien conocido que el proceso de maduración de los linfocitos T va asociado a variaciones de los niveles de actividad de algunas enzimas que pueden utilizarse para la identificación de subpoblaciones típicas, la estimación de su grado de diferenciación o como marcadoras de ciertas inmunopatologías (173). Entre estas enzimas, la 5'-NT y las glucidasas, NABG y BG, se caracterizan por elevar su actividad en el paso de linfocitos inmaduros a maduros (137, 138).

El recambio de algunas proteínas, así como el nivel de actividad de diversas enzimas, es modificado por el estrés, quizá por el aumento de corticosteroides. Apoyando esta afirmación existen datos experimentales como el descenso de la actividad de la ornitina descarboxilasa en el timo y el aumento en el hígado tras la inyección de dexametasona (174). Asimismo, Gagnon y colaboradores (140) han observado el incremento de la síntesis proteica y de algunos mensajeros que codifican para proteínas miofibrilares después de estrés de inmovilización. Otros autores (98) han encontrado una disminución de la síntesis proteica en el timo por esteroides. Sin embargo, no se conoce si el proceso de maduración de los linfocitos T

en el timo tiene lugar bajo condiciones de estrés, ya sea de forma normal o modificada, dando lugar a variaciones de los niveles de actividad de ciertas enzimas marcadoras.

Nuestros resultados indican que las cuatro enzimas estudiadas 5'-NT, NABG, BG y SE, presentan niveles de actividad diferentes en las subpoblaciones tímicas PNA⁺ y PNA⁻. Estos valores obtenidos son compatibles con trabajos anteriores y corroboran el patrón de evolución ya caracterizado, que indica un incremento de actividad con la madurez (137, 138 y 175). La enzima 5'-NT duplica sus niveles de actividad de células inmaduras (32.08 y 30 mU/10⁶ células en controles y estresados respectivamente) a maduras (54.6 y 47.5 mU/10⁶ células también en controles y estresados). La actividad NABG incrementa entre cuatro y cinco veces con la madurez (de 2.69 y 3.22 mU/10⁶ células en PNA⁺ hasta 14.14 y 13.44 mU/10⁶ células en PNA⁻, en controles y estresados respectivamente). La otra glucidasa, BG, presenta unos niveles de cuatro a seis veces mayores en células maduras que en células inmaduras (de 6.75 y 8.41 hasta 40.26 y 33.84 U/10⁶ células, también en controles y estresados). Finalmente, la enzima SE, que es característica de células citotóxicas y NK y presenta una baja actividad en timocitos de ratón (139), ha sido relacionada recientemente con la capacitación inmunológica y considerada también como marcadora de diferentes estados de diferenciación (175). Los valores expuestos en este trabajo coinciden con la baja actividad esperada e indican la existencia de variados niveles de actividad en las subpoblaciones tímicas, con una actividad duplicada en células maduras (0.1186 y 0.1258 U/2 x 10⁷ células frente a 0.0655 y 0.0571

Por su actividad de la NABG y BG

h
moduliz

U/2 x 10⁷ células en la población inmadura).

La variabilidad en los patrones enzimáticos entre PNA⁺ y PNA⁻ ha sido explicado parcialmente por algunos autores (173) por la diferente cantidad de células en división en ambas fracciones, ya que el grupo positivo contiene más células mitóticas que el negativo.

Por otro lado y dentro de la parte objeto de nuestro estudio, los datos indican que no hay diferencias significativas entre los timocitos de ratones estresados y controles en todas las actividades enzimáticas estudiadas y en células PNA⁺ y PNA⁻. A falta de más datos, esto parece indicar que en caso de que se produzca la maduración durante el estrés, esta debería ser normal, ya que el aumento de actividad de las enzimas durante el proceso de maduración se produce tanto en individuos estresados como en controles. Si el estrés interrumpiese de alguna forma el proceso de maduración, y puesto que el número de timocitos maduros no varía (apartado IV.1.6 de resultados) indicaría una interrupción en la salida de células tímicas maduras a la sangre, manteniéndose en el timo y no alterando sus niveles de actividad enzimática. Esto parece bastante improbable; posiblemente en condiciones de estrés el proceso de maduración permanece inalterado (niveles enzimáticos similares) y los linfocitos maduros siguen el patrón normal de circulación a la sangre (el mismo número de células maduras en condiciones de estrés), mientras que se interrumpe la llegada de células precursoras al timo (inhibición de la migración de células de médula bajo condiciones de estrés).

