

EFFECTOS DE ESTRÉS AGUDO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS EN HUMANOS Y ANIMALES



**FONDO EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CUYO**

Dirección de Publicaciones

Impreso en Julio de 2006.

Directora: María Isabel Larrauri

Reservados los correspondientes derechos
por la **Universidad Católica de Cuyo**.

Prohibida su reproducción total o parcial.

Pueden formularse citas con la indicación
expresa de su procedencia y conservando
el sentido del contexto.-

Es una publicación oficial de la Universidad.

Las opiniones expresadas en los trabajos son
de exclusiva responsabilidad de sus autores,
no expresando el pensamiento del señor
Rector ni del Honorable Consejo Superior.

Efectos de estrés agudo sobre parámetros bioquímicos e
inmunológicos en humanos y animales - 1a ed. - San Juan:
Universidad Católica de Cuyo, 2006.
90 p.; 21x15 cm.

ISBN 950-559-171-3

1. Estrés Agudo-Efectos.
CDD 616.98

© Copyright By Universidad Católica de Cuyo

Impreso en Argentina - Printed in Argentina

Hecho el depósito que determina la Ley 11.723

I.S.B.N. N° 950-559-171-3

AUTORIDADES de la UNIVERSIDAD CATÓLICA de CUYO

Rectorado:

Rector: Dr. Juan Carlos Guillermo Krebs.

Vicerrector: Dr. Carlos Quiroga Conte Grand.

Secretario General Académico: Arq. Carlos Pujadas.

Secretario de Extensión y Relaciones Institucionales:
Luis Eduardo Meglioli.

Secretaria de Investigación y Vinculación Tecnológica:
Dra. Miriam Dolly Arancibia de Calmels.

FACULTAD DE FILOSOFÍA Y HUMANIDADES:

Decana: Dra. María Isabel Larrauri.

Secretario académico: Lic. Roberto Quiroga Barragán.

FACULTAD DE DERECHO Y CIENCIAS SOCIALES:

Decano. Dr. Gilberto Américo Riveros.

Secretaria académica: Dra. Elsa Coralli de Raed.

FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS Y EMPRESARIALES:

Decano. Dr. José Antonio Oliver.

Secretaria académica: Dra. Marisa Pósleman de Lucero.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Decana: Lic. Graciela Martín de Roca.

Secretario académico: Lic. Miguel Ángel Paton.

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS:

Decano: Dr. Carlos Hugo Campayo.

Secretario académico: Dr. Claudio Larrea.

Directora Escuela de Enfermería e Instrumentación Quirúrgica:

Mgter. Margarita Ana Maldonado de Gioja.

Directora Escuela de Medicina: Dra. Mercedes Gómez de Herrera.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO, SEDE MENDOZA:

FACULTAD DON BOSCO DE ENOLOGÍA Y

CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN:

Decana: Lic. Gladys Ranzuglia.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO, SEDE SAN LUIS:

Delegado rectoral: Dr. Javier Vera Frassinelli.

FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS Y EMPRESARIALES:

Decano: Dr. Carlos Gustavo Auché.

Secretario académico: Ing. Ricardo Silvera.

FACULTAD DE DERECHO Y CIENCIAS SOCIALES:

Decano: Dr. Carlos Guillermo Maqueda.

Secretario académico: Dr. Fernando De Viana.

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS:

Decano: Dr. Franklin Ocampo.

Secretaria académica: Dra. Adriana Benítez.

DIRECTORIO

Presidente: CP. Alfonso Osvaldo Martín.

Vicepresidente: CP. Héctor Luis Clevers.

Secretario: Mgter. Eduardo Javier Olazábal.

Tesorero: Dr. Carlos Quiroga Conte Grand.

Vocales: CP. Rubén Oscar Aguilar.

Dr. Ángel Salvador Martín.

Dr. Mario Petrignani.

Síndico: CP. Alberto Darío Escalas.

INDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.

I. Antecedentes	15
II. Estrés	16
III. Estresores y respuestas adaptativas al estrés	19
IV. Componentes de sistema de respuesta al estrés	20
• Eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. (HHA)	21
• CRF	22
• ACTH	23
• Glucocorticoides	23
V. Estrés y Sistema Inmune	24
• Vínculos anatómicos y funcionales	24
• Relación inmune-nerviosa	25
• Relación inmune-hormonal	26
• Estrés y citoquinas	27
Interleuquina 6 (IL-6)	28
• Estrés y tráfico leucocitario	32

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

I. Determinación de inmunoglobulinas y fracciones del complemento	37
II. Determinación de proteínas y albúmina	38
III. Determinación de urea	39
IV. Determinación de cortisol	39
V. Separación de células mononucleares de sangre total	40
• Buffer de lavado y dilución (PBS)	41
VI. Marcación directa de linfocitos con anticuerpos monoclonales	41
VII. Determinación de interleuquina 6 (IL-6)	42
VIII. Medición del hematocrito y glóbulos blancos totales	43
IX. Determinación de potasio	43
X. Muestras de pacientes	43
• Extracción de sangre de los pacientes	43
• Grupos de pacientes	43

XI. Muestras de animales	
• Asfixia	45
• Extracción de sangre en ratas	45
• Grupos de ratas	46
XII. Equipamiento	46
• Contador hematológico	46
• Autoanalizador químico	46
• Equipo de Ion selectivo	47
XII. Análisis estadístico	47

Capítulo 3. RESULTADOS.

I. Determinación de inmunoglobulinas	51
A. Pacientes	51
AI. Pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos con diferentes patologías (grupo 1)	51
AII. Pacientes cardíacos y politraumatizados (grupo 3)	57
B. Ratas	59
II. Determinación de leucocitos	59
• Pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos con diferentes patologías (grupo 1)	60
• Pacientes cardíacos y politraumatizados (grupo 3)	61
III. Determinación de subpoblaciones leucocitarias, linfocitos T (CD3) y linfocitos B (CD19)	62
• Determinación del porcentaje de linfocitos CD3+	63
• Determinación del porcentaje de linfocitos CD19+	64
IV. Determinación de interleuquina 6 (IL-6)	64
V. Determinación de cortisol	67
VI. Determinaciones de proteínas totales, albúmina, complemento, C3, C4, urea, potasio y hematocrito	68

Capítulo 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

.....	73
-------	----

BIBLIOGRAFÍA	85
---------------------------	-----------

ABREVIATURAS

- **HHA:** Eje hipotálamo-hipófiso-adrenal.
- **CRF:** Factor liberador de la corticotrofina.
- **ACTH:** Adrenocorticotrofina.
- **PAF:** Factor activador de plaquetas.
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa.
- **POMC:** Pro-opiomelanocortina.
- **VIP:** Polipéptido intestinal vasoactivo.
- **CBG:** Globulina transportadora de glucocorticoides.
- **NK:** Células Natural Killer.
- **IL:** Interleuquina.
- **IL-6:** Interleuquina 6.
- **LDH:** Láctico deshidrogenasa.
- **IDRS:** Inmunodifusión radial simple
- **mg/dl:** Miligramos por decilitro.
- **g/l:** Gramos por litro.
- **μ g/dl:** Microgramos por decilitro.
- **pg/ml:** Picogramos por mililitro.
- **BCF:** Bromo Cresolsulfon Ftaleína.
- **PBS:** Buffer Fosfato salino.
- **ANOVA:** Análisis de la varianza.
- **TCR:** Receptor de los linfocitos T.
- **BCR:** Receptor de linfocitos B.
- **HTR:** Hipersensibilidad de tipo retardada.
- **AP:** Asfixia a 37° C.
- **HIP:** Asfixia en hipotermia a 15° C.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Antecedentes.

Las bases históricas del estudio del estrés comienzan con observaciones de individuos que sufrían enfermedades seguidas a situaciones estresantes.

A pesar de las dificultades sobre la cuantificación del estrés y la asociación de éste con el comienzo de las enfermedades, en general se acepta que el estrés tendría efecto sobre la susceptibilidad a la enfermedad (1).

Se sabe que el estrés influye sobre el sistema inmune. Progresos recientes en neurociencia e inmunología han elucidado algunos de los mecanismos que determinan cambios inmunes inducidos por el estrés, como también de las interacciones entre el sistema nervioso central y los sistemas endocrino e inmune. Se ha establecido que existe una comunicación bidireccional entre estos sistemas a través de receptores comunes y de sustancias biológicamente activas tales como citoquinas, neurotransmisores y neuropéptidos, lo que demuestra el efecto regulatorio directo del sistema nervioso sobre el endocrino e inmune (2).

La psiconeuroinmunología es el campo de la ciencia que investiga las interrelaciones entre el sistema nervioso central, la conducta y el sistema inmune, y los efectos de éstos sobre la salud y la enfermedad. Hay muchas evidencias del beneficio sobre la salud en cuanto al manejo del estrés sobre la conducta cognitiva de las personas y pocas investigaciones del uso en la práctica médica sobre este gran tema (3). Los disturbios psicológicos que experimentan los pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos pueden tener implicancias para su integridad fisiológica, emocional, y para el progreso y subsecuente recuperación; además estos disturbios son precipitados no solo por su patología, sino por la privación sensorial y la sobrecarga física-emocional del ambiente de unidades de cuidados intensivos (4).

Distintos trabajos en la literatura muestran el esfuerzo por tratar

de relacionar el efecto del estrés sobre el sistema inmune y la importancia pronóstica que ello pueda tener sobre la evolución de pacientes críticos.

El objetivo del presente trabajo fue examinar el comportamiento del sistema inmune en humanos ingresados a unidades de cuidados intensivos donde se supone que están sometidos a un estado de estrés agudo; y en ratas en un modelo de asfixia perinatal, las que estarían expuestas a un estado similar de este tipo de estrés. Con este propósito, en los pacientes se estudiaron parámetros bioquímicos e inmunes. Para ello se consideraron distintos subgrupos de pacientes, los primeros heterogéneos en cuanto a la patología de ingreso, y los últimos, agrupados por una patología en particular para homogeneizar tanto la situación estresante como así también el tratamiento del paciente con respecto a la hidratación y terapéutica.

En cuanto a los animales de laboratorio, se utilizaron ratas. Se estudió un solo parámetro inmune considerando diferentes grupos: grupo control; animales sometidos a asfixia durante 20 minutos a 37°C (AP); y animales sometidos a AP en condiciones de hipotermia, durante 20 minutos a 15°C.

II. Estrés.

Se define al estrés como un estado alterado de la homeostasis. A las fuerzas que provocan este desequilibrio se las ha denominado “estresores”, mientras que a las fuerzas que interactúan para neutralizar el efecto de los estresores y restablecer la homeostasis se las llaman respuestas adaptativas.

El término homeostasis proviene del griego y significa “mezcla armoniosa de elementos”. Hipócrates definió como salud al estado de balance armonioso, y como enfermedad al estado de desequilibrio. Hipócrates también definió a las fuerzas de desequilibrio como causas de enfermedad y se refirió a las fuerzas inherentes a la salud del organismo como “el poder curativo de la naturaleza” (*vis medicatrix Nature*). Epicurus definió ya el estrés psicogénico. En la década del 90 del siglo pasado, Bernard introduce una teoría sugiriendo que un organismo cuanto más independiente se vuelve de su medio ambiente,

desarrolla caminos más complejos para estabilizar su medio interno con el objeto de contrarrestar los cambios en su medio externo. Se reconoció desde ese momento la importancia de los mecanismos adaptativos. Varios autores propusieron, luego que el sistema simpático adrenal sería el responsable de las respuestas necesarias para hacer frente a los desafíos del medio externo. Pudieron demostrar que desequilibrios físicos y emocionales desencadenan similares respuestas de adaptación (5).

En 1936, Selye presentó el concepto de “Síndrome de adaptación general”.

Selye definió cuatro estados en la reacción contra un estresor determinado: a) una reacción inicial de alarma, caracterizada por una descarga simpáticoadrenomedular inmediata, b) un estado de resistencia, caracterizado por una activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA), c) un estado de hipertrofia adrenal, ulceración gastroduodenal, y retracción linfóide y tímica, al cual lo llamó “ Síndrome de adaptación general”, y d) un estado final de agotamiento y muerte (6).

La teoría contemporánea en biología del estrés conceptualiza un sistema integrado de estrés que consiste de una estructura neuroanatómica y funcional que interactúa para producir cambios de conducta, fisiológicos y bioquímicos con el fin de mantener la homeostasis del organismo.

El estrés psicosocial y físico alteran el equilibrio fisiológico del organismo (homeostasis). Se han realizado numerosos estudios tratando de observar el efecto del estrés sobre la salud de los individuos, con el objetivo de predecir cambios producidos por el estresor sobre el organismo. Se ha observado que la sola diferencia de clases sociales puede tener repercusión en la salud de una comunidad ya que distintos tipos de estrés influyen sobre la vida de las personas. Las clases sociales más pobres tienen menores posibilidades de comida, indumentaria y resguardo (estrés por privación material), y esto hace que tengan menores tasas de longevidad que las personas de clases sociales medias y altas. Agregado a esto, las formas de vida, experiencias de la niñez, el lugar de cada persona en el ambiente social y vivencias diarias pueden ser poderosos determinantes de la salud y extensión de la vida de cada uno (7).

En trabajos con modelos animales se ha estudiado cómo el estrés agudo o crónico afecta parámetros físico-químicos de los organismos, considerando que el estrés agudo tendría un efecto estimulante sobre el sistema inmune y el estrés crónico un efecto supresor (8, 9). El estrés crónico como el producido por enfermedades crónicas tales como depresión, autoinmunidad, infección, etc., afecta vía los sistemas psico-neuro-endocrino-inmunológico, la función reproductora, el crecimiento y la inmunocompetencia (5). La mayoría de los autores que trabajan sobre modelos de estrés crónico, estudian la relación entre el estrés y alguna patología crónicamente instaurada, como la asociación entre el estrés psíquico y la severidad en la clínica de pacientes psoriásicos. Se comprueba así que pacientes sometidos a situaciones estresantes en el tiempo, sufren lesiones psoriásicas de mayor severidad, en cambio los sometidos a situaciones menos estresantes tienen menores índices de severidad en sus lesiones (10). En otros trabajos se ha comprobado que una situación estresante crónica como la de vivir con una persona con demencia progresiva se asocia con una menor respuesta a vacunas como la del virus influenza (11).

El estrés agudo se ha estudiado extensamente en humanos, y se ha observado que estresores agudos aplicados en forma separada influyen sobre parámetros bioquímicos e inmunes. Trabajos en voluntarios sanos sometidos a hipertermia, hipoxia, hipertensión, ejercicio intenso, etc., demuestran la variación de los parámetros luego de ser aplicado el estresor (12). Se han realizado curiosas experiencias como las descritas en el trabajo de Aloe y cols. (13), donde estudian cómo se ve afectada la expresión de un receptor (o marcador) sobre los linfocitos de paracaidistas en su primer salto, comparado con paracaidistas que ya habían saltado varias veces (13). Recientes trabajos de estrés en ratas sometidas a estresores agudos como pueden ser shock eléctrico, manipulación del animal, separación de las madres, estrés por inmovilización, etc., evidencian el alto grado de influencia del estrés agudo sobre la bioquímica e inmunidad del organismo (14).

Contrariamente a lo que se pensó en un primer momento acerca de que el estrés agudo es siempre inmunosupresor, en distintas experiencias se comprueba como este tipo de estrés, influye incrementando ciertos parámetros de la inmunidad con el fin último de preparar al organismo para soportar un desafío o agresión (15, 16).

El estudio del efecto del estrés agudo sobre el sistema inmune de pacientes en unidades de cuidados intensivos ha cobrado particular interés ya que se trata de personas comprometidas que requieren de un altísimo grado de atención tanto clínica como psíquica. A pesar de los progresos considerables en el manejo de pacientes ingresados en estas unidades, diversas experiencias adversas o traumáticas sufridas por los pacientes como ansiedad, distrés respiratorio, dolor y mareos nocturnos repercuten posteriormente en los dominios de salud mental de los mismos (17). En trabajos con personas admitidas en terapia intensiva la posibilidad de sangrado por hemorragias digestivas posteriores a la estadía en la unidad se ha asociado con infecciones, procesos inflamatorios o necesidad de ventilación mecánica sufridas durante la internación (18).

Se han estudiado parámetros bioquímicos e inmunes en pacientes politraumatizados ingresados a unidades de cuidados intensivos como recuento de glóbulos blancos totales, lactato, PO₂, etc., observando que después de medirlos al ingreso y en un seguimiento hasta el cuarto día se correlacionan con riesgo de infección (19).

III. Estresores y respuestas adaptativas al estrés.

La respuesta adaptativa al estrés parece depender de la calidad (físico, emocional, etc.), de la fuerza y duración del estresor o estímulo, como también, del estado general del organismo. Los estresores físicos incluyen estímulos del medio interno como anoxia, hipoglucemia, hipertermia, hemorragias, y del medio externo como calor, frío, ejercicios, infecciones, traumatismos, etc. Los estresores psicológicos incluyen miedo, ansiedad, frustración. Se debe tener en claro que los estresores actúan en general combinados y mezclados entre ellos y no por separado.

Las respuestas adaptativas se definen como todos los cambios de conducta y fisiológicos que adopta el organismo para mantener la homeostasis. Los cambios en la conducta incluyen alteraciones sensoriales y cognitivas, estados de alerta, aumento de la memoria, supresión de la alimentación y conducta reproductora (1).

Los procesos fisiológicos que acompañan a las respuestas

adaptativas incluyen liberación de substratos energéticos desde sitios de almacenamiento, cambios cardiovasculares y de presión sanguínea, como así también aumento de la respiración. Simultáneamente con ello, procesos anabólicos tales como digestión, crecimiento y reproducción son suprimidos. También existe activación del eje HHA, con la consecuente liberación de glucocorticoides a sangre circulante, que lleva a inhibir el almacenamiento de glucosa, ácidos grasos libres y proteínas, y a estimular su liberación como substratos energéticos desde músculos e hígado (5). No todos los estresores responden con idénticos perfiles fisiológicos o de conducta.