VI CONCLUSIONES

De los resultados presentados en este trabajo se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1.- Del estudio comparativo del efecto de la aplicación de tres agentes estresantes sobre diferentes parámetros se deduce que:

- a) Los tres tipos de estresantes utilizados: inmovilización, frío y natación forzada no actúan en el mismo sentido sobre los parámetros estudiados. Los efectos más drásticos son producidos por el estrés de inmovilización.
- b) El estrés de inmovilización disminuye el incremento del peso corporal, aumenta el peso de las cápsulas suprarrenales y los niveles de corticosterona en plasma (más de ocho veces) y disminuye el peso de los órganos linfoides estudiados, bazo y timo, acompañado de un descenso del número total de timocitos.
- c) El estrés de natación forzada es el agente con menor influencia sobre los parámetros estudiados; únicamente produce descenso significativo del incremento del peso corporal, aumenta cinco veces el nivel de corticosterona en plasma y disminuye el número total de timocitos. Los cambios producidos en el resto de los parámetros no resultan significativos.
- d) El estrés de frío no produce una respuesta característica de estrés, induce incremento del peso del timo y bazo, así como del número de timocitos totales, disminuye el peso corporal y aumenta el nivel de corticosterona en plasma. El aumento del peso de las cápsulas suprarrenales no resulta significativo.

e) Los cambios producidos en el peso del timo debido a la aplicación de agentes estresantes se correlacionan con aumento o descenso del número de timocitos inmaduros (PNA⁺), mientras que el número de maduros (PNA⁻) permanece constante.

2.- Del estudio del efecto del estrés de inmovilización sobre el DNA de timocitos murinos se deduce que:

a) El DNA de timocitos (totales, PNA⁺ y PNA⁻) estresados por inmovilización crónica y aguda sometido a análisis electroforético no revela señales de degradación.

3.- Del estudio del efecto de la adrenalectomía y la aplicación del estrés de inmovilización sobre diferentes parámetros se deduce que:

a) El estrés de inmovilización en ausencia de cápsulas suprarrenales provoca variaciones de los parámetros estudiados en la misma dirección que las observadas en presencia de glándulas adrenales, produciendo disminución del incremento del peso corporal e involución de timo y bazo.

b) La involución tímica que se produce está relacionada con una disminución en el número de linfocitos T, que parece influir tanto en subpoblaciones maduras como inmaduras.

c) La ausencia de cápsulas adrenales no evita la involución tímica provocada por el estrés. La corticosterona ^{no} parece ~~no~~ ser la causa principal del proceso de involución tímica ligada al estrés.

4.- Del estudio de los efectos del estrés de inmovilización sobre la migración de células precursoras al timo se deduce que:

- a) El estrés de inmovilización disminuye, aproximadamente cuatro veces, la migración de células precursoras de médula ósea frente a factores quimiotácticos de neonatos.
- b) El estrés de inmovilización disminuye la migración de células de médula ósea frente a factores quimiotácticos de ratones adultos, pero sin alcanzar el valor observado frente a factores de neonatos.
- c) El estrés de inmovilización parece no afectar la actividad de los factores quimiotácticos tímicos, ya que las células de médula ósea control presentan una migración similar tanto frente a factores de adultos controles como estresados.
- d) En las condiciones utilizadas, el estrés parece afectar la capacidad migratoria de las células. La inhibición de la migración parece ser célula-asociada.
- e) La inhibición de la migración de células precursoras de médula ósea al timo bajo condiciones de estrés podría explicar la involución tímica observada en las mismas condiciones.

5.- Del estudio de la actividad de enzimas marcadoras de la maduración de los linfocitos T bajo condiciones de estrés se deduce que:

- a) Las cuatro enzimas estudiadas 5'-NT, NABG, BG y SE presentan variaciones de su actividad en las distintas subpoblaciones

tímicas siguiendo todas ellas el mismo patrón de evolución que incrementa con la madurez.

- b) Las actividades enzimáticas estudiadas no presentan variaciones entre los timocitos de ratones estresados y controles, tanto en células PNA⁺ como PNA⁻.
- c) Los niveles inalterados de actividad enzimática de estas enzimas marcadoras bajo condiciones de estrés parecen indicar el mantenimiento del proceso de maduración tímica en esas condiciones.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cannon, W.B. (1935). Stress and strains of homeostasis. Am. J. Med. Sci., 189: 1.
- 2.- Cannon, W.B. (1914). The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. Am. J. Physiol., 33: 356.
- 3.- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, 138: 32.
- 4.- Selye, H. (1937). The significance of the adrenals for adaptation. Science, 85: 247.
- 5.- Selye, H. (1936). The thymus and the adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. Br. J. Exp. Pathol., 17: 234.
- 6.- Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. Can. med. Ass. J., 115: 53.
- 7.- Mason, J.W. (1971). A reevaluation of the concept of nonspecificity in stress theory. J. Psychiatr. Res., 8: 323.
- 8.- Dimsdale, J.W. y Moss, J. (1980). Plasma catecholamine in stress and exercise. JAMA, 243: 340.
- 9.- Mason, J.W. (1968). A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenocortical system. Psychosom. med., 30: 576.
- 10.- Henry, J.P. (1980). Present concept of stress theory. En: Catecholamine and stress. Recent advances. Usdin, E.; Kvetnansky, R. y Kopin, I.J. (ed.). Elsevier North Holland, p. 557.
- 11.- Vogel, W.H. (1985). Coping, stress, stressors, and health consequences. Neuropsychobiology, 13: 129.
- 12.- Laudenslager, M.L.; Ryan, S.M.; Drugan, R.C.; Hyson, R.L. y Maier, S.F. (1983). Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. Science, 221: 568.
- 13.- Visintainer, M.A.; Volpicelli, J.R. y Seligman, M.E.P. (1982). Tumor rejection in rats after inescapable or escapable shock. Science, 216: 437.
- 14.- Weiss, J.M. (1968). Effects of coping responses on stress. J. Comp. Physiol. Psychol., 65: 251.
- 15.- Rabkin, J.G. y Struening, E.L. (1976). Life event, stress and illness. Science, 194: 1013.

- 16.- Weiss, J.M. (1968). Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosom. Med.*, 32: 397.
- 17.- Holden, C. (1980). Behavioral medicine: an emergent field. *Science*, 209: 479.
- 18.- Justice, A. (1985). A review of the effect of stress on cancer in laboratory animals: Importance of time of stress application and type of tumor. *Psychol. Bull.*, 98: 108.
- 19.- Vigas, M. (1980). Contribution to the understanding of the stress concept. En: Catecholamines and stress. Recent advances. Usdin, E.; Kvetnansky, R. y Kopin, I.J. (ed.). Elsevier North Holland, p. 573.
- 20.- Sudakov, K.V. (1980). Systems approach to the problem of emotional stress. En: Catecholamines and stress. Recent advances. Usdin, E.; Kvetnansky, R. y Kopin, I.J. (ed.). Elsevier North Holland, p. 579.
- 21.- Ader, R. (1980). Psychosomatic and psychoimmunology research. *Psychosom. med.*, 42: 307.
- 22.- Ewing, J. (1940). Theories on the nature of the cancer. En: Neoplastic diseases. Saunders, P.A. (ed.). Philadelphia, p. 81.
- 23.- Schindler, B.A. (1985). Stress, affective disorders and immune function. *Med. Clin. North Am.* 69: 585.
- 24.- Rasmussen, A.F.Jr. (1969). Emotions and immunity. *Ann. N. J. Acad. Sci.*, 164: 458.
- 25.- Rasmussen, A.F.Jr.; Marsh, J.T. y Brill, N.Q. (1975). Increased susceptibility to Herpes simplex in mice subjected to avoidance-learning stress or restraint. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 96: 183.
- 26.- Solomon, G.F. y Amkraut, A.A. (1981). Psychoneuroendocrinological effects on the immune response. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35: 155.
- 27.- Burchfield, S.R.; Woods, S.C. y Elich, M.S. (1978). Effects of cold stress on tumor growth. *Physiol. Behav.*, 21: 537.
- 28.- Monjan, A.A. (1981). Stress and immunological competence studies in animals. En: Psychoneuroimmunology. Academic Press. New York, p. 185.
- 29.- Plaut, S.M. y Friedman, S.B. (1981). Psychosocial factors in infectious disease. En: Psychoneuroimmunology. Academic Press. New York, p. 3.

- 30.- LaBarba, R.C. (1970). Experiential and environmental factors in cancer: A review of research in animals. *Psychosom. Med.*, 32: 259.
- 31.- Riley, V. (1975). Mouse mammary tumors. Alteration of incidence as apparent function of stress. *Science*, 189: 465.
- 32.- Riley, V. (1979). Cancer and stress: overview and critique. *Cancer Detect. Prevent.*, 2: 163.
- 33.- Jensen, M.M. (1968). The influence of stress on murine leukemia virus infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127: 610.
- 34.- Amkraut, A. y Solomon, G.F. (1972). Stress and murine sarcoma virus (Maloney)-induced tumors. *Cancer Res.*, 32: 1428.
- 35.- Sklar, L.S. y Anisman, H. (1979). Stress and coping factor influence tumor growth. *Science*, 205: 513.
- 36.- Sklar, L.S. y Anisman, H. (1981). Stress and cancer. *Psychol. Bull.*, 89: 369.
- 37.- Miller, N.E. (1985). Effects of emotional disorders and immune function. *Med. Clin. North Am.*, 69: 585.
- 38.- Stein, M.; Schiavi, R.C. y Camerino, M. (1976). Influence of brain and behavior on the immune system. *Science*, 191: 435.
- 39.- Steplewski, Z. y Vogel, W.H. (1986). Total leukocytes, T cell subpopulation and natural killer cell activity in rats exposed to restraint stress. *Life sci.*, 38: 2419.
- 40.- Okimura, T. y Nigo, Y. (1986). Stress and immune responses. I Suppression of T cell function in restraint-stressed mice. *Japan. J. Pharmacol.*, 40: 505.
- 41.- Okimura, T.; Ogawa, M. y Yamauchi, T. (1986). Stress and immune responses. III Effect of restraint stress on delayed type hypersensibility (DTH) response, natural killer activity and phagocytosis in mice. *Japan. J. Pharmacol.*, 41: 229.
- 42.- Keller, S.E.; Jay, M.W.; Schleifer, S.J. y Stein, M. (1981) Suppression of immunity by stress: effect of the graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science*, 223: 1397.
- 43.- Keller, S.E.; Scheleifer, S.J.; Liotta, A.S.; Bond, R.N.; Farhoody, N. y Stein, M. (1988). Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 9297.