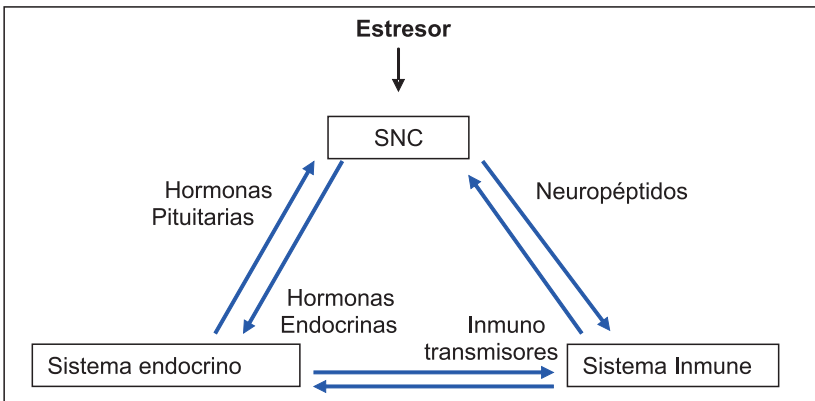


Figura 1. Relaciones entre estrés y sistema nervioso, endocrino e inmune.
Adaptado de Khanasari D y cols, 1990 (1).

IV. Componentes del sistema de respuesta al estrés.

El sistema de respuesta al estrés tiene dos componentes principales, uno central y otro periférico. El componente central que forma parte del sistema nervioso central, involucra la activación de estructuras corticales, límbicas y núcleos anatómicos. El hipotálamo, parte del sistema límbico, contiene las neuronas productoras del factor liberador de la corticotrofina (CRF), y neuronas que secretan vasopresina del núcleo paraventricular. Además, participan de este compartimento central, neuronas noradrenérgicas y otras del sistema nervioso autónomo (20). El componente periférico de respuesta al estrés consiste del eje HHA y el sistema nervioso autónomo incluyendo la médula adrenal.

La acción de los estresores resulta en un incremento de la actividad de ambos componentes y así por ejemplo, se estimula la síntesis de catecolaminas como adrenalina y noradrenalina que son liberadas a la circulación general. Hoy se acepta que estos sistemas son críticos en la respuesta fisiológica integral a los distintos estresores (1).

En conclusión, la regulación central de una respuesta adaptativa como un todo frente al estresor, involucra componentes de la corteza cerebral, sistema límbico, hipotálamo y médula. La acción de un estresor en el estrés agudo resulta en la liberación de epinefrina y norepinefrina, y en la activación del eje HHA, con la consecuente secreción de CRF, adrenocorticotrofina (ACTH) y corticoides (5).

• Eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. (HHA)

La respuesta al estrés está asociada con incrementos de los glucocorticoides en el plasma. La secreción de éstos por la glándula adrenal depende de la liberación de ACTH, hormona sintetizada por la hipófisis cuya secreción está además regulada por el CRF (21).

Los glucocorticoides ejercen diferentes acciones una vez secretados, incluyendo efectos sobre la función cardíaca, metabolismo, músculo, conducta y sistema inmune. Se podrían agrupar a todos los efectos en dos grandes categorías: permisivos y regulatorios. El rol permisivo de los glucocorticoides es crucial para mantener la homeostasis en un estado basal. Mientras que el rol regulatorio es solamente inducido por mecanismos de estrés. Se hipotetiza que los efectos regulatorios de los glucocorticoides relacionados al estrés pueden ser necesarios para prevenir sobre-reacción de sistemas como el inmune, el central y otros.

Existen varios mecanismos de feed-back que controlan la secreción de glucocorticoides a nivel del hipotálamo regulando la secreción de CRF y, a nivel de la hipófisis sobre la secreción de ACTH. Estos mecanismos le permiten al organismo mantener niveles basales de glucocorticoides en forma permanente y, sistema nervioso central de por medio, responder a estresores.

El eje HHA y el sistema simpático son importantes reguladores de la homeostasis del organismo. La función de este eje ha sido objeto

de intensos experimentos clínicos, que han intentado comprender por qué los glucocorticoides son críticos para la vida.

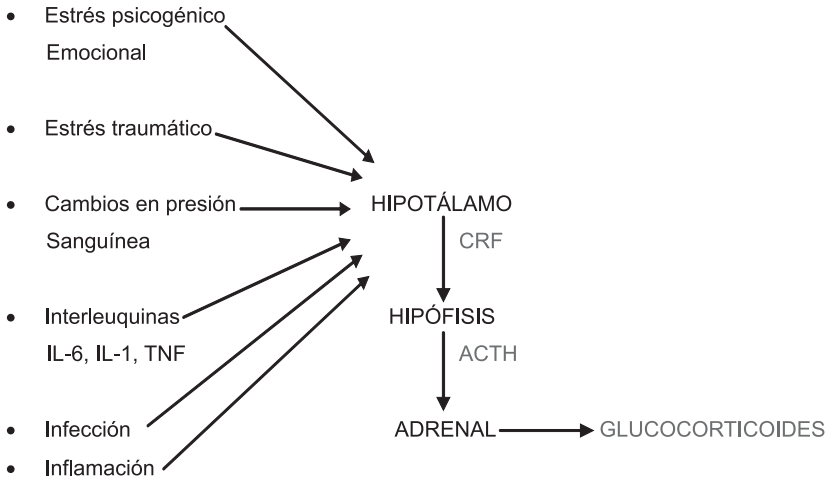


Figura 2. Efecto de distintos estresores sobre el eje HHA.
Adaptada de Nalton y cols, 1988 (23).

• CRF.

El CRF es un péptido de 41 aminoácidos, liberado en la circulación portal de la hipófisis y que actúa sobre receptores ubicados en el cerebro, pituitaria anterior, médula adrenal y ganglios simpáticos. Estos receptores son sensibles a los niveles de glucocorticoides en plasma y responden a mecanismos de estrés agudo y crónico disminuyendo su densidad en las células. Una vez liberado y transportado hasta la pituitaria anterior, estimula tanto la síntesis como secreción de ACTH (4). La gran distribución del CRF y sus receptores en el sistema nervioso central sugieren el amplio rango de efectos de este péptido sobre la conducta. Las emociones, dolor, presión sanguínea, ansiedad etc., afectan la liberación del CRF. Las interleuquinas (IL), IL-1, IL-2, IL-6, el factor activador de plaquetas (PAF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) estimulan también su secreción. El CRF activa la conducta en general, y altas concentraciones producen irritabilidad, agresión y alteración de la conducta sexual (5).

- **ACTH.**

La pro-opiomelanocortina (POMC) es una prohormona sintetizada en el cerebro, hipófisis, tracto gastrointestinal, órganos reproductivos, que es clivada en un péptido biológicamente activo de 39 aminoácidos, ACTH, y en lipotrofina, un fragmento de 92 aminoácidos. La ACTH es transportada por la circulación hasta la adrenal para estimular la secreción de glucocorticoides, aldosterona y andrógenos. Esta hormona tiene un efecto sensibilizante sobre la corteza adrenal. Así, si un animal es expuesto a dosis regulares y fijas de ACTH, la hormona induce una hipertrofia adrenocortical y un incremento de la secreción de glucocorticoides, en cambio, si la secreción de ACTH disminuye, la síntesis de glucocorticoides decrece secundaria a una atrofia adrenal. Los receptores de ACTH siguen un patrón de regulación y homeostasis como otros del sistema endocrino. Cuando los niveles de ACTH son altos, los receptores disminuyen o desaparecen y viceversa. Otros péptidos también regulan su secreción, como por ejemplo ocitocina, vasopresina, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), angiotensina II. Los glucocorticoides inhiben por feed-back la secreción de ACTH.

Se piensa que la ACTH incrementa la atención, memoria, aprendizaje y motivación. Reduciría la interacción social y la agresión (1, 5).

- **Glucocorticoides.**

Los glucocorticoides son sintetizados en la corteza adrenal. Se liberan en la circulación y el 95% circula unido a la globulina transportadora de glucocorticoides (CBG). Se considera que ésta es la fracción inactiva, mientras que la fracción libre de cortisol en plasma es la activa y es la que ejerce feed-back negativo sobre el CRF y la ACTH.

Los receptores de glucocorticoides están distribuidos en el cerebro, incluyendo las neuronas liberadoras de CRF del hipotálamo. Existen dos tipos de receptores de glucocorticoides, los de tipo I y los de tipo II. Los de tipo I se encuentran en las neuronas del sistema límbico tales como el hipocampo y el septum. Estos receptores cumplen un rol en la modulación de las respuestas a estímulos ambientales y

emocionales con cambios consecuentes en la conducta y en el eje HHA. Con la edad, el hipocampo pierde el 60% de los receptores tipo I. Los receptores de tipo II se encuentran en el cerebro en sitios como el hipocampo, septum lateral y amígdala. Es probable que a este nivel los receptores participen en la respuesta neuroendócrina y autónoma al estrés.

Durante el estrés la densidad celular de receptores tipo I no cambia, mientras que los de tipo II lo hacen en forma considerable (5). Las elevaciones persistentes de los glucocorticoides vuelven a las neuronas del hipocampo vulnerables a influencias tóxicas con consecuente degeneración y muerte celular. Los glucocorticoides tienen dos acciones sobre el sistema nervioso: una relacionada con la percepción y coordinación de los patrones de ritmo circadiano de consumo de alimentos y sueño, y la segunda, relacionada al feedback negativo sobre circuitos neuronales activados por estrés.

V. Estrés y sistema inmune.

• Vínculos anatómicos y funcionales.

Las señales estresantes modifican la homeostasis del organismo por alteración o cambio del equilibrio de varias hormonas y sustancias que tienen un efecto significativo sobre el sistema inmune en general. El estado del sistema inmune dependerá del efecto neto de estos cambios. Las hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores liberados en el estrés, como la ACTH, VIP, Sustancia P, Prolactina, hormona del crecimiento, hormonas esteroideas, catecolaminas, acetilcolina, además de interleuquinas como la IL-6, alcanzan sus células y tejidos blanco vía sanguínea. Los receptores específicos para cualesquiera de estos factores han sido encontrados en células inmunocompetentes. Receptores para opioides se han encontrado en linfocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas (1).

La interacción entre factores neuroendocrinos y células inmunocompetentes podría alterar la actividad celular a través de la activación de una variedad de segundos mensajeros incluyendo cAMP y cGMP. Los efectos inmunomodulatorios de estos factores pueden ser similares a aquellos que regulan la función neuroendocrina, e

involucran ciertos eventos bioquímicos en la iniciación o modulación de la proliferación, diferenciación y función celular. Los factores neuroendocrinos modulan la respuesta inmune alterando la producción o actividad de linfoquinas y por ende influyen en la respuesta inmune. Pueden ejercer efectos tanto inmunoactivadores o inmunosupresores, dependiendo de su concentración, célula blanco y la función inmune específica que altera (1).

Clínicamente se ha observado en pacientes hospitalizados con enfermedades de depresión, no sólo disminución en el número de linfocitos T y B, sino también, respuestas disminuídas de linfocitos T frente a la estimulación con mitógenos, y también, descenso en la actividad de células Natural Killer (NK)(22).

Las alteraciones en la función inmunológica asociada con cambios en el estado mental proveen importantes evidencias sobre la interacción entre el sistema inmune y el sistema de respuesta al estrés.

- **Relación inmune-nerviosa.**

Los órganos linfoides están inervados por el sistema nervioso autónomo y existen datos que indican que éste tiene efectos inmunomodulatorios (1, 20, 23).

Estos informes incluyen la localización de los nervios en los tejidos inmunes, el efecto del sistema nervioso simpático sobre el sistema inmune y la acción de las neurohormonas sobre la actividad de los linfocitos. En el timo las fibras noradrenérgicas se encuentran en la corteza tímica, y los timocitos en desarrollo, que poseen β -adrenoreceptores y responden a catecolaminas, son los blancos más sospechosos de esta inervación. Además, los ganglios linfáticos (órganos linfoides secundarios), reciben inervación noradrenérgica, en la médula, corteza, paracorteza, seno subcapsular y cápsula, existiendo en el bazo una inervación similar que se distribuye con el sistema vascular y trabecular, y está asociada principalmente con la arteria central y sus ramas, el manguito linfático periarteriolar, el seno marginal y la zona parafolicular. Existen así en el bazo varias zonas de contacto entre nervios y linfocitos o macrófagos. Las fibras nerviosas en el manguito linfático periarteriolar y en los plexos alrededor de la arteriola

central, se encuentran con linfocitos tanto CD4+ como CD8+, y también con células interdigitantes. En otras áreas del bazo, se encuentran terminales nerviosas cerca de las zonas donde existen gran cantidad de macrófagos, células T y células B con gran concentración de IgM en su superficie. Estas asociaciones indicarían que el sistema nervioso simpático influye directamente sobre las células efectoras de las respuestas inmunes (1).

El sistema colinérgico también está involucrado en la modulación del sistema inmune. Los receptores para acetilcolina están presentes en el epitelio tímico y es posible que también existan sobre los timocitos. El sistema colinérgico podría modificar la respuesta inmune modificando la producción de hormonas por el epitelio tímico, involucrado éste, en la maduración de los timocitos.

En la médula ósea se han encontrado también receptores colinérgicos que estarían involucrados en la activación celular. Existen trabajos en donde los tratamientos con acetilcolina disminuyen el número de linfocitos y macrófagos, en cambio, la adrenalina disminuye el número de linfocitos pero aumenta el de macrófagos.

• **Relación inmune-hormonal.**

Los glucocorticoides ingresan a las células por transporte activo y luego son acoplados al receptor para glucocorticoides o son inactivados. Una vez unidos al receptor dentro de la célula, se asocian con proteínas como c-fos o c-jun, activando secuencias específicas del DNA llamadas elementos de respuesta a glucocorticoides. Estos elementos están situados en regiones promotoras de muchos genes de manera que los glucocorticoides favorecen la transcripción del gen en cuestión, es decir, que los glucocorticoides son reguladores de genes. Los glucocorticoides tienen efectos positivos o negativos. Por ejemplo, favorecen que c-fos o c-jun se unan a sitios particulares de DNA, o se unan a factores de transcripción regulando directamente la expresión del gen.

De esta forma los glucocorticoides tienen efectos sobre la inmunidad innata o adaptativa. Sobre la inmunidad innata, regulan la fagocitosis, la actividad de células presentadoras de antígenos y, disminuyen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias

intracelulares por parte de los macrófagos; alteran el estallido respiratorio en los neutrófilos, retardan la liberación de gránulos y de ácido araquidónico, con un marcado efecto antiinflamatorio. Al nivel de la inmunidad adaptativa, afectan la ontogenia, proliferación y sobrevivencia de linfocitos, además son fuertes inductores de apoptosis.

Por otra parte, los glucocorticoides aumentan las citoquinas de tipo Th2 (IL-10 e IL-4) disminuyendo las de tipo Th1 (IL-2 e interferón γ) por lo que, en procesos crónicos como envejecimiento, estrés o infecciones crónicas están aumentados los isotipos de inmunoglobulinas asociados a Th2. También se ha visto, que en los mecanismos de estrés agudo donde existe daño físico, dolor o inflamación, los glucocorticoides inhiben el tráfico leucocitario e interfieren con la inmunidad mediada por células, incrementando la función de células T supresoras. (5)

- **Estrés y citoquinas.**

Los dos componentes del sistema de respuesta al estrés, tanto el central como el periférico, son afectados por citoquinas, entre ellas, IL-6, IL-1 y TNF- α (23). Estas citoquinas son liberadas en altas concentraciones por distintos tipos celulares del sistema inmune, macrófagos entre otros, durante situaciones estresantes como inflamación, infección, traumatismo, hemorragia, dolor, hipertermia, etc. Además de su acción autocrina y paracrina, estas proteínas, y principalmente la IL-6, actúan como hormonas que regulan las reacciones de fase aguda e influyen en los ejes endocrinos y en el metabolismo intermedio. Todas son potentes estimuladoras del eje HHA, vía estimulación de la producción y secreción del CRF.

Friedland y cols. (24) han estudiado varias citoquinas, incluyendo IL-6, IL-8, IL-1 y TNF en pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos no seleccionados por patologías o por edades, y han visto, que las mismas están incrementadas en el día de admisión y en los días subsiguientes, pero las concentraciones de cada una fluctúan según la seriedad de la patología y con cada paciente en particular (24).

Interleuquina 6 (IL-6).

La IL-6 es un citoquina que se caracteriza por tener un amplio espectro de efectos sobre el sistema sanguíneo, inmune, endocrino, etc. Más aún, es secretada durante mecanismos de estrés y es positivamente controlada por catecolaminas. La administración de IL-6 resulta en anorexia, fiebre y fatiga (ver figura N° 3) (25, 26).

Interviene además en el control de la inflamación inhibiendo la producción de TNF y favoreciendo la síntesis de reactantes de fase aguda en el hígado. La IL-6 es producida no sólo por células del sistema inmune como linfocitos, fibroblastos, mastocitos, macrófagos, sino también, por células de la microglia, astrocitos, células de la hipófisis, etc. Esto hace que la IL-6, al igual que la mayoría de las citoquinas posea efectos pleiotrópicos actuando sobre los receptores específicos. El receptor consiste de una proteína de membrana formada por dos dominios extracelulares y una región intracitoplasmática involucrada en la transducción de señales hacia el interior de las células.