- 44.- Mills, F.J. (1985). The endocrinology of stress. *Aviat. Space Environ. Med.*, 56: 642.
- 45.- Frankenhauser, M. y Rissler, A. (1970). Effects of punishment on catecholamine release and efficiency of performance. *Psychopharmacologia*, 17: 378.
- 46.- Dunn, A.J. (1988) Stress-related changes in cerebral catecholamine and indoleamine metabolism: lack of effect of adrenalectomy and corticosterone. *J. Neurochem.*, 51: 406.
- 47.- Estep, H.L.; Island, D.P.; Ney, R.L. y Liddle, G.W. (1963). Pituitary-adrenal dynamics during surgical stress. *J. Clin. Endocrinol.*, 23: 419.
- 48.- Armario, A.; Montero, J.L. y Balasch, J. (1986). Sensitivity of corticosterone and some variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol. Behav.*, 37: 559.
- 49.- Grossmann, A.; Nieuwenhuysen-Kruseman, A.C.; Perry, L.; Tomlin, S.; Schally, A.V.; Coy, D.H.; Rees, L.H.; Comaru-Schally, A.M. y Besser, G.M. (1982). New hypothalamic hormone, corticotropin-releasing factor, specifically stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in man. *Lancet*, 1: 921.
- 50.- Loh, H.H.; Tseng, L.F.; Wei, E.; Li, Ch. (1976). Beta-endorphin is a potent analgesic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 2895.
- 51.- Ling, N.; Burgus, R.; Guillermin, R. (1976). Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 3942.
- 52.- Brown, G.M. y Reichlin, S. (1972). Psychologic and neural regulation of growth hormone secretion. *Psychosom. Med.*, 34: 45.
- 53.- Brown, W.A. y Heninger, G. (1976). Stress-induced growth hormone release: psychological and physiological correlates. *Psychosom. Med.*, 38: 145.
- 54.- Morehead, M. y Gala, R.R. (1987). Restraint stress depresses prolactin surges in pseudopregnant rats and adrenalectomy does not alter the response. *Life Sci.*, 41: 1491.
- 55.- Charters, A.C.; Odell, W.D. y Thompson, J.C. (1969). Anterior pituitary function during surgical stress and coalescence. Radioimmunoassay measurement of blood TSH, LH, FSH and GH. *J. Clin. Endocrinol.*, 29: 63.

- 56.- Otuski, M.; Dakoda, M. y Baba, S. (1973). Influence of glucocorticoids on TRF-induced TSH response in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36: 95.
- 57.- Moran, W.H.; Miltenberger, F.W.; Shu'ayb, W.A. y Zimmerman, B. (1964). The relationship of antidiuretic hormone secretion to surgical stress. *Surgery*, 56: 99.
- 58.- Weingartner, H.; Gold, P.; Ballenger, J.C.; Smallberg, S.A.; Summers, R.; Rubinow, D.R.; Post, R.M. y Goodwin, F.K. (1981). Effects of vasopressin on human memory function. *Science*, 211: 601.
- 59.- Beden, S.N. y Brain, P.F. (1985). Effects of combined castration and adrenalectomy and a variety of stressors on thymic and spleen weights and the primary immune response in mice. *IRCS Med. Sci.*, 12: 416.
- 60.- Kamel, F. y Kubajak, C.L. (1987). Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: Interactions with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology*, 21: 561.
- 61.- Ward, I.L. (1971). Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*, 175: 82.
- 62.- Grossman, Ch.J. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, 227: 257.
- 63.- Rebar, R.W.; Miyake, A.; Erickson, G.F.; Low, T.L.K. y Goldstein, A.L. (1983). The influence of the thymus gland on reproductive function: a hypothalamic site of action. En: Factors regulating ovarian function. Greenwald, G.S. y Terranova, P.T. (ed.). Raven Press. New York, p. 465.
- 64.- Leceta, J.; Fernández-Galaz, C.; Sánchez, C.; Navarro, R.; Gomariz, R. P.; Zapata, A. y Tejero, A. (1988). Effects of neonatal treatment with estrogens on the development of the thymus in rats. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 375.
- 65.- Greenstein, B.D.; Fitzpatrick, F.T.A.; Adcock, I.M.; Kendall, M.D. y Wheeler, M.J. (1986). Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J. Endocr.*, 110: 417.
- 66.- Fitzpatrick, F.T.A. y Greenstein, B.D. (1987). Effect of various steroids on the thymus, spleen, ventral prostate and seminal vesicles in old orchidectomized rats. *J. Endocr.*, 113: 51.
- 67.- Erbach, G.T. y Bahr, J.M. (1988). Effect of chronic or cyclic exposure to estradiol on the humoral immune response and the thymus. *Immunopharmacology*, 16: 45.

- 68.- Langhoff, E.; Ladefoged, J. y Dickmeiss, E. (1985). The immunosuppressive potency of various steroids on peripheral blood lymphocytes, T cell, NK and K cells. *Int. J. Immunopharmac.*, 7: 483.
- 69.- Ingle, D.J. (1954). Permissibility of hormone action. A review. *Acta Endocrinol. Copenhagen*, 17: 172.
- 70.- Munck, A.; Guyre, P.M. y Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinology*, 5: 25.
- 71.- McGillis, J.; Hall, N.R.; Vahouny, G.V. y Goldstein, A.L. (1985). Thymosin fraction 5 causes increased serum corticosterone in rodents "in vivo". *J. Immunol.*, 134: 3952.
- 72.- Hall, N.R.; McGillis, J.; Spangelo, B.L. y Goldstein, A.L. (1985). Evidence that thymosins and their biologic response modifiers can function as neuroactive immunotransmitters. *J. Immunol.*, 135: 806.
- 73.- Lippman, M.E.; Perry, S. y Thompson, E.B. (1974). Cytoplasmatic glucocorticoid-binding proteins in glucocorticoid-unresponsive human and mouse leukemic cell lines. *Cancer Res.*, 34: 1572.
- 74.- Raneletti, F.O.; Maggiano, N.; Aiello, F.B.; Carbone, A.; Larocca, L.M.; Musiani, P. Y Piantelli, M. (1987). Glucocorticoid receptors and corticosenstivity of human thymocytes at discrete stages of intrathymic differentiation. *J. Immunol.*, 138: 440.
- 75.- Klein, A.; Bessler, H.; Hoogervorst-Spalter, H.; Kaufman, H.; Djaldetti, M. y Joshua, H. (1980). A difference between human B and T lymphocytes regarding their capacity to metabolize cortisol. *J. Steroid Biochem.*, 13: 517.
- 76.- Parker, C.W.; Huber, M.G. y Baumann, M.L. (1973). Alterations of the cyclic AMP metabolism in human bronchial asthma. III Leukocyte and lymphocyte responses to steroids. *J. Clin. Invest.*, 52: 1342.
- 77.- La Pushin, R.W. y De Harven, E. (1971). A study of glucocorticosteroid-induced pyknosis in the thymus and lymph node of the adrenalectomized rat. *J. Cell. Biol.*, 50: 583.
- 78.- Ucker, D.S. (1987). Cytotoxic T lymphocytes and glucocorticoids activate on endogenous process in target cells. *Nature*, 327: 62.
- 79.- Compton, M.M. y Cidlowski, J.A. (1987). Identification of a glucocorticoid-induced nuclease in thymocytes. *J. Biol. Chem.*, 262: 8288.

- 80.- Cidlowski, J.A. (1982). Glucocorticoids stimulate ribonucleic acid degradation in isolated rat thymic lymphocytes "in vitro". *Endocrinology*, 111: 184.
- 81.- MacDonald, R.; Martin, T.P. y Cidlowski, J.A. (1980) Glucocorticoids stimulate protein degradation in lymphocytes: a possible mechanism of steroid-induced cell death. *Endocrinology*, 107: 1512.
- 82.- Compton, M.M. y Cidlowski, J.A. (1986). Rapid "in vivo" effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxiribonucleic acid. *Endocrinology*, 118: 38.
- 83.- Gametchu, B. (1987). Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science*, 236: 456.
- 84.- Dennert, G.; Landon, C. y Nowicki, M. (1988). Cell-mediated and glucocorticoid-mediated target cell lysis do not appear to share common pathways. *J. Immunol.*, 141: 785.
- 85.- Rothenberg, E. y Lugo, J.P. (1985). Differentiation and cell division in the mammalian thymus. *Develop. Biol.*, 112: 1.
- 86.- Gillis, S.; Grabtree, G.R. y Smith, K.A. (1979). Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*, 123: 1624.
- 87.- Sapolsky, R.M. y Donnelly, T.M. (1985). Vulnerability to stress-induced tumor growth increases with age in rats: role of glucocorticoids. *Endocrinology*, 117: 662.
- 88.- Dupont, E. y Wybran, J. (1985). Mechanisms of action of corticosteroids. *Int. J. Immunotherapy*, 1: 135.
- 89.- Cupps, T.R. y Fauci, A.S. (1982). Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.*, 65: 133.
- 90.- Goodwin, J.S.; Atluru, D.; Sierakowski, S. y Lianos, E.A. (1986). Mechanism of action of glucocorticoids. *J. Clin. Invest.*, 77: 1244.
- 91.- Van Zon, A.A.; Termaat, R.; Schetters, T. y Eling, W. (1986). Plasmodium berquei: Reduction of the mouse's specific lymphoproliferative response in relation to corticosterone and pregnancy. *Exp. Parasitol.*, 62: 71.
- 92.- Stein, M.; Keller, S.E. y Schleifer, S.J. (1985). Stress and immunomodulation: the role of depression and neuroendocrine function. *J. Immunol.*, 135: 827.