Estudios en ratas han demostrado que la IL-6 activa inmediatamente el eje HHA por acción primaria sobre neuronas liberadoras de CRF (23). La administración subcutánea de IL-6 en humanos voluntarios aumenta significativamente los niveles plasmáticos de ACTH, con un concomitante aumento de cortisol. Los niveles de este último llegan a un valor máximo luego del incremento agudo de la ACTH (26). A su vez, la administración de adrenalina en ratas produce un pico de IL-6, pero si se realiza la misma experiencia con bloqueantes β -adrenérgicos, el efecto no ocurre. Esto demuestra que la secreción de IL-6 en el cerebro se estimula a través de receptores β -adrenérgicos. La inyección subcutánea de adrenalina aumenta, en humanos, la concentración en plasma de IL-6 (25); también el ejercicio incrementa sus niveles correlacionándose positivamente con aumento de las catecolaminas. (27).

La IL-6 tiene un profundo efecto estimulador sobre el sistema de estrés (28), es secretada cuando el sistema es activado durante procesos inflamatorios (29, 30), o no inflamatorios (31, 32, 33), y juega además, un rol perjudicial en el estrés crónico y envejecimiento, lo que se caracteriza por un progresivo incremento de glucocorticoides y catecolaminas en plasma y disminución en la producción de

hormonas del crecimiento y sexuales. Estudios recientes han demostrado que los niveles en plasma de la IL- 6 se incrementan con la edad, probablemente como resultado de la hipersecreción de catecolaminas e hiposecreción de hormonas esteroidales sexuales. Por eso se ha visto que esta interleuquina, puede contribuir a la morbilidad y mortalidad en personas crónicamente estresadas o durante el envejecimiento fisiológico.

Se han realizado experimentos en humanos voluntarios sanos para demostrar que la IL-6 está involucrada en mecanismos de estrés siendo un potente estimulador del eje HHA (26). Para ello, inyecciones de IL-6 subcutáneas en distintas dosis fueron dadas a voluntarios entre las 8 y 9 hs. de la mañana y en ayunas. Luego se les extrajo sangre a distintos tiempos y se midieron hormonas adrenales, hipofisarias, e IL-6. Se observó un aumento de IL-6 a los quince minutos del comienzo de la experiencia. No se observó hipotensión, aumento del ritmo cardíaco ni otros efectos secundarios severos, sólo algunos dolores de cabeza. En casi todos los sujetos hubo aumento de la temperatura. Con respecto a datos de laboratorio se observó hiperbilirrubinemia y proteinuria transitoria con aumento de reactantes de fase aguda como proteína C reactiva, haptoglobina, fibrinógeno e incremento de la velocidad de sedimentación celular. Estos reactantes alcanzaron el máximo entre las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de la administración de IL-6 y retornaron a valores basales siete días después de iniciada la experiencia. Se observaron incrementos significativos de ACTH y de cortisol en todos los voluntarios. Estas hormonas llegaron a su máxima concentración entre noventa y ciento veinte minutos post inyecciones. (Ver figura N° 4). Se observó además, que la IL-6 tiene efectos estimulatorios inmediatos dosis-dependiente sobre el eje adrenal determinándose una disminución posterior en la ACTH debido, posiblemente, al agotamiento de las reservas de ACTH hipofisarias.

En este estudio también se observó además una relación entre el aumento de la IL-6 y el CRF con el incremento de la temperatura, por lo tanto, el CRF sería también un factor que contribuye en la termogénesis. Por otra parte, la IL-6 produce drásticas disminuciones de hormona TSH, pudiendo esto explicar el síndrome de enfermedad eutiroidea que se produce en individuos enfermos por alguna patología aguda en centros de cuidados intensivos.

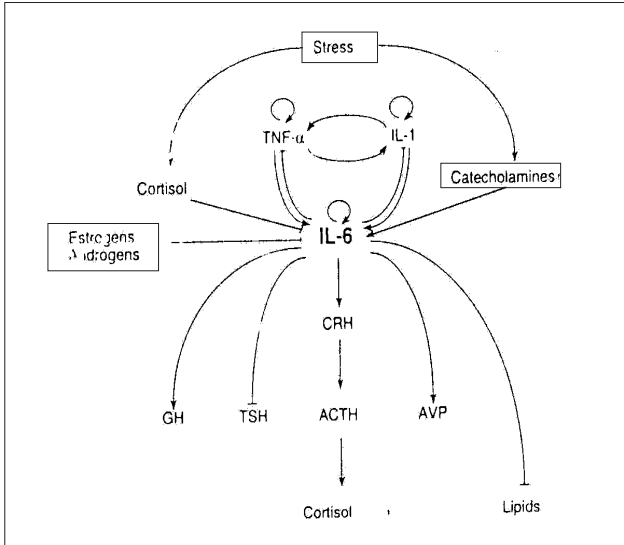


Figura 3. Relación de IL-6 con estrés y sistemas nervioso y endocrino.
Adaptada de Tsigos C. y cols., 1997(26).

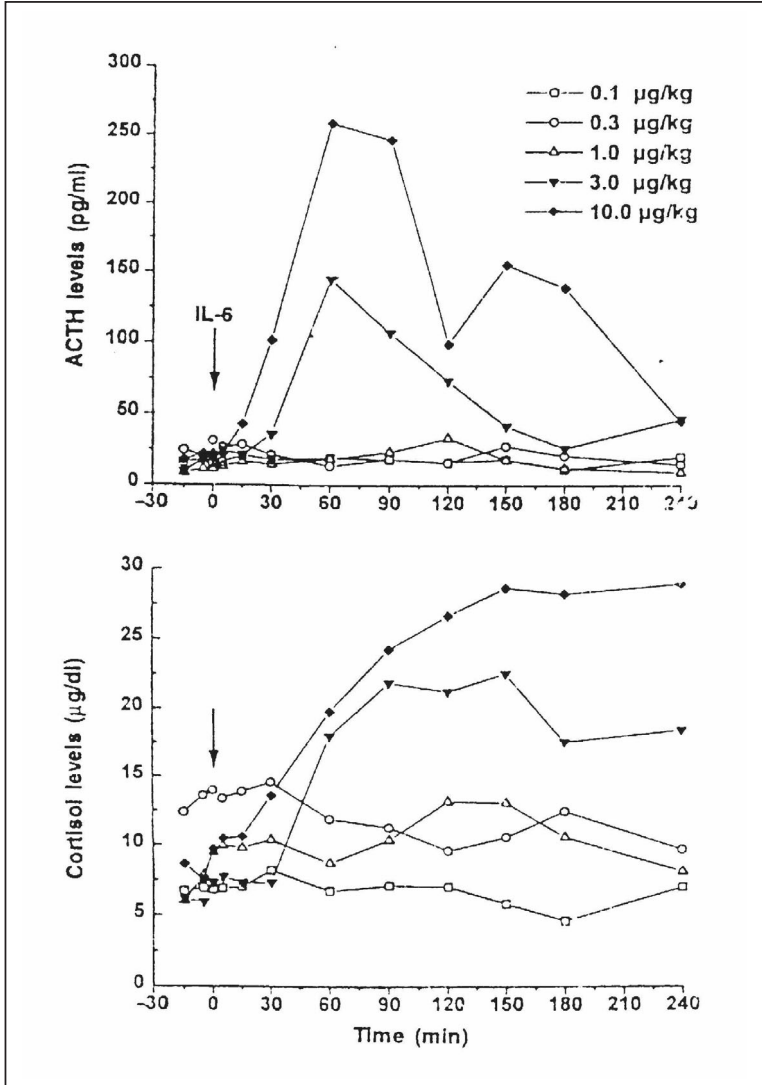


Figura 4. Relación IL-6 y eje HHA. Adaptada de Tsigos C. y cols, 1997(26).

- **Estrés y tráfico leucocitario.**

El número y proporción de leucocitos en sangre circulante es un importante reflejo del estado de activación y vigilancia del sistema inmune y depende de los patrones de tráfico y migración leucocitaria de las células inmunes en el organismo.

Los leucocitos migran hacia todos los tejidos del organismo. Cada población celular tiene su propio patrón de migración o desplazamiento que depende del grado de diferenciación y activación celular. Uno de los objetivos del tráfico celular es proporcionar a los leucocitos la posibilidad de encontrar los antígenos extraños. El drenaje linfático y la migración leucocitaria garantizan el transporte del antígeno hacia los órganos linfáticos secundarios, donde se desencadenan las respuestas inmunes.

En trabajos recientes con modelos animales se ha observado que el estrés agudo induce cambios profundos y reversibles en la distribución de subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica (16). Estos cambios podrían llegar a afectar la capacidad del sistema inmune para responder al desafío de un antígeno extraño o, por el contrario, se podría interpretar como un mecanismo para optimizar la vigilancia y poder de respuesta.

Experimentos con ratas, luego de sesiones de estrés agudo, demostraron cambios significativos en el número y porcentaje de subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica. Incrementos en glucocorticoides en el plasma de los animales se correlacionaron con disminución en el número de linfocitos B, NK, y monocitos, con aumentos en los neutrófilos y de la población de células T (16).

Para probar lo anterior, las ratas fueron sometidas a sesiones de estrés por inmovilización, que se piensa, es un estresor de tipo psicológico más que físico.

Para ello, se colocaron los animales en tubos de plástico de un espesor determinado, con un buen flujo de aire. Se les tomaron muestras de sangre un minuto luego de ser colocadas en el tubo y se las mantuvo durante dos horas. Se les extrajo sangre a distintos tiempos y por citometría de flujo previa marcación con anticuerpos monoclonales, se determinaron las distintas subpoblaciones leucocitarias; también se

realizaron determinaciones de hormonas y de enzimas como láctico deshidrogenasa (LDH) que es un marcador de destrucción celular. Se observó un incremento de corticosterona en las dos horas de sesión de estrés como resultado de una activación del eje HHA, lo que prueba el rol de los corticoides en la respuesta adaptativa en el estrés agudo y un retorno a los valores basales de la hormona una vez eliminado el estresor.

Con respecto a los leucocitos, estos redujeron su número en un 45%, observándose que los linfocitos lo hicieron en un 54 % debido a una disminución en el valor de los linfocitos B (CD19+), células NK, y monocitos; en cambio aumentó el número de los neutrófilos como así también de las células T (CD3+). Todas las poblaciones de leucocitos retornaron a los niveles basales luego que la sesión de estrés terminó.

Los resultados sugieren que los glucocorticoides (en este caso corticosterona como principal corticoide de las ratas), tendrían un rol importante en la respuesta al estresor agudo (la inmovilización). Además serían los mediadores en el cambio del número de leucocitos, y actuarían sinérgicamente con algún mediador no adrenal (interleuquinas). Esto queda comprobado por que el mismo ensayo, pero con ratas adrenalectomizadas, no produce los cambios en las subpoblaciones de leucocitos, y porque en ratas no adrenalectomizadas, al terminar la acción del estresor, los niveles de corticosterona retornan a los valores normales independientemente del ritmo circadiano del eje HHA (15, 16).

Se acepta así que la acción del estresor sobre las subpoblaciones de leucocitos, es una redistribución de los mismos entre la sangre periférica y los órganos y tejidos, y que la disminución en el número de algunos subgrupos, no se debe a destrucción sino a cambios en la distribución celular.

Se piensa así que habría una redistribución celular por retención de linfocitos circulantes dentro de órganos linfáticos primarios como la médula ósea, o secundarios, como el bazo y nódulos linfáticos, y que esta retención celular en los órganos, estaría dada por cambios en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular, como también, en el endotelio vascular. En consecuencia, esto llevaría a incrementar o favorecer la migración leucocitaria de algunos subgrupos

celulares, interpretándose, que ciertos tipos de leucocitos, en forma selectiva, se retendrían en diferentes compartimentos, los cuales están expresando moléculas de adhesión de unión a sus superficies inducidos por glucocorticoides. Es posible entonces que algunos leucocitos migren a ciertos compartimentos para ser protegidos de efectos deletéreos causados por el estresor, o que alternativamente, otros subgrupos podrían hacerlo hacia órganos inmunes, los cuales servirían de “estación” para el encuentro de los mismos con antígenos, patógenos u otras células inmunes activadas.

La modulación de la distribución celular inmune causada por estrés agudo, podría ser una respuesta adaptativa, desarrollada para aumentar la vigilancia e incrementar la capacidad del sistema inmune para responder a desafíos en distintos órganos o tejidos (15, 16, 34, 35).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Determinación de inmunoglobulinas y fracciones del complemento.

Las placas de Inmunodifusión radial para la determinación de inmunoglobulinas G, A, M y fracciones del complemento C3 y C4 en suero humano fueron de Biocientífica S.A. marca Diffu-plate. Las placas son de agarosa conteniendo antisueros específicos contra las distintas fracciones proteicas estudiadas.

Las placas de inmunodifusión radial para la determinación de inmunoglobulinas G en ratas se prepararon a partir de la disolución del anticuerpo monoclonal anti IgG en agarosa al 3%.

Para tal fin se procedió a disolver el medio de cultivo agar base en las proporciones antes mencionadas por una parte. Por otra, se realizó una dilución del anticuerpo monoclonal provisto por laboratorios Sigma S.A., en una dilución 1/70. Esta dilución se realizó con solución fisiológica la que se mezcló con el agar que se encontraba en estado líquido a 56°C.

La preparación se vertió sobre portaobjetos previamente limpios con alcohol a razón de 2,5 ml por cada uno, y se dejaron solidificar y reposar 2 horas antes de la siembra de los sueros.

Luego, se realizaron sacabocados en las placas con el fin de sembrar 5 microlitros de los sueros para analizar.

Previamente a la siembra de las muestras de los distintos grupos de ratas se realizó una dilución de cada suero 1/10 en solución fisiológica normal.

Todas las inmunoglobulinas G, A y M y las fracciones del complemento C3 y C4 se determinaron por Inmunodifusión radial simple (IDRS). Para ello se descongelaron los sueros y se sembraron 5

microlitros en cada placa con pipeta tipo Hamilton. Luego se dejaron incubar las mismas en posición invertida y en cámara húmeda por 48 horas hasta la lectura. La lectura se realizó con calibre apropiado para IDRS midiendo el diámetro del halo de precipitación. El valor del diámetro se extrapoló en la curva de calibración confeccionada por el fabricante de la placa en cada caso, para obtener la concentración final del analito en miligramos por decilitro (mg/dl).

En el caso de las determinaciones de la IgG en ratas se tuvo en cuenta solo el diámetro del halo de difusión los cuales se compararon para realizar los análisis estadísticos.

II. Determinación de proteínas y albúmina.

El reactivo para la determinación de proteínas totales fue de Laboratorios Wiener marca Proti2. La determinación se basa en que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ion cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con un máximo de absorbancia a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. El kit para la determinación provee el reactivo EDTA/Cu 13 mmol/l, en Na(OH) 875 mmol/l y alquil aril poliéster, y un suero patrón de solución de proteínas en estado nativo con una concentración de proteínas de 59 gramos/litro. Las absorbancias de cada tubo se midieron en Autoanalizador Químico multiparamétrico automático marca Technicon modelo RA 500 plus (procedencia U.S.A.).

El reactivo para la determinación de albúmina fue de Laboratorios Wiener marca Proti2. La determinación se basa en que la albúmina reacciona específicamente, sin separación previa, con la forma aniónica de la Bromo Cresolsulfon Ftaleína (BCF) en polioxietilén lauril éter, en presencia de un exceso de colorante y en medio tamponado a pH: 3,8. El aumento de la absorbancia a 625 nm, respecto del blanco de reactivos, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra. El kit para la determinación contiene suero patrón de 29 gramos/litro de albúmina. Las absorbancias de cada tubo se midieron en el autoanalizador químico. Los resultados se expresaron en gramos por litro (g/l).

Se midieron proteínas totales y albúmina en muestras de suero de los pacientes en el autoanalizador químicos, el cual dispensa la muestra de suero en el plato de reacción junto con el reactivo para cada caso. Realiza un tiempo de incubación a 37°C y luego la medición de absorbancias a 540nm y 620nm para proteínas totales y albúmina respectivamente. La concentración se obtiene extrapolando los valores de absorbancia en una curva de calibración previamente construida con estándares correspondientes. Los resultados se expresaron en g/l.

III. Determinación de urea.

El reactivo para la determinación de urea fue de Laboratorios Wiener marca UREA UV cinética AA para autoanalizador.

El kit de reactivos provee:

- Solución patrón de urea 0.60g/l.
- Buffer tris pH 7.9
- Enzimas
 - 2-oxoglutarato 7.5mmol/l
 - NADH 0.28mmol/l
 - Ureasa 4000U/L
 - Gidh 400U/L
 - Tris 100mmol/l

La determinación de urea en todos los sueros se realizó una vez separados los mismos por centrifugación y antes de congelarlos. La determinación se realizó en el autoanalizador químico. La lectura se realiza a una longitud de onda de 340 nm, a temperatura de 37°C en un tiempo de dos minutos y a un volumen final de reacción de 500 microlitros. Los resultados se expresaron en g/l.

IV. Determinación de cortisol.

El reactivo para la determinación de cortisol fue de Laboratorios DPC marca Coat-A-Count Cortisol, número de catálogo TKCO1. El

procedimiento de determinación es un método de radioinmunoensayo en fase sólida. El anticuerpo específico contra cortisol está unido a la superficie del tubo de polipropileno y así el cortisol de la muestra problema compite por los sitios de unión del mismo con el cortisol marcado con Yodo-125 radiactivo utilizado como reactivo de trabajo. El Kit contiene 100 tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos con menos de 5,5 microcuries de cortisol marcado con Yodo 125, un vial de 105 mililitros conteniendo cortisol marcado con Yodo 125, calibradores proteicos de sueros humanos con concentraciones de 0, 1, 5, 10, 20, y 50 microgramos de cortisol /dl ($\mu\text{g/dl}$). La sensibilidad del ensayo es de 0,2 $\mu\text{g/dl}$.