- 93.- Keller, S.E.; Weiss, J.M.; Miller, N.E. y Stein, M. (1983). Stress-induced supression of immunity in adrenalectomized rats. *Science*, 221; 1301.
- 94.- Davison, T.F. y Misson, B.H. (1987). Effect of corticosterone on antibody responses to a T-dependent and T-independent antigen in domestic fowl. *Med. Sci. Res.*, 15: 967.
- 95.- Beden, S.N. y Brain, P.F. (1984). Effects of ether stress on the primary immune response to sheep red blood cells in intact and adrenalectomized mice. *IRCS Med. Sci.*, 12: 647.
- 96.- Khaitov, R.M.; Petrv, R.V.; Maroz, B.B. y Bezin, G.I. (1975). The factors controlling stem cell recirculation. I Migration of hemopoietic stem cells in adrenalectomized mice. *Blood*, 46: 73.
- 97.- Beer, D.J. y Center, D.M. (1980). "In vitro" corticosteroid modulation of lymphocyte migration. *Cell. Immunol.*, 55: 381.
- 98.- Kelly, F.K. y Goldspink, D.F. (1984). Age-related growth and protein turnover in the thymus of normal and glucocorticoid-treated rats. *Eur. J. Biochem.*, 138: 623.
- 99.- Marx, J.L. (1985). The immune system "belongs in the body". *Science*, 227: 1190.
- 100.- Blalock, J.E. (1984). The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.*, 132: 1067.
- 101.- Owen, J.J.T. y Jenkinson, E.J. (1981). Embriology of the lymphoid system. *Prog. Allergy*, 29: 1.
- 102.- Hemmingsson, E.J. y Alm, G.V. (1973). Migration of hemopoietic cells from the yolk sac to the thymus and bursa of Fabricius in the chick embryo. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 81: 79.
- 103.- Ford, C.E.; Micklen, H.S.; Evans, E.P.; Gray, J.G. y Ogden, D.A. (1966). The inflow of bone marrow cells to the thymus: studies with part-body irradiated mice injected with chromosome-marked bone marrow and subjected to antigenic stimulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 129: 283.
- 104.- Imhof, B.A.; Deugnier, M.; Girault, J.; Champion, S.; Damain, C.; Itoh, T. y Thiery, J.P. (1988). Thymotaxin: a thymic epithelial peptide chemotactic for T-cell precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 7699.
- 105.- Taubenberger, J.K. y Haar, J.L. (1987). The initial characterization of a thymus factor chemotactic to bone marrow cells. *Thymus*, 9: 85.

- 106.- Taubenberger, J. K. y Haar, J.L. (1987). "In vitro" bone marrow cell migration to supernatants prepared from thymic epithelial cell cultures. *Thymus*, 9: 45.
- 107.- Fournier, M. y Potworowski, E.F. (1979). Role of a thymic stromal fraction in the homing of bone marrow precursor cells to the thymus. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 26: 463.
- 108.- Haar, J.L. y Loor, F. (1981). Selective migration of "null" cells towards a thymus factor "in vitro". *Thymus*, 3: 187.
- 109.- Handzel, Z.T.; Pecht, M. y Trainin, N. (1983). Thymic hormones: inducers and regulators of the T-cell system. *Immunol. Today*, 4: 16.
- 110.- Pyke, K.W. y Bach, J.F. (1981). "In vitro" migration of potential hemopoietic precursors from the murine fetus. *Thymus*, 3: 1.
- 111.- Larsen, C.G.; Anderson, A.O.; Appella, E.; Oppenheim, J.J. y Matsushima, K. (1989). The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T Lymphocytes. *Science*, 243: 1464.
- 112.- Skotnicki, A.B. (1989). Thymic hormones and linfokines. *Drugs Today*, 25: 337.
- 113.- Scollay, R. y Shortman, K. (1983). Thymocyte subpopulations on experimental review, including flow cytometric cross-correlations between the major murine thymocyte markers. *Thymus*, 5: 245.
- 114.- Goldstein, G. y Mackay, I.R. (1969). En: The human thymus. William Heinemann Medical Books. Ltd. Londres, p. 31.
- 115.- Grégoire, Ch. (1947). Factors involved in maintaining involution of thymus during suckling. *J. Endocrinol.*, 5: 68.
- 116.- Burnet, M. (1984). En: Immunology. Scientifican American Inc. New York, p.120.
- 117.- Denning, S.M.; Tuck, D.T.; Singer, K.H. y Haynes, B.F. (1987). Human thymic epithelial cells function as accesory cells for autologous mature thymocyte activation. *J. Immunol.*, 138: 680.
- 118.- Metcalf, D. (1964). The thymus and lymphopoiesis. En: The thymus in immunobiology. Good, A.A. y Gabrielsen, A.E. (ed.). Hoeber-Harper. New York, p. 150.
- 119.- Grégoire, Ch. y Ducheteau, Gh. (1956). A study on lympho-epithelial symbiosis in thymus. Reactions of the lymphatic tissue to extracts and to implants of epithelial components of thymus. *Arch. Biol.*, 67: 269.