Los sueros descongelados se ensayaron directamente sin tratamiento previo. Los tubos de polipropileno conteniendo el anticuerpo monoclonal contra cortisol fueron marcados, colocando en primer lugar los correspondientes a la curva de calibración y luego los pertenecientes a los pacientes. Se dispensaron 25 microlitros de cada muestra de controles y sueros en cada uno de los tubos para luego colocar 1 mililitro del reactivo marcado con yodo-125 (cortisol marcado), el cual compite con el cortisol de cada muestra. Los tubos fueron incubados en baño de agua a 37°C durante 45 minutos.

Luego de ese tiempo se extrajeron del baño y el sobrenadante se eliminó con aspersor y bomba de vacío lavando la fracción unida al tubo con el buffer provisto por el fabricante. Se contaron las cuentas por minuto de cada tubo en un equipo contador gamma de centelleo sólido de un solo pozo marca Ingetron 2000s. Con el valor de las muestras controles restando el fondo de la reacción se confeccionó la curva de calibración, para luego extrapolar el valor de las cuentas por minuto de cada muestra en la misma y obtener así el valor de cortisol en microgramos por decilitro ($\mu\text{g/dl}$).

V. Separación de células mononucleares de sangre total.

El reactivo para separar células mononucleares de sangre total fue de Sigma Diagnostics, INC. Histopaque-1077, número de catálogo 7h345r3.

- **Buffer de lavado y dilución.**

Buffer Fosfato salino (PBS) pH: $7,2 \pm 0,2$ de Laboratorios Biocientífica S.A, marca Inmunofluor, número de catálogo AET-0104, para reconstituir en 1 litro de agua bidestilada.

Para separar las células mononucleares, se obtuvo sangre venosa en tubos conteniendo EDTA. Las muestras de sangre total se diluyeron con buffer PBS en proporción una parte del primero con dos del segundo. Luego se colocó en tubos de centrifuga 3 mililitros de Ficoll-Histopaque y se llevó hasta 9 mililitros con sangre prediluida con PBS. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a $1500 \times g$ por 20 minutos. Se aspiró luego de ese tiempo el sobrenadante y la capa de células mononucleares en la interfase se separó en otros tubos para su lavado que consistió en resuspender las células con buffer PBS adicionado con azida de sodio al 0,8% en buffer. Este paso de lavado se realizó dos veces y se obtuvo así una suspensión concentrada de células mononucleares para la marcación. Se ajustó la concentración de manera de tener $1 \cdot 10^6$ células cada $100\mu l$.

VI. Marcación directa de linfocitos con anticuerpos monoclonales.

La marcación de células mononucleares para medir el porcentaje de células CD3 + y CD19 +, se realizó con los anticuerpos de Laboratorios Becton Dickinson, antiCD3 (PerCP, número de catálogo 347344) y antiCD19 (Leu-12, (número de catálogo 347543), marcados con fluoresceína. El método se basa en marcación de células mononucleares con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo.

Los anticuerpos anti CD3 reaccionan contra las cadenas épsilon del complejo receptor del TCR de los linfocitos. El anticuerpo monoclonal CD3 clon SK7 es una inmunoglobulina G1 cadenas livianas kappa derivada de hibridación de células de mieloma NS-1 con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con timocitos humanos.

Los anticuerpos anti CD19 reaccionan contra el principal antígeno de linfocitos B maduros, el CD19, proteína de 90 kDa. El anticuerpo

monoclonal CD19 clon 4G7 es una inmunoglobulina G1 de ratón cadenas livianas kappa derivada de hibridación de células de ratón P3-X63-Ag8.653 con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con células de leucemia linfática crónica.

A fin de realizar la marcación con anticuerpos antiCD3 (LT) y antiCD19 (LB), se colocaron 100 μ l de cada suspensión de células mononucleares, en tubos ependorf de 1 mililitro de capacidad. Se adicionaron 10 μ l de cada uno de los anticuerpos monoclonales marcados (antiCD3, antiCD19) a cada tubo y se incubaron entre 2 y 8°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se lavaron las células dos veces, centrifugando los tubos a 2000 x g durante 5 minutos y eliminando el sobrenadante. Luego parte de las células marcadas se resuspendieron en 500 μ l de formaldehído al 1% hasta su análisis y se almacenaron en heladera entre 2 y 8°C. El análisis se realizó en Citómetro de flujo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba y parte en Citómetro de flujo del Hospital Central de la Provincia de Mendoza. Los porcentajes de linfocitos CD3 se obtuvieron por análisis de los datos del citómetro de flujo mediante el programa Winmidi y en el caso del segundo marcador (CD19) por computadora Macintosh del Servicio de Inmunología del Hospital Central de Mendoza.

VII. Determinación de Interleuquina 6 (IL-6).

El reactivo para la determinación de IL-6 fue de Pelikine compact. El método es un ensayo de tipo sandwich en el cual los reservorios de la placa de poliestireno utilizada se recubren con un anticuerpo monoclonal anti-IL-6. Luego se agregan los sueros problemas, y se lava la fracción no unida. Se adiciona después un segundo anticuerpo biotinilado que se une al complejo anteriormente formado. Una vez lavado el sobrenadante en exceso, se agrega el reactivo de revelado que consiste de una solución de sustrato (peroxidasa-estreptavidina), produciendo color, para finalmente, medir la absorbancia de cada orificio en espectrofotómetro a 450 nm (Bench Mark Microplate Reader BioRad). La concentración de cada muestra se obtuvo por extrapolación en curva de calibración realizada con los sueros controles provistos en el kit.

VIII. Medición del hematocrito y glóbulos blancos totales.

El recuento se realizó en contador hematológico automático marca Celdyn 1400. El hematocrito se expresa en % del volumen de sangre total y los glóbulos blancos en células / mm³ sobre las muestras de sangre total obtenidas en tubos con EDTA.

IX. Determinación de potasio.

La determinación de potasio se realizó con un equipo automático Ion selectivo.

X. Muestras de pacientes.

Los estudios se realizaron en distintos grupos de pacientes ingresados al Centro de Cuidados intensivos San Juan y Terapia Intensiva y Coronaria del Hospital Provincial de San Juan Dr. Guillermo Rawson. Previo a la realización de las extracciones, se obtuvieron las autorizaciones correspondientes.

• Extracción de sangre de los pacientes.

Las muestras de sangre se obtuvieron en todos los casos por punción venosa con agujas y jeringas descartables marca Dickinson y Terumo respectivamente. La toma de muestra se realizó una vez ingresado el paciente a la unidad de cuidados intensivos y a los tiempos indicados más adelante. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante para obtener sangre total y en tubo seco para obtención de sueros. Las muestras de suero se congelaron a -20°C hasta el momento de las determinaciones.

• Grupos de pacientes.

Grupo 1: Este consistió de personas ingresadas al primer centro de terapia intensiva con edades comprendidas entre 27 y 80 años, y con patologías diversas a saber: infarto agudo de miocardio, hemorragia digestiva alta y pancreatitis, insuficiencia respiratoria, miocardiopatía

dilatada, diabetes tipo II, hepatopatías, cirrosis, reingreso por insuficiencia respiratoria, traumatismo de cráneo, mieloma múltiple, celulitis, abdomen agudo, tromboembolismo pulmonar y hemorragia intracerebral.

A los pacientes se les realizó toma de muestra de sangre por punción venosa entre las 8 y 10 hs. de la mañana: al ingreso, a las 24 y 48 horas, y a los 7 y 14 días. Las muestras de sangre se recolectaron en tubo con anticoagulante y en tubo seco para obtener sangre total y suero respectivamente.

En este grupo de pacientes se realizaron las siguientes determinaciones: recuento de leucocitos totales, inmunoglobulinas G, A, M, fracción C3 y C4 del complemento, y determinación de proteínas totales y albúmina en los tiempos de muestreo. Además, con el fin de determinar posibilidad de hemodilución en parámetros sanguíneos por la suplementación de líquidos de uso corriente que se les realiza a los pacientes internados en este tipo de servicio médico, a algunos de estos pacientes se les realizó el recuento de glóbulos blancos totales y diferencial de neutrófilos y linfocitos, hematocrito, urea y potasio. Finalmente, en un número menor de pacientes se les determinó los niveles de cortisol.

Grupo 2: formado por personas adultas sanas, a las cuales se les realizó extracción de sangre por punción venosa entre las 8 y 10 hs. de la mañana, y a las 24 y 48 horas después de la primera extracción. En este grupo se determinó concentración de inmunoglobulinas G, M y A, proteínas totales, albúmina interleuquina 6, linfocitos (CD3+ y CD19+), y cortisol. Todas las determinaciones se realizaron en suero y este grupo se consideró el grupo control.

Grupo 3: grupo de pacientes ingresados a la unidad de terapia intensiva del Hospital Provincial, que involucró pacientes con dos patologías bien definidas, enfermedades cardiovasculares y politraumatizados, a los que se les realizó extracción de sangre por punción venosa a las 24 y 48 hs. del ingreso a la unidad. En este grupo se realizó determinación de hematocrito, recuento de glóbulos

blancos, recuento diferencial de neutrófilos y linfocitos, concentración de inmunoglobulinas G, A, M, porcentajes de linfocitos CD3+ y CD19+ e IL-6.

XI. Muestras de animales.

Los estudios se realizaron en distintos grupos de ratas Wistar de la misma edad gestacional de sexo masculino y femenino.

• Asfixia.

Se utilizó un modelo no invasivo en el que se sumergieron transitoriamente en agua a 37°C (AP en normotermia) o 15°C (AP en hipotermia; HIP), fetos aún contenidos dentro del útero extraído por histerectomía, de una rata preñada a término. Inmediatamente luego de la asfixia, los fetos fueron extraídos del útero y estimulados para respirar. Se observó la sobrevida durante los 40-80 minutos posteriores, y luego de ligar el cordón umbilical se colocaron con una rata madre sustituta.

• Extracción de sangre en las ratas.

Las muestras de sangre se obtuvieron en todos los casos por punción venosa con lanceta descartable de la vena terminal de la cola previo calentamiento de la misma en un recipiente de agua a 45°C. Las muestras de sangre se recolectaron en tubo seco para obtención de sueros. Las muestras de suero se congelaron a -20°C hasta el momento de las determinaciones. Todas las extracciones se realizaron a la edad de 15 días.

• Grupos de ratas.

Grupo 1: animales nacidos por cesárea (CTL). Este consistió de fetos aún contenidos dentro del útero extraído por histerectomía, de una rata preñada a término. Este grupo se consideró el grupo control.

Grupo 2: animales sometidos a asfixia durante 20 minutos a 37°C

(AP). En este grupo se sumergen transitoriamente en agua a 37°C fetos aún contenidos dentro del útero extraído por histerectomía, de una rata preñada a término. Inmediatamente luego de la asfixia, los fetos fueron extraídos del útero y estimulados para respirar. Se observó la sobrevida durante los 40-80 minutos posteriores, y luego de ligar el cordón umbilical se colocaron con una rata madre sustituta.

Grupo 3: animales sometidos a asfixia durante 15 minutos a 15°C (HIP). En este grupo se sumergen transitoriamente en agua a 15°C fetos aún contenidos dentro del útero extraído por histerectomía, de una rata preñada a término. Inmediatamente luego de la asfixia, los fetos fueron extraídos del útero y estimulados para respirar. Se observó la sobrevida durante los 40-80 minutos posteriores, y luego de ligar el cordón umbilical se colocaron con una rata madre sustituta.

En todos los grupos se realizó extracción de sangre venosa como se describió y se determinó el isotipo total de Inmunoglobulina G.

XII. Equipamiento.

- **Contador hematológico.**

Analizador hematológico multiparamétrico, marca Abbott modelo Cell-Dyn 1400. Realiza las determinaciones de los siguientes parámetros sobre sangre total extraída en EDTA: recuento de glóbulos blancos, hematíes, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, recuento de plaquetas.

- **Autoanalizador químico.**

Analizador químico multiparamétrico marca Technicon modelo RA-500 plus. Realiza las determinaciones químicas con toma automática de muestras y de reactivos, trabaja a 37°C y a diferentes longitudes de ondas calibradas automáticamente para cada una de las determinaciones por programa de computación.

- **Equipo de Ion selectivo.**

Analizador de sodio y potasio automático marca Chiron modelo 614 Na⁺/K⁺ Analyzer. Realiza las determinaciones de ambos iones por medio de electrodos de ion selectivos, calibrados contra patrón interno. Las determinaciones se realizan sin tratamiento previo.

XIII. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad InStat tm-1990-1994. GraphPad Software.

Los datos obtenidos se presentan como valores individuales o como promedios $\pm$ DS. Las comparaciones se hicieron utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples con el test de Student-Newman-Keuls. Para el análisis de frecuencias se utilizó el test de Fisher y para el análisis de dos grupos de datos el test de Mann-U-Whitney.

Dado que uno de los requisitos del ANOVA es la homogeneidad de varianzas de las poblaciones a comparar (es decir que posean DS similares), en caso de no cumplirse esta condición los datos fueron transformados, siguiendo el instructivo del programa de análisis a logaritmo o raíces cuadradas previo al análisis.

El grado de significación estadística se estableció a partir de valores de $p \leq 0.05$. Algunos resultados se expresaron como índices para lo cual se utilizó la siguiente fórmula: Índice=valor muestra problema individual/valor promedio muestras controles.

CAPITULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

Con el objetivo de examinar el comportamiento del sistema inmune en un estado de estrés agudo, en pacientes con diferentes patologías ingresados en la unidad de cuidados intensivos evaluamos en una primera etapa parámetros bioquímicos e inmunes en función del tiempo de permanencia en la misma (grupo 1). Para poder comparar los cambios de los parámetros en los diferentes grupos se realizaron las mismas determinaciones en individuos sanos que se consideraron como controles (grupo 2). En una segunda etapa, los pacientes fueron agrupados por patología considerándose entonces, los grupos “cardíacos” y “politraumatizados” (grupo 3).

Todos los parámetros se midieron en muestras de sangre obtenidas bajo las mismas condiciones técnicas y en cuanto al tiempo del muestreo.

Además para comparar el efecto del estrés agudo sobre parámetros del sistema inmune se utilizó un modelo de asfixia perinatal en ratas, las que estarían expuestas a un estado similar de este tipo de estrés. Para tal fin se utilizaron ratas Wistar de la misma edad gestacional. Se estudió un solo parámetro inmune considerando diferentes grupos: grupo control; animales sometidos a asfixia durante 20 minutos a 37°C (AP); y animales sometidos a asfixia en condiciones de hipotermia, durante 15 minutos a 15°C.

I. Determinación de inmunoglobulinas.

A. Pacientes.

A.I Pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos con diferentes patologías (grupo 1).

Con la finalidad de evaluar si la internación y la permanencia en terapia intensiva producen cambios en los valores de las inmunoglobulinas se determinaron concentraciones de inmunoglobulinas G, A y M en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (grupo 1), al momento del ingreso, a las 24 y 48 horas, y a los siete y catorce días y en un grupo de adultos sanos

(grupo 2) en un momento determinado y a las 48 horas de la primera extracción. En este grupo, no se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos en un momento dado y a las 48 horas posteriores, por lo que se consideraron como un único grupo de valores, denominándose en lo sucesivo, grupo control. Las inmunoglobulinas se determinaron en suero por inmunodifusión radial simple. Los resultados se expresaron como índices, para lo cual, los valores de inmunoglobulinas en mg/dl de cada uno de los controles y de los pacientes se dividieron por los valores promedios de inmunoglobulinas de los controles según la fórmula descripta en Materiales y Métodos (punto XII).

En la figura 5 (A y B), se muestran los valores de índices para la concentración de IgG en función del tiempo. En la figura 5A, los valores se grafican como promedio de índices por grupo y en la figura 5B como índices individuales.

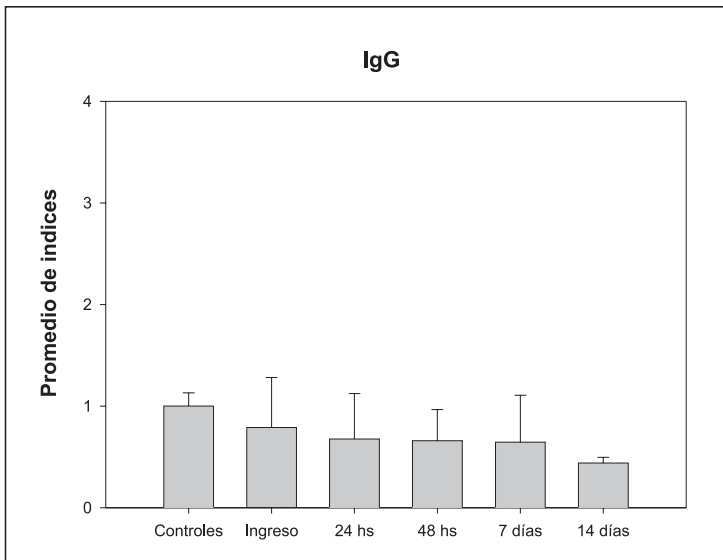


Figura 5A: Promedio de índices de IgG en función del tiempo en pacientes del grupo 1.

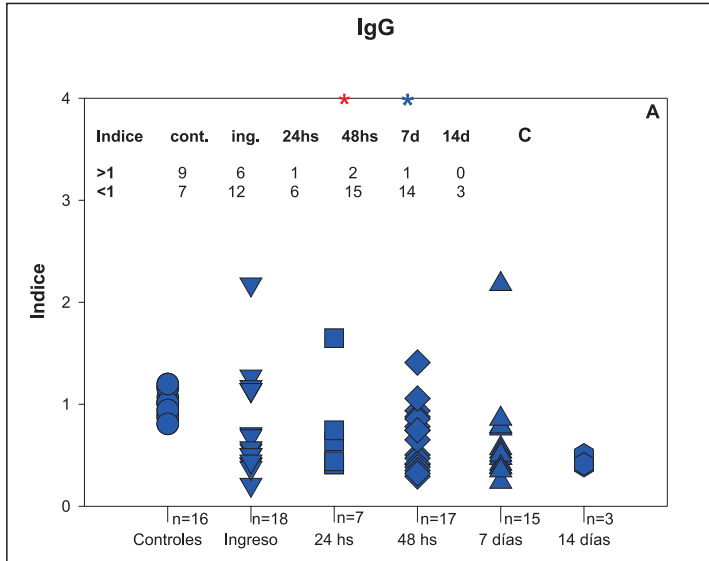


Figura 5B: Valores de índices de IgG en función del tiempo de pacientes del grupo 1 y controles. * pacientes 48 horas vs controles (<1), $p \leq 0.01$; * pacientes 7 días vs controles (<1), $p \leq 0.0059$.

La comparación de los valores de índices promedios no fue significativa. Sin embargo, cuando se compararon las frecuencias de índices mayores a 1 o menores a 1 (ver recuadro C de la figura 5B), se observó que en los estudios realizados a las 48 horas y a los 7 días, había diferencias significativas comparado con los controles (Fisher's test $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.0059$ respectivamente).

Este estudio se completó con el análisis de regresión que evidenció una disminución en los valores de IgG en el tiempo (figura 6).

En cuanto a la IgM, luego de un análisis similar, se observó que los índices promedios no resultaron significativamente diferentes (figura 7), pero la comparación de la frecuencia de valores mayor a 1 y menor a 1 (panel B, figura 7) fue significativa para el grupo 1 de pacientes a las 48 horas del ingreso y a los 7 días comparado con el grupo control (Fisher's test $p \leq 0.0366$ y $p \leq 0.0106$, respectivamente). Como se observa en la figura 8 el análisis de regresión índice vs tiempo

para esta inmunoglobulina evidenció un incremento significativo en función del tiempo (figura 8, $r^2 = 0.7956$, $r = +0.8920$, $p \leq 0.04$).

Con respecto de la concentración de IgA cuando se realizó un análisis similar al descrito para la IgG, no se observaron cambios significativos en el tiempo como puede observarse en las figuras 9 y 10.

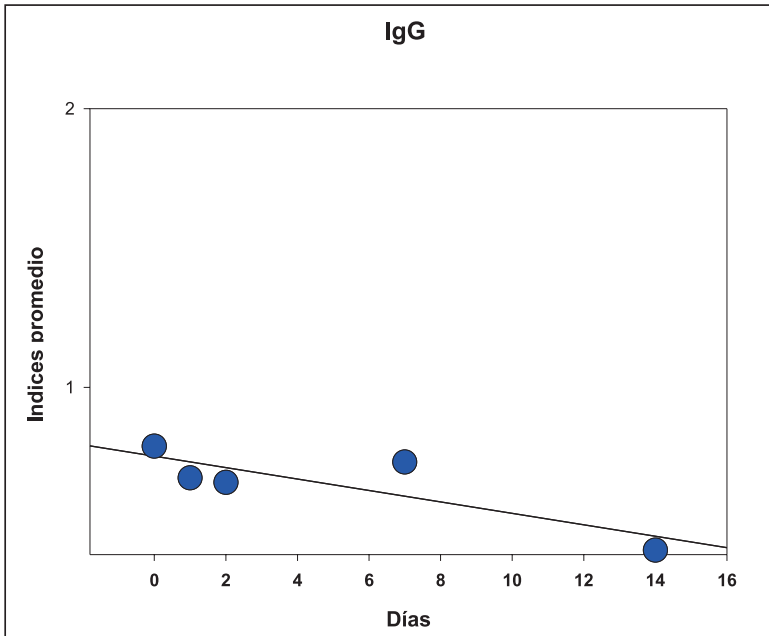


Figura 6: Indices promedio de IgG en función del tiempo en pacientes del grupo 1. Resultados estadísticos; $r^2 = 0.87$, $r = -0.93$, $p \leq 0.01$.

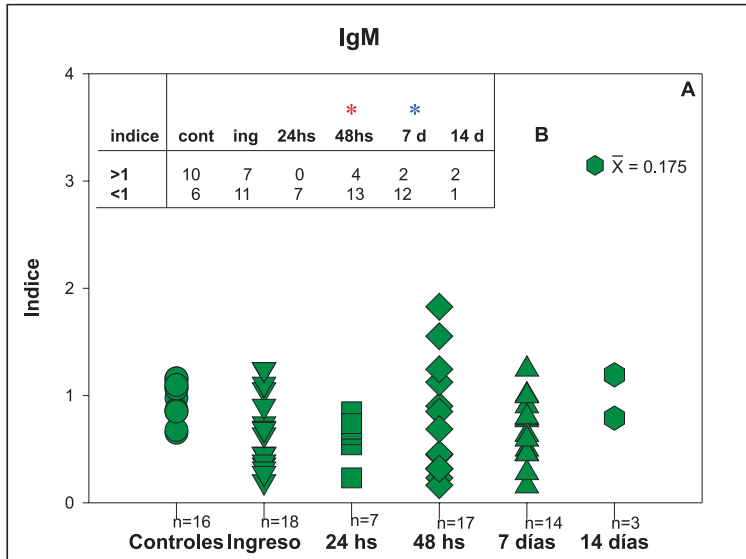


Figura 7: Valores de índices de IgM en función del tiempo de pacientes del grupo 1 y controles. * pacientes 48 horas vs controles, $p \leq 0.0366$; * pacientes 7 días vs controles, $p \leq 0.0106$.

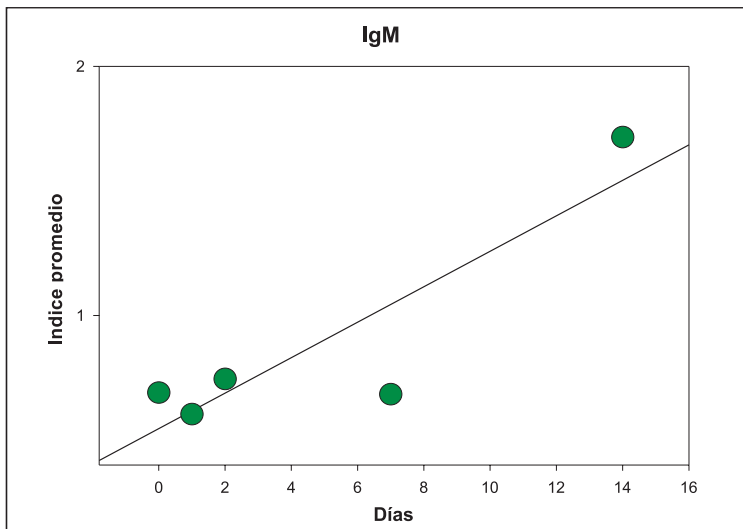


Figura 8: Índices promedio en función del tiempo de IgM en pacientes del grupo 1. Resultados estadísticos; $r^2 = 0.7956$, $r = +0.8920$, $p \leq 0.04$.

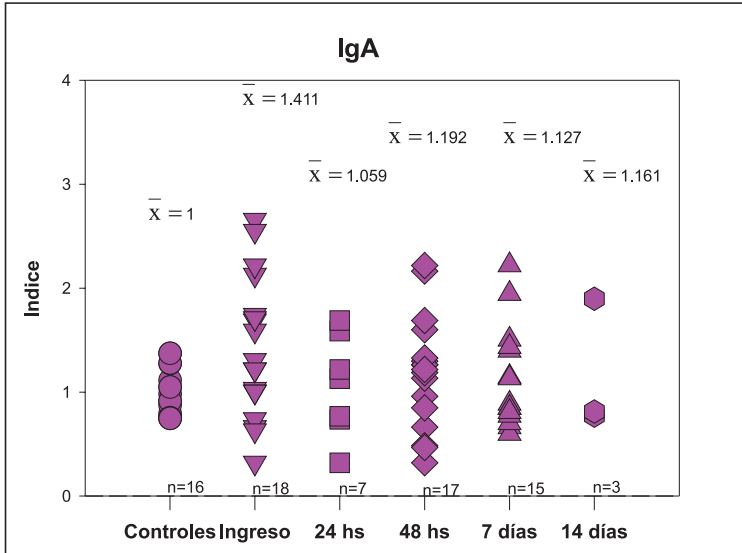


Figura 9: Valores de índices de IgA en función del tiempo de pacientes del grupo 1 y controles.

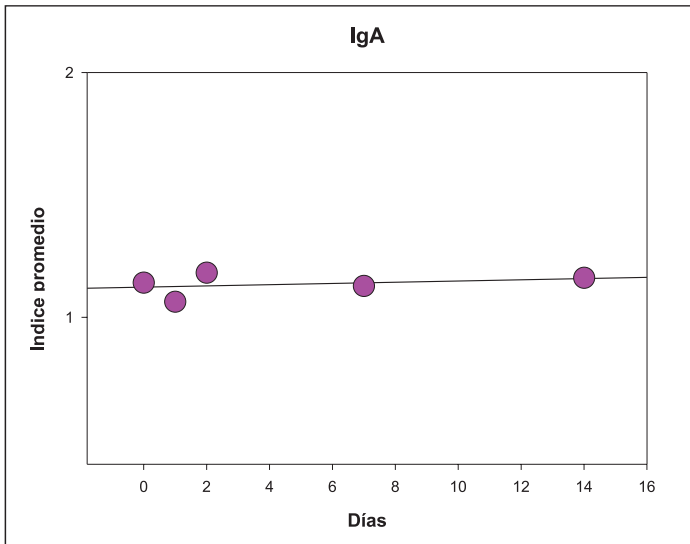


Figura 10: Índices promedio de IgA en función del tiempo en pacientes del grupo 1. Resultados estadísticos: $r^2 = 0.086$, $r = -0.2937$, $p \leq 0.05$.

A.II Pacientes cardíacos y politraumatizados (grupo 3).

Con el objeto de homogeneizar las muestras, es que se trabajó sobre dos conjuntos de pacientes agrupados por una misma patología de ingreso a la unidad: pacientes cardíacos y pacientes politraumatizados, en los que se evaluaron cambios en las concentraciones de inmunoglobulinas a las 48 horas después de la primera extracción.

Se realizó el mismo proceso matemático y estadístico que en el grupo anterior, comparándose los promedios de los índices de valores de concentración de inmunoglobulinas G, A y M entre los controles (grupo 2), los pacientes del grupo 1, y los pacientes cardíacos o politraumatizados (grupo 3). Nuevamente, no se observaron diferencias al analizar los valores promedios para concentraciones de IgG y IgM (figuras 11 y 12 respectivamente), pero sí se obtuvieron diferencias significativas con el análisis de las frecuencias detalladas en cada panel B, en los pacientes politraumatizados a las 48 horas de su ingreso con respecto a los controles (Fisher's test $p \leq 0.003$ y $p \leq 0.0076$ respectivamente). Con respecto al grupo 1, ya hemos mencionado que se encontraron diferencias significativas con respecto a controles (figuras 5B y 7 respectivamente). No se observaron diferencias en los valores de inmunoglobulina A (figura 13).

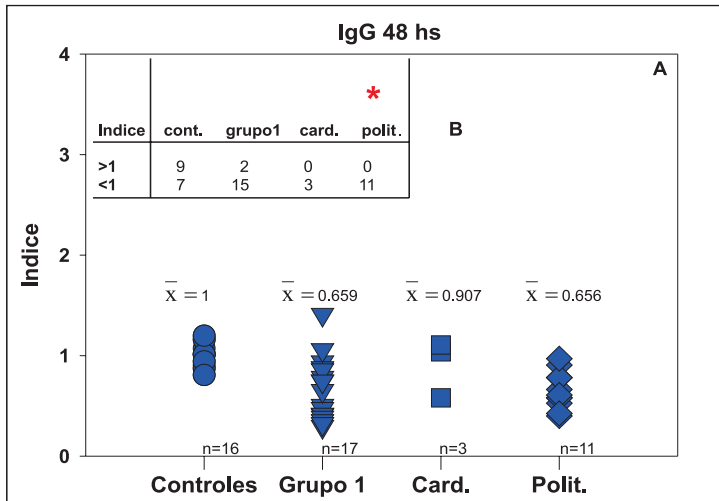


Figura 11: Valores de índices de IgG a las 48 horas de ingreso en pacientes cardíacos y politraumatizados. * politraumatizados vs controles, $p \leq 0.003$.

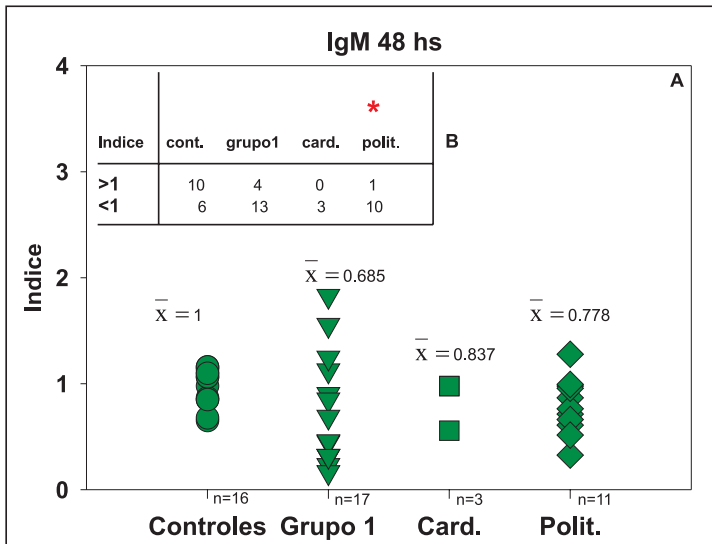


Figura 12: Valores de índices de IgM a las 48 horas de ingreso en pacientes cardíacos y politraumatizados. * politraumatizados vs. controles, $p \leq 0.0076$.

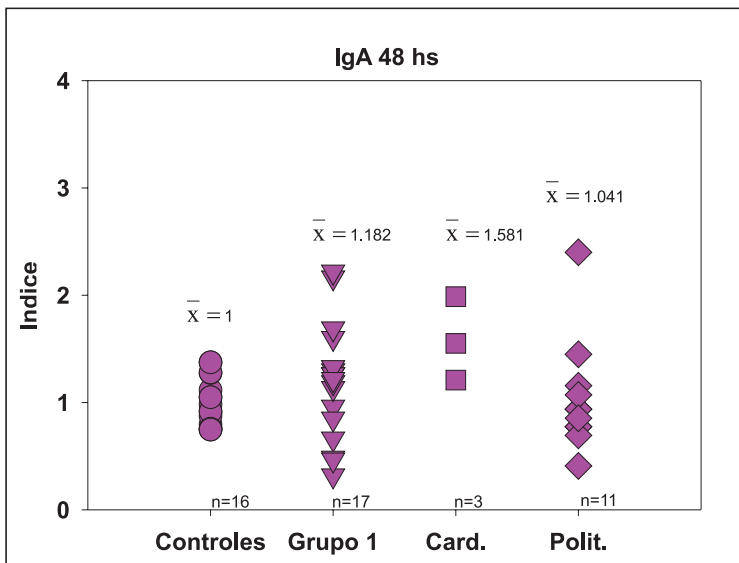


Figura 13: Valores de índices de IgA a las 48 horas de ingreso en pacientes cardíacos y politraumatizados.

B. Ratas.

Se midieron los diámetros de los halos de precipitación expresando los resultados en mm. Del análisis de los resultados se puede determinar que el promedio de los valores del grupo control fue de 7.7 ± 0.62 mm; grupo hipotermia de 7.23 ± 0.25 mm; y el asfíctico de 6.0 ± 0.10 mm.

Al comparar los promedios se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el asfíctico ($p=0.0096$)

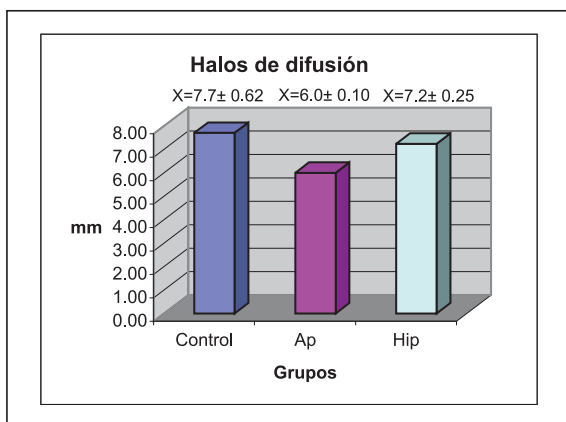


Figura 14: Valores de halos de difusión en mm en los grupos de ratas control, asfícticas (AP) e asfícticas en hipotermia (Hip).

II. Determinación de leucocitos.

El número y proporción de leucocitos en sangre circulante es un importante reflejo del estado de activación y vigilancia del sistema inmune. En trabajos recientes con modelos animales y humanos se ha observado que el estrés agudo induce cambios profundos y reversibles en la concentración de leucocitos totales en sangre periférica como también en la distribución de subpoblaciones de leucocitos (15,16).

• **Pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos con diferentes patologías (grupo 1).**

En esta etapa, se evaluó si la internación y la permanencia en terapia intensiva producen cambios en los valores de leucocitos totales en pacientes ingresados en dicha unidad (grupo 1) comparados con el grupo de adultos sanos (grupo 2). La medición de leucocitos se realizó con contador hematológico de células y los resultados, expresados como células por mm^3 , fueron transformados en logaritmo de la concentración de células por mm^3 a los fines del análisis estadístico (materiales y métodos, punto XII).

En la figura 15, se muestra la variación de la concentración de leucocitos en función del tiempo observándose diferencias significativas en los pacientes en el momento del ingreso y a las 24 y 48 horas respecto del grupo control. Ingreso ($p \leq 0.01$), 24 horas ($p \leq 0.01$), 48 horas ($p \leq 0.05$).

En un número menor de pacientes del mismo grupo, se pudo realizar un seguimiento más prolongado de la concentración de leucocitos; los valores obtenidos, expresados como logaritmo y promedio se graficaron en función del tiempo observándose la tendencia que muestra la figura 16.