- 120.- Metcalf, D. (1966). The nature and regulation of lymphopoiesis in the normal and neoplastic thymus. En: Thymus experimental and clinical studies. Wolstenholme, G.E.W. y Porter, R. (ed.). Ciba Found Symp. Churchill. London, p. 242.
- 121.- McPhee, D.; Pye, J. y Shortman, K. (1979). The differentiation of T lymphocytes. V Evidence for intrathymic death of most thymocytes. Thymus, 1: 151.
- 122.- Baker, B.L.; Ingle, D.J. y Li, C.H. (1951). Histology of lymphoid organs of rat treated with adrenocorticotropin. Am. J. Anat. 88: 313.
- 123.- Crabtree, G.R. (1989). Contingent genetic regulatory events in the lymphocyte activation. Science, 243: 355.
- 124.- Chen, S.S.; Tung, J.S.; Gillis, S.; Good, R.A. y Hadden, J.W. (1983). Changes in surface antigens of immature thymocytes under the influence of T-cell growth factors and thymic factors. Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 5980.
- 125.- Zatz, M.M. y Goldstein, A.L. (1985). Mechanism of action of thymosin. I Thymosin fraction 5 increases lymphokine production by mature murine T cells responding in a mixed lymphocyte reaction. J. Immunol., 134: 1032.
- 126.- Wijngaert, F.P.V.; Rademakers, L.H.P.M.; Schuurman, H.J.; Weger, R.A. y Kater. L. (1983). Identification and "in situ" localization of the "thymic nurse cell" in man. J. Immunol., 130: 2348.
- 127.- Michie, S.A.; Kirkpatrick. E.A. y Rouse, R.V. (1988). Rare peripheral T cells migrate to and persist in normal mouse thymus. J. Exp. Med., 168: 1929.
- 128.- Weissman, I. (1967). Thymus cell migration. J. Exptl. Med., 126: 291.
- 129.- Pabst, R. (1988). The spleen in lymphocyte migration. Immunol. Today, 9: 43.
- 130.- Naparstek, Y.; Holoshitz, J.; Eisenstein, S.; Reshef, T.; Rappaport, S.; Chemke, J.; Ben-Nun, A. y Cohen, I.R. (1982). Effector T lymphocyte line cells migrate to the thymus and persist there. Nature, 300: 262.
- 131.- Rothenberg, E. (1980). Expression of differentiation antigens in subpopulations of mouse thymocytes: Regulation at the level of the novo synthesis. Cell, 20: 1.

- 132.- Reichert, R.A.; Gallatin, W.M.; Butcher, E.C. y Weissman, I.L. (1984). A homing receptor-bearing cortical thymocyte subset: implications for thymus cell migration and the nature of cortisone-resistant thymocytes. *Cell*, 38: 89.
- 133.- DeMaio, A.; Lis, H.; Gershoni, J.M. y Sharon, N. (1986). Identification of peanut agglutinin-binding glycoproteins on immature human thymocytes. *Cell. Immunol.*, 99: 345.
- 134.- De Maio, A.; Lis, H.; Gershoni, J.L. y Sharon, N. (1986). Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes. *FEBS Lett.*, 194: 28.
- 135.- Piantelli, M.; Larocca, L.M.; Aiello, F.B.; Maggiono, N.; Carbone, A.; Ranelletti, F.O. y Musiani, P. (1986). Proliferation of phenotypically immature human thymocytes with and without interleukin-2 receptors. *J. Immunol.*, 136: 3204.
- 136.- Basso, G.; Cocito, M.G.; Semenzato, G.; Pezzuto, A. y Zanesco, L. (1980). Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Brit. J. Haematol.*, 44: 577.
- 137.- Rodríguez-Segade, S.; Freire-Moar, J.M. y Freire, M. (1986). The distribution of N-acetyl- β -glucosaminidase, β -glucuronidase, acid α -naphthyl acetate esterase in subpopulations of thymocyte, bone marrow and other lymphoid organs in mice. *Int. J. Biochem.*, 18: 149.
- 138.- Freire-Moar, J.M.; Rodríguez, D.; Rodríguez-Segade, S. y Freire, M. (1984). The distribution of ADA, PNP, and 5'NT in subpopulations of thymocytes, bone marrow cells and another lymphoid organs in mice. *Int. J. Biochem.*, 16: 225.
- 139.- Pasternack, M.S. y Eisen, H.N. (1985). A novel serin esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 314: 743.
- 140.- Gagnon, J.; Ho-Kim, M.-A.; Boissonneault, G.; Dubé, J.Y.; Rogers, P.A. y Tremblay, R.R. (1987). The influence of immobilization stress on cardiac protein synthesis. A possible regulatory role for glucocorticoids. *J. Recept. Res.*, 7: 639.
- 141.- Hidalgo, J.; Armario, A.; Flos, R.; Dingman, A. y Garvey, J.S. (1986). The influence of restraint stress in rats on metallothionein production and corticosterone and glucagon secretion. *Life Sci.*, 39: 611.
- 142.- Hidalgo, J.; Garvey, J.S. y Armario, A. (1987). The role of catecholamines and glucagon on serum and liver metallothionein response to restraint stress. *Rev. Esp. Fisiol.*, 43: 433.

- 143.- Monjan, A.A. y Collector, M.I. (1977). Stress-induced modulation of the immune response. *Science*, 196: 307.
- 144.- Yokoyama, M.; Koga, Y.; Taniguchi, K.; Nakano, H. y Nomoto, K. (1986). Thymus-dependent increase in splenic T cell population in postpartum mice. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10: 143.
- 145.- Yokoyama, M.; Koga, Y.; Taniguchi, K.; Nakano, H. y Nomoto, K. (1988). T lymphocytes emigrating from the thymus to the spleen during postpartum regulate serum immunoglobulin levels in mice. *Immunol.*, 63: 151.
- 146.- Haar, J.L.; Popp, J.D. y Shultz, L.D. (1989). Defective "in vitro" migratory capacity of bone marrow cells from viable motheaten mice in response to normal thymus culture supernatants. *Exp. Hematol.*, 17: 21.
- 147.- McFadden, R.G. y Vickers, K.E. (1987). Rat lymphokines control the migration of nonsensitized lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 118: 345.
- 148.- Riley, V. (1981). Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science*, 212: 1100.
- 149.- Waynforth, H.B. (1980). En: Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Inc. London Ltd, p. 124.
- 150.- Reisner, Y. y Sharon, N. (1984). Fractionation of subpopulations of mouse and human lymphocytes by peanut agglutinin or soybean agglutinin, En: Methods in Enzymology. DiSabato, G.; Langone, J.J. y Vunakis, H.V. (ed.). Academic Press. New York, 108: 168.
- 151.- Zenker, N. y Bernstein, D.E. (1958). The stimulation of small amounts of corticosterone in rat plasma. *J. Biol. Chem.*, 231: 695.
- 152.- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982) En: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York, p. 458.
- 153.- Arkesteijn, C.L.M. (1976). A kinetic method for serum 5'-nucleotidase using stabilised glutamate dehydrogenase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 14: 155.
- 154.- Yakata, M. et al. (1983). Basic studies on assay of NAG activity in urine and its variability in course of renal diseases. *Jap. Clin. Path. Suppl.*, 56: 90.
- 155.- Fishman, W.H.; Kato, K.; Anstiss, C.L. y Green, S. (1967). Human serum β -Glucuronidase, its measurement and some of its properties. *Clin. Chem. Acta*, 15: 435.