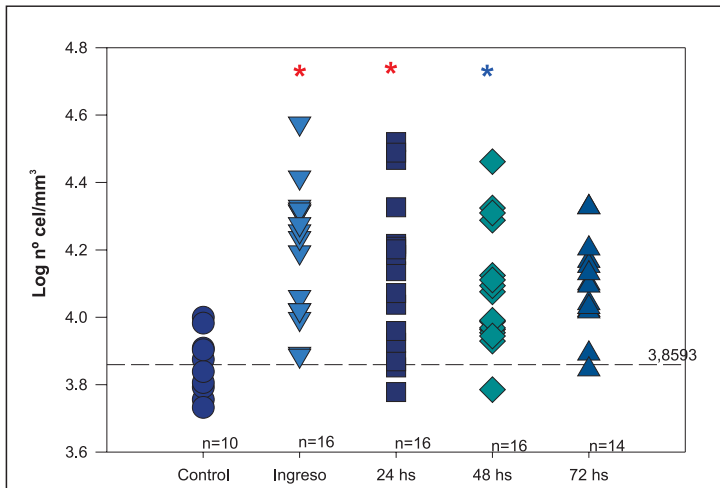


Figura 15: Valores de logaritmo de la concentración de leucocitos en función del tiempo de pacientes del grupo 1 y controles. * Ingreso vs controles, $p \leq 0.01$;

* 24 horas vs controles, $p \leq 0.01$; * 48 horas vs controles, $p \leq 0.05$.
La línea de puntos representa el valor promedio del grupo control (3.859).

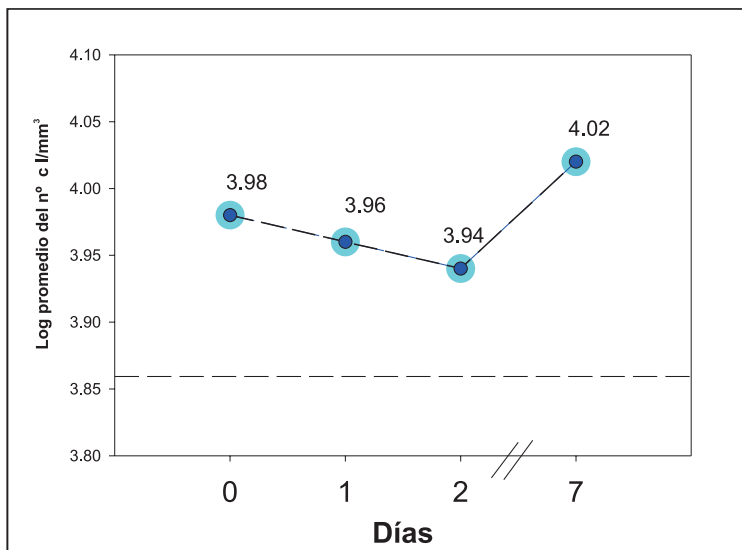


Figura 16: Valores de logaritmo promedio de la concentración de leucocitos en función del tiempo. La línea de puntos representa el valor promedio del grupo control (3,859).

• Pacientes cardíacos y politraumatizados (grupo 3).

Teniendo en cuenta que la tendencia mostró una disminución en la concentración de leucocitos a las 24 y 48 horas después del ingreso (figuras 15 y 16), se procedió a analizar este comportamiento en los tres grupos: controles sanos (grupo 2), pacientes con patologías diversas (grupo 1), y pacientes con patologías similares: cardíacos y politraumatizados (grupo 3), a las 24 y a las 48 horas después del ingreso.

Los resultados se expresaron como el logaritmo de la concentración de leucocitos por mm^3 (figura 17). Se observaron diferencias significativas entre pacientes del grupo 1 vs. controles a las 24 y a las 48 horas ($p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$ respectivamente) y entre pacientes del grupo 1 y cardíacos ambos a las 48 horas.

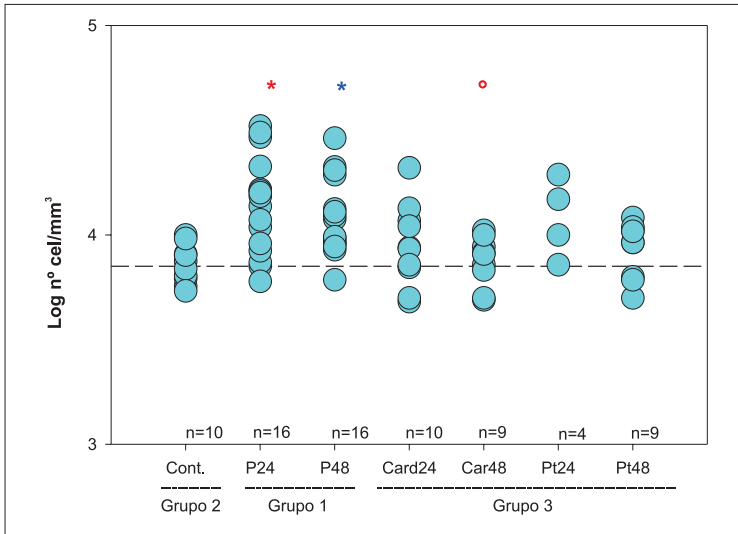


Figura 17: Valores de logaritmo de la concentración de leucocitos de los grupos 1, 2 y 3. * Pacientes (grupo 1) 24 horas vs controles $p \leq 0.01$, * pacientes (grupo 1) 48 horas vs controles $p \leq 0.05$, ° pacientes (grupo 1) 48 horas vs. cardíacos 48 horas $p \leq 0.05$. La línea de puntos representa el valor promedio del grupo control (3,8593).

Al comparar el logaritmo de la concentración de leucocitos de pacientes del grupo 3 (cardíacos y politraumatizados) a las 24 y a las 48 horas con el grupo 2 (controles), no se observaron diferencias significativas.

III. Determinación de subpoblaciones leucocitarias, linfocitos T (CD3+) y linfocitos B (CD19+).

Trabajos tanto en humanos como en animales han demostrado que el estrés agudo produce cambios reversibles en las subpoblaciones linfocitarias posiblemente debidos a una redistribución selectiva de los grupos de linfocitos entre los órganos (15, 16).

Con el objeto de observar si se produjeron cambios en las subpoblaciones linfocitarias a las 24 y 48 horas del ingreso es que se determinó el porcentaje de linfocitos CD3+ y linfocitos CD19+ en el grupo 3 de pacientes cardíacos y politraumatizados y en el grupo de

controles (grupo 2). Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales específicos contra las cadenas CD3 que acompañan al receptor de los linfocitos T (TCR) y contra las cadenas CD19 que lo hacen con el receptor de linfocitos B (BCR), y se midieron en un Citómetro de Flujo. Los valores de cada grupo se obtuvieron a través del análisis de datos, como se menciona en materiales y métodos. Los resultados se expresaron como porcentaje y los mismos se transformaron a logaritmo o raíz cuadrada a los efectos de realizar el análisis estadístico.

• Determinación de linfocitos CD3+.

En la figura 18 se representan los valores obtenidos en el grupo control, y en los pacientes cardíacos y politraumatizados (grupo 3) a las 24 y a las 48 horas después del ingreso. Se observaron diferencias significativas en los valores de linfocitos CD3+ a las 48 horas en los pacientes cardíacos y politraumatizados respecto de los controles ($p \leq 0.05$) y entre las muestras de cardíacos y politraumatizados tomadas a las 24 horas ($p \leq 0.05$).

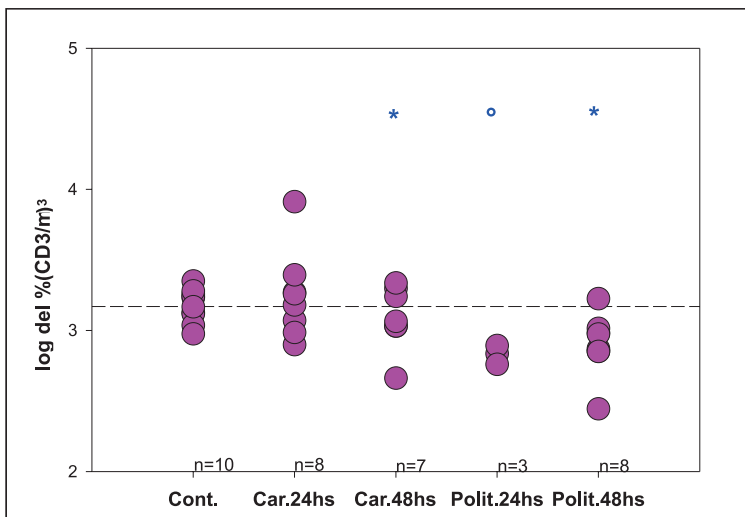


Figura 18: Logaritmo del porcentaje de linfocitos CD3+ en cardíacos y politraumatizados y controles. * Cardíacos y politraumatizados 48 horas vs controles, $p \leq 0.05$; ° politraumatizados 24 horas vs cardíacos 24 hs ($p \leq 0.05$). La línea de puntos representa el valor promedio para el grupo control (3,17).

• Determinación de linfocitos CD19+.

La determinación de linfocitos CD19+ se realizó en muestras de controles y de pacientes politraumatizados tomadas a las 48 horas del ingreso.

La figura 19 muestra los resultados representados como el logaritmo de la concentración de células por mm^3 . Entre estos grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

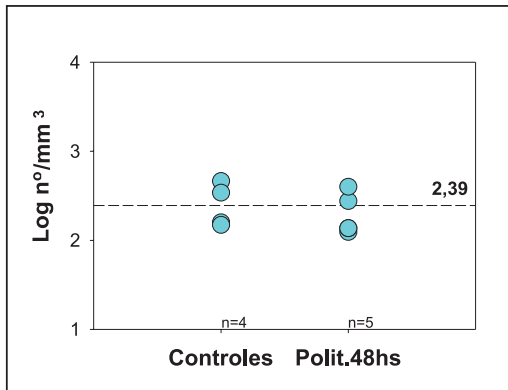


Figura 19: Valores de logaritmo de la concentración de células CD19+ / mm^3 de pacientes politraumatizados 48 horas y control. La línea de puntos representa el valor promedio del grupo control (2.39).

IV. Determinación de interleuquina 6 (IL-6).

Estudios en humanos y en animales han demostrado que las citoquinas son liberadas en altas concentraciones por distintos tipos celulares durante situaciones estresantes como inflamación, infección, traumatismo, hemorragia, dolor, hipertermia, etc. Además de su acción autocrina y paracrina estas proteínas, y principalmente la IL-6, actúan como hormonas que regulan las reacciones de fase aguda e influyen en el eje endocrino, el sistema inmune y en el metabolismo intermedio (23).

Se ha estudiado la IL-6 en pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos no seleccionados por patologías o por edades, y se ha visto que la misma está incrementada en el día de admisión de

los pacientes y en los días subsiguientes, observándose que la concentración fluctúa según la seriedad de la patología y con cada paciente en particular (24).

Con la finalidad de determinar variaciones en la concentración de IL-6 en distintos pacientes ingresados a terapia intensiva, se determinó esta citoquina en el grupo de pacientes cardíacos y politraumatizados (grupo 3) y se las comparó con el grupo control (grupo 2). La determinación se realizó en muestras de los pacientes cardíacos a las 24 y 48 horas y de los pacientes politraumatizados a las 48 horas del ingreso. Los valores se expresaron en picogramos por mililitro (pg/ml).

Teniendo en cuenta que el fabricante del reactivo considera como límite superior normal de esta citoquina a 20 pg/ml, se realizó un análisis de frecuencias para los distintos grupos, considerando valores mayores a 20 pg/ml o menores a 20 pg/ml, tal como se detalla en el panel B de la figura 20. Con este análisis, se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de politraumatizados del grupo 3 (Fisher's test $p \leq 0.01$).

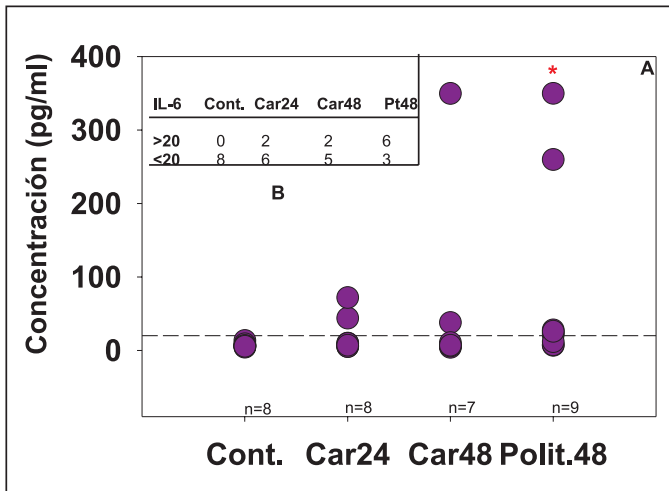


Figura 20: Valores de concentración de IL-6 en controles, cardíacos a las 24 y 48 horas y politraumatizados a las 48 horas. La línea de puntos corresponde al límite superior del rango normal de esta citoquina. * Politraumatizados 48 horas vs controles, $p \leq 0.01$.

Los resultados de la concentración de IL-6 en los distintos grupos también se expresaron como índices (figura 21), para lo cual, los valores de IL-6 en pg/ml de cada una de las muestras se dividieron por el valor promedio de IL-6 del grupo control según fórmula descripta en Materiales y Métodos. Como puede observarse en la figura 21, los resultados son similares a los mostrados en la figura previa.

Finalmente, los datos de concentración de IL-6 fueron transformados a logaritmo y los promedios de cada grupo calculados, tal como se muestra en la figura 22. En este caso, se observa la misma tendencia, aunque la diferencia entre los distintos grupos no es significativa.

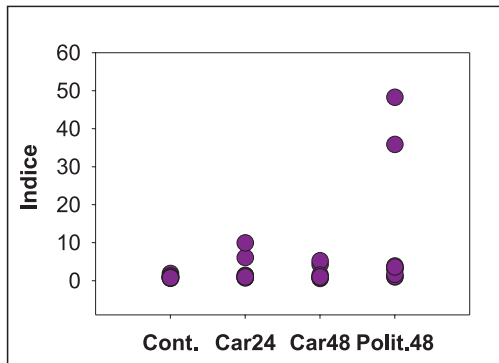


Figura 21: Valores de índices de IL-6 en grupo control, cardíacos a las 24 y 48 horas y en politraumatizados a las 48 horas.

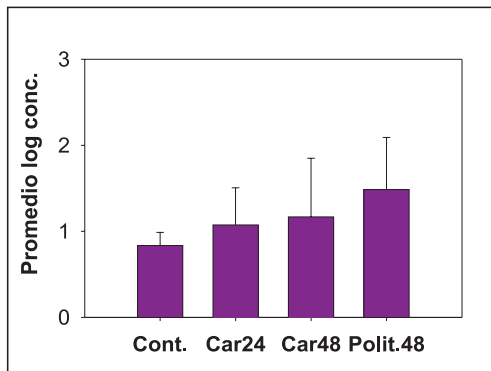


Figura 22: Valores promedio de logaritmo de la concentración de IL-6 en el grupo control, cardíacos 24 y 48 horas y politraumatizados 48 horas.

V. Determinación de cortisol.

Se ha observado que en las situaciones de estrés agudo donde existe daño físico, dolor o inflamación se modifica la homeostasis del organismo por alteración o cambio del equilibrio de varias hormonas como los corticoides y sustancias que tienen un efecto significativo sobre el sistema nervioso, el endocrino y el inmune (1, 5).

Los glucocorticoides ejercen diferentes acciones una vez secretados, incluyendo efectos sobre la función cardíaca, el metabolismo, el músculo, la conducta y el sistema inmune (21). Además, tienen efectos sobre la inmunidad innata y adaptativa, regulan la fagocitosis, la actividad de células presentadoras de antígenos, afectan la ontogenia, la proliferación y la supervivencia de linfocitos.

Con el fin de evaluar los posibles cambios en los valores de la concentración de corticoides debidos a la internación y la permanencia en terapia intensiva, se determinó la concentración de cortisol en el grupo 2 (control), en una primera extracción y a las 24 horas, y en pacientes con patologías diversas (grupo 1) a las 24 y 48 horas de la internación. En la figura 23, se muestran los valores de cortisol en microgramos por decilitro (ug/dl), existiendo diferencias significativas entre los valores obtenidos a las 24 horas en el grupo de pacientes (grupo 1), con respecto a los controles ($p \leq 0.05$). No se observan diferencias en los valores de las muestras del grupo control.

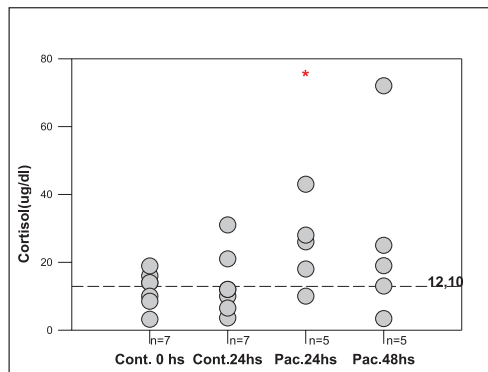


Figura 23: Valores de concentración de cortisol en controles al las 0 y 24 horas y en pacientes a las 24 y 48 horas de la internación. * Pacientes 24 hs vs controles 24 hs $p \leq 0.05$. La línea de puntos corresponde al valor promedio del grupo control en la muestra inicial (12,10 ug/dl).

VI. Determinaciones de proteínas totales, albúmina, complemento C3, C4, urea, potasio y hematocrito.

Con el objeto de observar si la internación de pacientes en terapia intensiva produce cambios en función del tiempo en parámetros bioquímicos, se determinaron concentraciones de proteínas totales, albúmina, urea, fracciones del complemento C3 y C4, potasio y el porcentaje de hematocrito, en pacientes del grupo 1. Las determinaciones se realizaron al ingreso, a las 24 y 48 horas, y a los 7 días.

Los resultados se muestran en la tabla 1, y luego de aplicar el análisis estadístico correspondiente, no se observan diferencias significativas de los valores en función del tiempo. Solo se observa una diferencia marginalmente significativa para los valores de urea ($p \leq 0.055$) a los 7 días vs el grupo control, y al aplicar análisis de regresión se evidencia una tendencia de incremento en función del tiempo como muestra la figura 24 ($r^2 = 0.8920$, $r = 0.9445$, $p \leq 0.055$).

Muestreo Parámetro	Ingreso	24 horas	48 horas	7 días	Valores normales
Proteínas totales (g/l)	62.7(16) SD= 11.04	60.3(6) SD= 7.16	54.2(15) SD= 12.7	57.2(10) SD= 10.71	(61-79)
Albúmina (g/l)	31.6(16) SD= 5.94	28.0(6) SD= 5.46	27.4(15) SD= 4.87	29(10) SD= 6.20	(35-48)
C3 (mg/dl)	121.9(18) SD= 38.97	127.7(7) SD= 19.77	110.3(17) SD= 56.72	111.9(15) SD= 65.42	(80-160)
C4 (mg/dl)	34.8(18) SD= 15.29	28.8(7) SD= 12.24	31.0(17) SD= 15.16	32.6(15) SD= 14.58	(20-40)
Urea (g/l)	0.50(14) SD= 0.23	0.50(15) SD= 0.28	0.54(15) SD= 0.33	0.57(14) SD= 0.30	(0.10-0.50)
Potasio (mEq/l)	4.3(15) SD= 0.56	4.2(15) SD= 0.50	4.2(15) SD= 0.65	4.3(14) SD= 0.72	(3.5-4.5)
Hematocrito %	34.4(16) SD= 8.59	34.6(16) SD= 8.97	34.2(16) SD= 8.04	34.1(14) SD= 7.49	(35-45)

Tabla 1: Promedio de valores de proteínas totales(g/l), albúmina (g/l), fracciones C3 y C4 del complemento (mg/dl), urea (g/l), potasio (mEq/l) y hematocrito en %. Los números entre paréntesis indican el número de pacientes muestreados a los distintos tiempos.

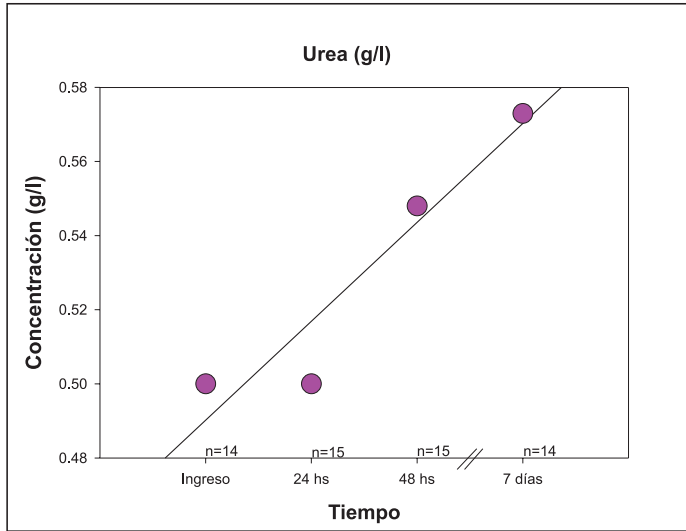


Figura 24: Promedios de concentraciones de urea en g/l en pacientes del grupo 1 en función del tiempo; $r^2=0.8920$, $r=0.9445$, $p\leq 0.05$.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Progresos recientes en neuroendocrinología e inmunología han demostrado que el estrés agudo influye sobre el sistema inmune, y han elucidado algunos de los mecanismos que determinan los cambios bioquímicos e inmunológicos (2).

No está claro en qué magnitud estresores físicos o psíquicos influyen sobre el sistema inmune. Para poder entender o conocer cambios inmunes inducidos por estrés, se han realizado diferentes tipos de estudios que incluyen la medición de parámetros inmunes en personas sometidas a estresores como hipoxia, cirugía, hipertermia, infecciones, hemorragias, infarto de miocardio y ejercicios intensos. En modelos murinos, los animales se someten a estímulos por medio de choques eléctricos, inmovilización, etc.

Los disturbios psicológicos que experimentan los pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos pueden tener implicancias para su integridad fisiológica, emocional, y para el progreso y subsecuente recuperación; estos disturbios son producidos por la patología en sí misma, por la privación sensorial y la sobrecarga física-emocional del ambiente en tales unidades (4). Con el fin de evaluar el impacto del estrés sobre el sistema inmune se ha estudiado la relación de las situaciones estresantes que experimentan los pacientes ingresados a este tipo de unidades y ciertos parámetros bioquímicos e inmunológicos como determinación de glóbulos blancos, citoquinas, anticuerpos, linfocitos y reacciones de hipersensibilidad retardada entre otros (36, 37, 38, 39, 40).

Como la respuesta adaptativa al estrés depende de la calidad (físico, emocional, etc.), de la fuerza y duración del estresor o estímulo, como así también del estado general del organismo, este trabajo de tesis comprendió el estudio de pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos afectados por distintas patologías o con patologías similares. De esta manera, el interés de este estudio fue evaluar si las perturbaciones propias de las distintas patologías, más la sobrecarga física-emocional del ambiente de tales unidades determinaba algún

patrón de alteraciones en particular.

Como se ha descripto en Materiales y Métodos, se estudiaron parámetros bioquímicos e inmunológicos en un grupo de pacientes con diferentes patologías de ingreso y en un grupo donde los pacientes fueron agrupados por patologías similares: cardíacos y politraumatizados. Además, se estudió el isotipo de inmunoglobulina IgG en un modelo de asfixia perinatal en ratas.

En términos generales se observó que tanto los pacientes con diferentes patologías (grupo 1) como los cardíacos o politraumatizados (grupo 3), presentaron los siguientes resultados en parámetros inmunológicos y bioquímicos:

- Disminución de inmunoglobulinas.
- Incremento del número total de leucocitos.
- Disminución del porcentaje de linfocitos CD3+.
- Ninguna alteración del porcentaje de linfocitos CD19+.
- Incremento de cortisol.
- Incremento de Interleuquina 6.

En cuanto al experimento en el modelo con ratas se observó el siguiente resultado:

- Disminución de inmunoglobulina G.

Cuando el organismo se encuentra por primera vez con un antígeno que reconoce como no propio, se desencadena lo que se llama respuesta inmune primaria que se caracteriza por un lento incremento en la concentración plasmática de anticuerpos los que se detectan a partir del 4to-5to día luego del contacto con el antígeno. Los anticuerpos más tempranos son del isotipo IgM. Los anticuerpos de tipo IgG se detectan más tardíamente pudiendo, en la respuesta primaria, alcanzar niveles superiores o iguales a los de IgM. La reexposición del organismo inmunocompetente al mismo antígeno, genera la denominada respuesta inmune secundaria que se diferencia

de la respuesta primaria porque tiene una fase de latencia más breve y los títulos de anticuerpos son mucho más elevados, diez o más veces que en la respuesta primaria. Con respecto al isotipo de anticuerpo, la IgM forma parte de una porción importante en la respuesta primaria, en cambio la IgG predomina en la respuesta secundaria, y además tiene una afinidad mayor por el antígeno extraño.

La alteración en los niveles de anticuerpos como también la cinética y producción de los mismos por células B están muy relacionados con los mecanismos de estrés y se ha estudiado tanto en modelos animales como en humanos (14, 41, 42, 43, 44, 45).

Tomasi y cols. (46), reportaron supresión en los niveles de inmunoglobulina A secretoria en esquiadores luego de una carrera. Este hallazgo fue confirmado por la disminución en un 70% en los niveles de IgA secretoria a partir de las 2 horas post-ejercicio, persistiendo por varias horas. En una experiencia similar con esquiadores se estimularon in vitro células CD19+ productoras de inmunoglobulinas con distintos mitógenos, observando nuevamente que la concentración de IgA disminuyó dos horas después del ejercicio sin variación en las fracciones de linfocitos B antes y después del mismo. Esto demostró que la supresión en la producción de inmunoglobulinas no fue debida al cambio en el número de células B productoras de anticuerpos (12).

El estrés físico aumenta la concentración de un gran número de hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores en sangre circulante incluyendo adrenalina, noradrenalina, β -endorfinas, ACTH y cortisol. Además, todo ejercicio incrementa la concentración de interleuquinas en plasma. Se ha observado aumento de IL-6 luego de carreras muy largas, como así también de IL-1 y TNF- α (27, 46). Este desbalance de interleuquinas podría llevar a la supresión o redistribución de varios subgrupos de células del sistema inmune tanto en sangre circulante como en órganos linfoides.

En el presente trabajo se encontró una disminución para las inmunoglobulinas G y M a las 48 horas del ingreso siendo mayor en el grupo de pacientes politraumatizados que en pacientes cardíacos y pacientes con patologías diversas.

En el modelo de asfixia en ratas se observó una disminución de

los niveles de inmunoglobulina G en los animales sometidos a asfixia a 37°C con respecto al grupo control. No se observaron diferencias entre este grupo y las ratas sometidas a asfixia en hipotermia a 15°C. Podemos inferir que la hipotermia evitó la disminución de isotipos de inmunoglobulinas como la IgG, quizás disminuyendo el catabolismo proteico, evitando pasaje al líquido extracelular o evitando la supresión en la cooperación y producción de anticuerpos.

Trabajos realizados en humanos y en ratones han determinado la influencia del estrés agudo sobre la magnitud en la producción de anticuerpos. Distintos estresores han sido estudiados en forma aislada y han surgido observaciones que demuestran retardo en la producción de anticuerpos como también disminución en la concentración de los mismos (14, 43, 44). Estudios en humanos realizando ejercicios intensos, han mostrado disminución significativa en el número de células productoras de anticuerpos que se recuperan en número luego del ejercicio, pero no se ha observado cambio en el número de células CD20+ (linfocitos B). Se postula que la supresión en las células productoras de anticuerpos sería debida a interleuquinas como IL-1, IL-6 y TNF- α secretadas por células activadas por el estrés agudo como los monocitos (12). En los trabajos de Firdaus y colaboradores (15, 16) el número y porcentaje de linfocitos B (CD19+) disminuye concomitantemente con el de linfocitos T (CD3+). En el presente trabajo no se observan los mismos efectos con respecto a este subgrupo de linfocitos. Futuros trabajos podrían estudiar la correlación de la disminución de los distintos grupos de leucocitos con la incidencia de infecciones, en pacientes ingresados a estas unidades de cuidados intensivos.

Con respecto a la IgA se han realizado estudios en personas sometidas a estrés físico por ejercicios intensos como corredores o esquíadores, y se ha demostrado disminución de los valores de IgA secretora 72 horas posteriores al esfuerzo (46). Trabajos en ratones infectados por virus influenza, demuestran que el estrés por inmovilización retarda el cambio de isotipo, la cinética en la producción de IgA y la magnitud en la concentración de la misma (47).

En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en los niveles de IgA en función del tiempo tanto en el primer grupo

de pacientes ingresados a terapia intensiva que involucró patologías diversas como tampoco en los grupos de pacientes cardíacos y politraumatizados.

El término inmunidad mediada por células se ha empleado para describir reacciones inmunes dirigidas por ejemplo contra microorganismos intracelulares mediadas por linfocitos o fagocitos, y en las que los anticuerpos desempeñan un rol secundario. Pero no se puede considerar totalmente por separadas ambas respuestas ya que actúan en conjunto dependiendo del antígeno involucrado (48, 49).

La célula T efectora en este mecanismo es el linfocito T CD3+ CD4+, el cual se activa en un primer contacto con el antígeno que es presentado luego de ser procesado por una célula presentadora de antígeno y esto ocurre en general en los ganglios regionales próximos al sitio del ingreso del antígeno. Luego que los linfocitos CD4+ se activan y proliferan, una parte se transforma en células de memoria y otra en células efectoras. Cuando se produce el reingreso del antígeno, el linfocito de memoria migra en 24 a 48 horas hacia esa zona y desencadena el reclutamiento de macrófagos para tratar de eliminarlo. Una forma de medir la funcionalidad de la IMC es realizando pruebas de hipersensibilidad cutánea con diversos antígenos. Esto consiste en inyectar por vía intradérmica diversos antígenos, (tuberculina, candidina, glóbulos rojos de carnero, etc.), y medir el diámetro de la pápula formada entre las 48 y 72 horas después de la inyección.

Experimentos tanto en humanos como en animales demuestran que distintos estresores también afectan las respuestas inmunes mediadas por células. Si se someten animales a estresores como el aislamiento, se observa que éste altera las pruebas de hipersensibilidad retardada (HTR). Factores como el calor o el frío incrementan esta prueba cuando se someten los animales al estresor en forma aguda (50). Contrario al pensamiento de que el estrés siempre suprime las respuestas inmunes, se ha visto que estresores de corta duración (estrés agudo), pueden aumentar las pruebas de HTR. Estudios iniciales en ratones han demostrado que un estrés agudo (2 horas de inmovilización), resulta en un incremento de la HTR hacia antígenos administrados por vía subcutánea. El análisis histológico de muestras

de piel de los animales muestra un gran número de leucocitos en los ratones estresados (51).

Se ha llegado a la misma conclusión trabajando con modelos en ratas a las cuales se les indujo una dermatitis alérgica de contacto con 2-dinitrofenol sobre el pabellón de la oreja, reacción inmune que pertenece también a reacciones de hipersensibilidad y respuestas de linfocitos T antígeno específicas. Las ratas fueron estresadas por inmovilización en tubos de vidrio con suficiente aire, pero privadas de comida y agua. Una vez estresadas se les realizó un desafío con dinitrofenol sobre sus orejas y se fue midiendo el espesor de la reacción originada por la dermatitis de contacto (15).

El estrés agudo produce una redistribución de leucocitos en los órganos y la piel en este caso, redistribución que sería uno de los factores principales en el incremento de la inmunidad mediada por células contra el antígeno (52). Una condición de estrés agudo podría redistribuir subgrupos de leucocitos en órganos linfáticos secundarios, preparando al individuo para el desafío (es decir, para instaurar una respuesta óptima hacia el estresor).

En modelos de estrés se ha estudiado extensamente la distribución de leucocitos en sangre periférica. En humanos se ha observado cómo el estrés agudo por hipoxia o hemorragia disminuye el valor de leucocitos totales (12). Klokke y cols. (34) estudiaron los efectos in vivo de la hipoxia sobre el sistema inmune, colocando a sujetos jóvenes en una cámara especialmente diseñada la cual generaba un ambiente cerrado. Se estudiaron luego de 20 minutos varios parámetros inmunes y se observó que la hipoxia causó un aumento en el número de leucocitos debido a la elevación de los linfocitos. La cantidad relativa y absoluta de las células NK CD16+ se incrementó aunque retornaron a límites normales dos horas luego de la recuperación de los individuos, en cambio, disminuyó el porcentaje de células CD4+ y CD8+.

En otros estudios se observó que pacientes con hemorragia severa sufrían infecciones en un elevado porcentaje. Los episodios hemorrágicos son en general el resultado de traumas incluyendo cirugías, que producen inmunosupresión, alterando la actividad del sistema inmune con incremento en la actividad de células NK, disminución en el porcentaje de células CD3+ (linfocitos T) debido a

la caída en el porcentaje de células CD4+ y ningún cambio en el porcentaje de células CD19+ (linfocitos B) (5).

Kappel y cols. (35), estudiaron el efecto estresante de la hipertermia, llegando a las mismas conclusiones anteriores; aumento inicial y posterior descenso de linfocitos T, aumento del número de polimorfonucleares y de la actividad de células NK sin modificación en el número de células CD19+.

En trabajos con ciclistas se ha demostrado que el ejercicio incrementa la actividad de células NK y células Killer activadas grandes, pero cuando el ejercicio es más prolongado y severo la actividad disminuye (41). Modelos en ratones estresados con choque eléctrico o inmovilización muestran como el estrés agudo produce un temprano incremento de leucocitos y luego una rápida disminución en el número que regresa a valores basales o más incrementados una vez que el estrés ha cesado. Este incremento temprano sería debido sólo al incremento del número de neutrófilos, porque luego, tanto los linfocitos como otras células mononucleares disminuyen junto con la disminución del número total de leucocitos (15, 16, 51, 52).

En este trabajo, la concentración de leucocitos en función del tiempo, en pacientes con patologías diversas, se encuentra incrementada significativamente al ingreso y a las 24 y 48 horas con respecto al grupo control. En el grupo de pacientes en los que se hace un seguimiento mas prolongado se observa que los valores, siempre incrementados respecto de los controles muestran una tendencia a disminuir desde el ingreso hasta las 48 horas para retornar a valores mayores que los del ingreso a los 7 días de estadía en la unidad.

Al analizar comparativamente pacientes de los grupos 1 y 3, se observaron incrementos significativos a las 24 horas del ingreso en el grupo de pacientes con patologías diversas y cardíacos pero no de politraumatizados, con la misma tendencia de disminución hacia las 48 horas. En todos los grupos de pacientes (de patologías diversas, cardíacos o politraumatizados), se observó una tendencia de disminución en el número de leucocitos contados al ingreso o a las 24 horas con respecto a los presentes a las 48 horas.

Este fenómeno podría deberse a una redistribución de subgrupos

de leucocitos en órganos linfáticos secundarios y tejidos, inducida por citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α) secretadas por células del sistema inmune como monocitos, en respuesta a hormonas del eje HHA liberadas durante el estrés agudo (15, 16, 50, 51). Esta redistribución llevaría a proteger algunos subgrupos de leucocitos de efectos dañinos causados por glucocorticoides (52), o migrar para servir como estaciones de combate en órganos linfáticos secundarios o bien, favorecer la comunicación en ciertos órganos donde estas células encontrarían posibles antígenos extraños, patógenos u otras células activadas del sistema inmune.