- 156.- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981). En: Biometry. Freeman and Company. San Francisco, p. 259.
- 157.- Lee, A.K. y McDonald, I.R. (1985). Stress and population regulation in small mammals. En: Oxford reviews of reproductive biology. Clarke, J.R. (ed.). Oxford University Press, p. 269.
- 158.- Gamallo, A.; Villanua, A.; Tranco, G. y Fraile, A. (1986). Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. Physiol. Behav., 36: 217.
- 159.- Riley, V.; Fitzmaurice, M.A. y Spackman, D.H. (1981). En: Psychoneuroimmunology. R. Ader (ed.). Academic Press. New York, p. 31.
- 160.- Burchfield, S.R.; Elich, M.S. y Woods, S.C. (1977). Geophagia in response to stress and arthritis. Physiol. Behav., 19: 265.
- 161.- Riley, V. y Spackman, D. (1977). Housing stress. Lab. animal, 6: 16.
- 162.- De Boer, S.F. y Van der Gugten, J. (1987). Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rat. Physiol. Behav., 40: 323.
- 163.- Hara, C.; Manabe, K. y Ogawa, N. (1981). Influence of activity-stress on thymus, spleen and adrenal weights of rats: Possibility for an immunodeficiency model. Physiol. Behav., 27: 243.
- 164.- Ader, B. (1967). Behavioral and physiological rhythmus and development of gastric erosions in the rat. Psychosom. med., 29: 345.
- 165.- Wiebold, J.L.; Stanfield, P.M.; Becker, W.C. y Hillers, J.K. (1986). The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. J. Reprod. Fert., 78: 185.
- 166.- Ghoneum, M.; Gill, G.; Assarah, P. y Stevens, W. (1987). Susceptibility of natural killer cell activity of old rats to stress. Immunology, 60: 461.
- 167.- Hidalgo, J.; Giralt, M.; Garvey, J.S. y Armario, A. (1987). Sex and restraint stress differences in rat methallothioneim and Zn levels. Rev. esp. Fisiol., 36: 835.
- 168.- Gamallo, A.; Villanua, M.A. y Beato, M. (1986). Body weight gain, and food intake alterations in crowd-reared rats. Physiol. Behav., 36: 835.

- 169.- Kvetnansky, R.; Tilders, F.J.H.; Van Zoest, I.D.; Dobrakova, M.; Berkenbosch, F., Colman, J.; Zeman, P. y Smelik, P.G. (1987). Sympathoadrenal activity facilitates β -endorphin and alpha-MSH secretion but does not potentiate ACTH secretion during immobilization stress. *Neuroendocrinology*, 45: 318.
- 170.- Gibbs, D.M. (1985). Inhibition of corticotropin release during hypothermia: the role of corticotropin-releasing factor, vasopresin, and oxytocin. *Endocrinology*, 116: 723.
- 171.- Snoeij, N.J., Penninks, A.H. y Seinen, W. (1988). Dibutyltin and tributyltin compounds induce thymus atrophy in rats due to a selective action on thymic lymphoblasts. *Int. J. Immunopharmac.*, 10: 891.
- 172.- Cohen, J.J. y Crnic, L.S. (1985). Behavior, stress and lymphocyte recirculation. En: Stress, immunity and aging. Cooper, E.L. (ed.). Marcel Dekker Inc. New York, p. 73.
- 173.- Livne, P.M.; Sidi, Y.; Trainin, N. y Sperling, O. (1983). Characterization of thymocytes subpopulations by enzymatic markers. *Thymus*, 5: 393.
- 174.- Hirvonen, A.; Immonen, T.; Leinonen, P.; Alhonen-Hongisto, L.; Jänne, O.A. y Jänne, J. (1988). Effect of dexamethasone on the activity and expression of ornithine decarboxylase in rat liver and thymus. *Biochim. Biophys. Acta*, 950: 229.
- 175.- Barja Francisco, P. (1989). Concentración de antígenos y enzimas marcadoras de la actividad inmunológica de las células linfoides. Estudio del efecto de factores tímicos sobre estos marcadores y la actividad proliferativa de los linfocitos T. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.