Firdaus y colaboradores (15, 16, 51, 52) han demostrado que el estrés agudo induce cambios significativos y reversibles en el número y porcentaje de los subgrupos de linfocitos. Ellos observaron una disminución en el número y porcentaje de linfocitos T (CD3+) y linfocitos B (CD19+) en sangre periférica al aplicar un estresor en forma aguda en modelos animales. Esta disminución estuvo acompañada por disminución del número total de leucocitos. Los porcentajes de linfocitos volvieron a valores basales horas después de que la aplicación del estresor cesó. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto a que se observa una disminución significativa en los valores de linfocitos T (CD3+) a las 48 horas en los pacientes cardíacos y politraumatizados con respecto al grupo control y, entre los pacientes cardíacos y politraumatizados a las 24 horas.

Estos autores sostienen que existiría una redistribución en los subgrupos de leucocitos por la cual algunos podrían ser retenidos selectivamente en órganos linfáticos secundarios u otros tejidos y como resultado de esta retención la proporción de algún subgrupo podría disminuir en sangre periférica. Esta hipótesis está apoyada por trabajos en donde se ha observado un incremento de las pruebas de hipersensibilidad cutánea luego de la aplicación del estresor en forma aguda, las cuales miden la funcionalidad de la inmunidad mediada por células, y en donde la célula T efectora en este mecanismo es el linfocito T CD3+ CD4+ en la piel. Una condición de estrés agudo podría redistribuir subgrupos de leucocitos en órganos linfáticos secundarios, preparando al individuo para una respuesta óptima para el estresor o afectando la habilidad del sistema inmune para responder a un desafío por disminución de algún subgrupo de células en sangre circulante (52).

Los sistemas de respuesta al estrés, tanto el central como el periférico, son afectados por citoquinas, entre ellas, IL-6, IL-1 y TNF- α (23).

La IL-6 es secretada durante el estrés y es positivamente controlada por catecolaminas. Estudios en ratas han demostrado que la IL-6 activa inmediatamente el eje HHA por acción primaria sobre neuronas liberadoras de CRF (23).

En el presente trabajo se observó un incremento de la IL-6 en los dos grupos de pacientes, cardíacos y politraumatizados, que fue significativo a las 48 horas del ingreso en politraumatizados con respecto a los controles de adultos sanos. Estos resultados estarían de acuerdo con los datos obtenidos en la literatura en los que siempre se observa correlación entre mecanismos de estrés agudo e incremento en la concentración sanguínea de IL-6 que depende y fluctúa según la severidad de la patología y con cada paciente en particular (25, 26, 27, 32, 33).

Se han realizado algunos trabajos en pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos en donde se han estudiado parámetros inmunes como moléculas de adhesión (37), y citoquinas (53). Otros trabajos se necesitarán para determinar la importancia pronóstica y el rol de estas sustancias en mecanismos de estrés agudo en pacientes ingresados en estas unidades y la correlación con la evolución de los mismos.

En trabajos sobre modelos en ratones a los cuales se les aplica un estresor en forma aguda como choque eléctrico o inmovilización, se observa un incremento rápido y significativo, en función del tiempo, de corticoides en sangre circulante que disminuye una vez que cesa la aplicación del estresor (16).

Se sabe que los corticoides liberados en respuesta al estrés inducen cambios en el sistema inmune. Por ejemplo, sobre la inmunidad innata regulan la fagocitosis, la actividad de células presentadoras de antígenos y disminuyen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias intracelulares por parte de los macrófagos. Alteran el estallido respiratorio en los neutrófilos y afectan la ontogenia, proliferación y sobrevivencia de linfocitos. Además son fuertes inductores de apoptosis.

En el presente estudio en pacientes con patologías diversas se observa un incremento significativo en la concentración a las 24 horas del ingreso de los mismos con respecto al grupo 2 (control), estando estos resultados en coincidencia con resultados de otros autores (25, 26, 27, 28). Sería de importancia continuar el estudio de las concentraciones de corticoides en función del tiempo en pacientes ingresados a terapia intensiva y correlacionarlas con la incidencia de infecciones, el tipo de agente infeccioso si los hubiera y la evolución de los pacientes con distintas patologías.

Los valores promedios de proteínas y de albúmina obtenidos en las determinaciones realizadas en las muestras de pacientes en función del tiempo indican que no hay diferencias significativas. Se observa una tendencia de disminución a las 48 horas del ingreso, pudiendo corresponder a distintos mecanismos, como pasaje de alguna fracción al líquido extravascular, catabolismo o dilución.

Las concentraciones de las fracciones del complemento (C3, C4) no mostraron variación en función del tiempo, indicando que no hubo producción ni consumo de las distintas fracciones.

Con respecto a los valores de potasio y hematocrito, no se observaron diferencias significativas en función del tiempo lo cual nos indica que la hemoconcentración o hemodilución que pudo sufrir alguno de los pacientes ingresados a las unidades no fue importante o no llegó a modificar parámetros bioquímicos o inmunológicos sensibles a la pérdida, aporte o redistribución de agua en el organismo.

Solo los valores de urea mostraron una tendencia de incremento al aplicar análisis de regresión. Esto podría indicarnos incremento del principal producto del metabolismo proteico (urea). Siendo las proteínas un recurso energético importante en la falta de ingesta, y por ser gluconeogénicas, podría encontrarse incrementado el catabolismo de las mismas pudiendo variar las concentraciones individuales de alguna proteína plasmática, entre ellas las inmunoglobulinas, albúmina, fracciones del complemento, etc.

CONCLUSIONES.

- Las disminuciones de inmunoglobulinas G y M en los grupos de pacientes y de inmunoglobulinas G en el grupo de ratas expuestas a asfixia, se puede deber a una supresión del sistema inmune o a un conjunto de mecanismos en los que además se produzca catabolismo o pasaje al líquido extravascular.
- El incremento del número total de leucocitos puede ocurrir por redistribución reversible de subgrupos de leucocitos como respuesta al estrés, algunos de los cuales son retenidos en órganos linfáticos secundarios y otros tejidos, o liberados desde estos compartimentos a sangre circulante.
- La disminución en el porcentaje de linfocitos CD3+ podría ser debido al mismo mecanismo explicado anteriormente.
- El incremento en la concentración de cortisol se debería a la activación de los sistemas central y periférico de respuesta al estrés.
- El incremento en la concentración de IL-6, sería una consecuencia de la activación del componente central y periférico de respuesta al estrés, controlada positivamente por catecolaminas.

Estos cambios en parámetros inmunológicos como la disminución de inmunoglobulinas G y M y del porcentaje de linfocitos T CD3+ a las 48 horas del ingreso de los pacientes a unidades de cuidados intensivos, sugieren una ventana de vulnerabilidad a ciertos procesos patológicos en ese tiempo, consecuencia de la habilidad alterada del sistema inmune para llevar a cabo funciones efectoras y de vigilancia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Khanasari D, Murgo A, Faith R.: "Effects of stress on the immune system". *Immunol. Today*, 11: 170-174, (1990).
2. Negata S.: "Stress-induced immune changes, and brain-immune interaction". *Sangyo ika Daigaku Zasshi*, 15: 161-171, (1993).
3. Kemeny ME, Gruenewald TL.: "Psychoneuroimmunology update". *Semin. Gastrointest. Disease*, 10: 20-29, (1999).
4. Black P, McKenna H, Deeny P. A.: "Concept analysis of the sensoristraitn experienced by intensive care patients". *Intensive Critical Care Nursery*, 13: 209-215, (1997).
5. Jhonsos E, Kamilaris T, Chrousos G, Gold P.: "Mechanisms of stress: A dynamic overview of Hormonal and Behavior Homeostasis". *Neurosc. and Biobehav.*, 16: 115-130, (1992).
6. Selye H.: "A syndrome produced by diverse nocuous agents". *Nature*, 138: 32, (1936).
7. Shona K, Clyde H, Mark D.: "Searching for the biological pathways between stress and health". *Annu. Rev. Public Health*, 18: 437-462, (1997).
8. Olff M.: "Stress, depression and immunity: role of defense and coping styles", *Psychiat. Res.*, 85: 7-15, (1999).
9. Cohen F, Kearney KA, Zegans LS, Kemeny ME, Neuhaus JM, Stites DP.: "Diferencial immune system changes with acute and persistent stress for optimists vs pessimists". *Brain Behav. Immunol*, 13: 155-174, (1999).
10. Harvina R, Vhnamaki H, Harvina T, Naukkarinem A, Savolainen L, Aalto M.: "Association of Psychic Stress with Clinical Severity and Symptoms of Psoriatic patients". *Acta Dermatol. Venerol*, 76: 467-471, (1996).
11. Glaser R, Grayenstein S, Malerkey W, Sheridan J.: "Chronic Stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults". *Medical Sci.*, 93: 3043-3047, (1996).

12. Pedersen B, Kappel M, Klokke M, Secher N.: "The immune system during exposure to Extreme Physiologic Conditions". *Int. J. Sport Medicine*, 15: 116-121, (1994).
13. Aloe L., Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A, Tirassa I.: "Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes". *Neurobiology*, 299: 10440-10161, (1994).
14. Ningguo F, Pagniano R, Tovar A, Bonneau R, Glaser R, Sheridan J.: "The effect of restrain stress on the kinetics, magnitude, and isotype of the humoral immune response to influenza virus infection". *Medic. Sci.*, 5: 370-382, (1991).
15. Firdaus SD, Bruce ME.: "Stress-induced enhancement of antigenspecific cell-mediated immunity". *J. Immunol.*, 156: 2608-2615, (1996).
16. Firdaus SD, Miller A, Bruce ME, Spencer R.: "Effects of stress on immune cell distribution". *J. Immunol.*, 154: 5511-5527, (1995).
17. Shelling G, Stoll C, Haller M, Briegel J, Manert W, Hummel T, Lenhart A, Heyduck M, Polasek J, Meier M, Preuss U, Bullinger M.: "Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder in survivors of the acute respiratory distress syndrome". *Critical Clinical Medical*, 26: 651-659, (1998).
18. Scusteer DP, Rowley H, Feinstein S, McGue MK, Zuckerman GR.: "Prospective evaluation of risk of upper gastrointestinal bleeding after admission to a medical care unit. Am". *J. Medical.*, 76: 623-630, (1984).
19. Woltman A, Kress HG.: "The prognostic value of the delayed cutaneous immune reaction following multiple trauma in comparison with other clinical parameters". *Anaesthesist*, 40: 276-281, (1991).
20. Papanicolaou D, Dinitris A, Wilder L, Manolagas S, Chrousos G.: "The pathophysiologic roles of interleukin-6 in Human Disease". *Ann. Intern. Med.*, 128: 127-137, (1998).
21. Black P.: "Immune system-central nervous system interactions:

- effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain". *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 38: 7-12, (1994).
22. Bauer M., Gauger G., Luz C., Silveira R., Nardi N, Muhlen C.: "Evaluation of immune parameters in depressed patients". *Lab. Immunogen*, 4: 24-28, (1995).
 23. Nalton Y., Fukata J., Tominaga T., Nakay Y., Tamai S., Mori K., et al.: "Interleukin 6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats". *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 155: 1459-1463, (1988).
 24. Friedland JS, Porter JC, Daryanasi S, Bland JM, Screaton NJ, Veseley MJ, Grifing GE, Bennett DE, Remick DG.: "Plasma proinflammatory cytokine concentrations, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) III scores and survival in patients in an intensive care unit". *Critical Care Medical*, 24: 1775-1781, (1996).
 25. Pelton GH, Price LH, Heninger GR.: "Epinephrine stimulates increased IL-6 blood levels in major depression". *Proceeding of the Annual Meeting of the American College of Neuropsychopharmacol*, (1995).
 26. Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I.: "Chrousos GP. Dose-effects of recombinant human IL-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure". *Neuroendocrinology*, 66: 54-62, (1997).
 27. Papanicolaou DA, Petrides JS, Tsigos C, Bina S, Kalogeras KT.: "Exercise stimulates IL-6 secretion; inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines". *Am. J. Physiol.*, 271: 3 Pt1. E601-5, (1996).
 28. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS.: "Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in human". *J. Clin. Endocrinal Metabolism*, 77: 1690-1694, (1993).
 29. Doanald RA, Bailey RR, Hart D, Livesey JH, Evans MJ, Mattioli L, et al.: "The plasma interleukin-6 and stress hormone responses to acute pyelonephritis". *J. Endocrinol. Invest.*, 17: 263-268, (1994).

30. Wortel CH, van Deventer SJ, Arden LA, Lygidakis NJ, Buller HR, Hoek FJ, et al.: "Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery". *Clin. Exp. Immunol.*, 114: 564-570, (1993).
31. Bellido T, Stahl N, Farrugella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC.: "Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitor factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells". *J. Clin. Invest.*, 97: 431-437, (1996).
32. Sszynski D, Kozak W. Conn CA, Rudolph K, Kluger MJ.: "Beta adrenoreceptor antagonist suppresses elevation in body temperature and increases in plasma IL-6 in rats exposed to open field". *Neuroendocrinology*, 63: 459-467, (1996).
33. Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M, Pasman GJ, Van Der Venjongekrijg, Van der Meer JW.: "Endurance increases circulating IL-6 and IL-1ra but down regulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production". *J. Appl. Physiol.*, 79: 1497-1503, (1995).
34. Klokker M, Kharazmi I, Bygbjerg B, Pedersen K.: "Effects of brief exposure to hypobaric pressure on the human cellular immune system". *J. Appl. Physiol.*, 74:1100-1106, (1993).
35. Kappel MC, Stadeager N, Tvede H, Galbo B, Pedersen K.: "Effects on in vivo hypertermia on natural killer cell activity, in vitro proliferative response and blood mononuclear cell populations". *Clin. Exp. Immunol.*, 84: 175-180, (1991).
36. Andersen BL, Farrar WB, Golden-Kreutz D, Kutz LA, Mac Callum R, Courtney ME.: "Stress and immune responses after surgical treatment for regional breast cancer". *J.Natl. Cancer Institute*, 90: 30-36, (1998).
37. Boldt J, Muller M, Heesen M, Papsford M, Hempelman G.: "¿Does age influence circulating adhesion molecules in the critical ill?". *Critical Care Medical*, 25: 95-100, (1997).
38. Curley MA.: "Effects of the nursering mutual participation model of care on parental stress in the pediatric intensive care unit".

Heart Lung, 17: 682-688, (1988).

39. Haines C, Perger C, Nagy S.: "A comparison of the stressors experienced by parents of intubated and non-intubated children". J. Adv. Nurs., 21: 350-355, (1995).
40. Singh N, Gayowski T, Wagener MM.: "Intensive care unit management in liver transplant recipients. Beneficial effect on survival and preservation of quality of live". Clinical Transplant., 11: 113-120, (1997).
41. Tvede N, Heilmann J, Halkjaer-Kristensen B, Pedersen B.: "Mechanisms of B-lymphocytes suppression induced by acute physical exercise". J. Clin. Lab. Immunol., 30: 169-173, (1989).
42. Moynihan J, Ader R, Grotta L, Schaschtman T, Cohen N.: "The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice". Brain Behav. Immunol., 4: 1-13-2, (1990).
43. Cunnick JE, Cohen S, Rabin BS, Carperter AB, Manuck NL, Kaplan JR.: "Alterations in specific antibody production due to rank and social instability". Brain Behav. Immunol., 5: 357-369, (1991).
44. Coe CL, Rosemberg LT, Levine S.: "Effect of maternal separation on the complement system and antibody responses in infant primates". Brain Behav. Immunol., 40: 289-302, (1988).
45. Zalzman S, Minikiewik-Janda A, Richter M, Anisman H.: "Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells". Brain Behav. Immunol., 2:254-266, (1988).
46. Tomasi F, Trudeau D, Czerqinsky S, Erredge L.: "Immune parameters in athletes before and after strenuous exercise". J. Clin. Immunol., 2:173-178, (1982).
47. Ningguo F, Roland P, Tovar A.: "The effects of restrain stress on the kinetics, magnitude, and isotype of the Humoral Immune Response to Influenza Virus Infection". Brain. Behav., 5:370-382, (1991).

48. Roitt I, Brostoff J, Male D.: "Colaboración celular en la respuesta de Anticuerpos, en Inmunología". Ed (Roitt, et al), Harcourt Brace, pp. (8.1-8.16) (1998).
49. Fainboim L, Satz M, Geffner J.: "Mecanismos efectores de la respuesta inmune. Inmunidad adaptativa mediada por linfocitos B, la respuesta inmune humoral". En Introducción a la Inmunología Humana, Ed (Fainboim, et al), pp. 267-281 (1999).
50. Ader R, Cohen N.: "Psychoneuroimmunology: Conditioning and Stress". Annu. Rev. Psychol., 44: 53-85, (1993).
51. Firdaus SD, Bruce ME, Spencer R.: "Stress-Induced Changes in Blood Leukocyte Distribution". J. Immunol., 157: 1638-1644, (1996).
52. Firdaus SD, Bruce ME.: "Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function". Medical Sci., 96: 1059-1064, (1998).
53. Friedlan J, Porter J, Daryanani S, Bland J, Sceaton N, Vecely M, Griffin G, Bennet E, Remick D.: "Plasma proinflammatory cytokine concentrations, acute physiology and chronic health evaluation (APACHE III) scores and survival in patients in an intensive care unit". Crit. Care Med., 24:1775-1781, (1996).

EFFECTOS DEL ESTRÉS AGUDO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E
INMUNOLÓGICOS EN HUMANOS Y ANIMALES

I ed. - 100 ejemplares - 90 p.

Este libro se imprimió en Julio de 2006
en PAPIRO S.R.L.

Lavalle 1400 sur (5400) San Juan - Argentina

Tel. (0264) 4214534 - 4200357

papiro@papirosrl.com