

Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto"

Alteración de los niveles leucocitarios en ratones BALB/C sometidos a estrés

Dra. Edelis Castellanos Puerto, Téc. Caridad Sebazco Pernas, Téc. Mercedes Fernández y Téc. Pedro Enrique Pérez Santoya

RESUMEN

Se realizó un estudio con 15 ratones, subdivididos en 3 grupos de 5; el control que se mantuvo en condiciones normales y 2 experimentales a los cuales se les sometió a estrés por hambre y por frío para valorar la afectación de los leucocitos. A los animales se les extrajo sangre al inicio y al final de cada experimento para realizar los leucogramas y se apreció que al final del estudio en los grupos experimentales se afectó significativamente la población leucocitaria, sobre todo los linfocitos.

Palabras clave: Inmunodeficiencia, inmunología, estrés.

El estrés ha sido a lo largo del tiempo un gran enemigo de la salud humana porque provoca cambios sustanciales en el conjunto de sistemas y órganos que componen al organismo, dígase, sistema nervioso central, sistema endocrino, sistema cardiovascular, sistema respiratorio, sistema osteomioarticular, entre otros de gran importancia.

El sistema nervioso regula todas las funciones de los demás porque actúa desde los centros superiores por vía directa, a través de la médula espinal, de los ganglios espinales y de las terminaciones nerviosas que inervan a los órganos linfoides y a la médula ósea. También sobre los vasos sanguíneos y linfáticos propios de estos y en los contactos que existen entre axones neuronales y células inmunitarias a ese nivel y por vía endocrina a través de neurohormonas y neurotransmisores.

Dentro del sistema endocrino las catecolaminas ejercen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos y sobre la proliferación de células B en respuesta a la cooperación.¹ El aumento del cortisol se desarrolla junto con neutrofilia, linfopenia, disminución de los granulocitos, disminución de la aclaración mucociliar nasal, disminución de la célula *natural killer* (NK), disminución de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), alteraciones en la producción de citoquinas en respuesta a mitógenos y de la IgA de la saliva y de la mucosa nasal, modificación en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que mantenido, provoca una inmunosupresión.² Por otro lado, la disminución del RNA_m de la hormona del crecimiento disminuye las células B y contribuye a una pobre respuesta de anticuerpos (Ac), teniendo en cuenta que esta hormona también es secretada por las células mononucleares.³ También los modelos de inmunosupresión por esteroides indican que el aumento de cortisona disminuye los precursores de linfocitos B, causando depleción de estas en la médula ósea e induciendo apoptosis.⁴

De toda esta gama se destaca el sistema neuroinmunoendocrinometabólico, que se encarga de regular las funciones del sistema inmunológico y endocrino junto con los mediadores químicos de estos, que por supuesto tienen una función determinada sobre todas las células del organismo.

Es conocido que el estrés disminuye la capacidad de proliferación de los linfocitos en general, pero en específico la función de los linfocitos T se ve muy afectada porque habitualmente sobre su superficie se expresan más de 100 nuevas proteínas y ello pudiera estar implicado en las diferentes señales que tienen que ver con las vías de síntesis de proteínas y de sustancias con

actividad inmune o incluso como consecuencia de los cambios en la composición de la población de las células T.⁵

Durante la exposición al estrés, en las primeras 6 a 9 h aumenta la migración de los linfocitos T en la médula ósea, lo cual puede participar en la activación de la granulopoyesis.⁶

Actualmente una de las causas más frecuentes de inmunodeficiencia en el mundo es la desnutrición, pero si se asocia esta a la situación internacional que tienen casi todos los países, en especial los subdesarrollados, y a los niveles de estrés que presentan los habitantes, se da uno cuenta de que hay que estudiar más acerca de los fenómenos relacionados con la inmunidad y el estrés, los cuales pueden alterar la salud humana o causar enfermedades que dependan del buen funcionamiento del sistema neuroinmunoendocrinometabólico. Por ello los autores de este trabajo decidieron estudiar el comportamiento de los linfocitos después de la provocación de estrés por hambre y por frío en animales de experimentación

MÉTODOS

Se trabajó con 15 ratones Balb/c jóvenes, con peso promedio de 21 g, de los 2 sexos, provenientes del Centro Nacional para Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales fueron divididos en 3 grupos: 5 se utilizaron como controles normales (grupo 1), 5 para producir estrés por frío (grupo 2) y 5 se utilizaron para producir estrés por hambre (grupo 3). Se manipularon de acuerdo con lo establecido en las normas de Helsinki.⁷

Flujo de trabajo

Grupo 1: los ratones se mantuvieron en condiciones normales dentro del medio en el cual habitualmente viven los animales de experimentación durante los días que duró el experimento.
Grupo 2: los animales fueron anestesiados superficialmente con éter para inmovilizarlos después con contenedores apropiados en refrigeración, a temperatura de - 20 grados durante 30 min.

Grupo 3: a los animales solamente se les dio agua, la viruta fue retirada de la jaula por 2 d.

Al inicio y al final de los experimentos se realizó a todos los grupos un leucograma mediante la técnica que se describe a continuación:

Técnica para realizar leucograma en ratones

- Limpiar el rabo del ratón con una torunda y posteriormente con xilol.
- Administrar calor con una lámpara durante 3 min.
- Cortar la punta del rabo a 1 cm y recoger una gota de sangre.
- Tomar 20 uL de la gota y diluirlo en 3,8 mL de ácido acético, homogenizar la muestra.
- Cargar la cámara de Neubauer, dejar reposar 10 min y contar en el microscopio con una lente de 10x, los cuatro cuadrantes grandes de las esquinas.
- Multiplicar por 50 la suma de leucocitos hallada.
- Para el diferencial, aplicar una gota a la lámina portaobjetos y extender.
- Dejar secar al aire libre y cubrirla con metanol por 1 min para su fijación.
- Colorear por el método de Giemsa, preparando el colorante a razón de una gota por mililitro de agua destilada.
- Lavar la lámina y secar al aire libre.
- Contar en el microscopio utilizando una lente de inmersión. Contar no menos de 100 leucocitos.
- El informe comprenderá el porcentaje de leucocitos en sus 3 series: granulocítica, linfocítica y monocitaria.

Los resultados fueron comparados cuantitativamente de acuerdo con las lecturas de los leucogramas.

Para la estadística se trabajó con las medias y los porcentajes que representaban las variables estudiadas, se realizó test T para muestras relacionadas mediante el programa SPSS para Windows (versión 9), que permitió comparar los resultados de las lecturas de los leucogramas al inicio y al final de los experimentos en todos los grupos de trabajo.

RESULTADOS

En los modelos de estrés aplicados se apreció una notable disminución de las cifras totales de leucocitos en los diferentes momentos en que fue tomada la muestra, así como de los valores del diferencial con una diferencia significativa para algunas variables (tabla), en comparación con el grupo control donde las cifras no variaron.

Tabla. Leucogramas

No	Inicio					Final				
	Leuc.	Poli.	Linfo.	Mono.	Eos.	Leuc.	Poli.	Linfo.	Mono.	Eos.
1	9,500	4,5	7,9	1	0	9,200	4,3	7,8	1	0
2	7,200	4,2	7,2	2	0	7,200	4,0	7,3	1	0
3	8,200	3,9	6,4	1	1	8,000	4,0	6,3	1	1
4	9,300	3,5	8,3	1	0	9,200	3,2	8,0	1	0
5	7,450	3,0	7,4	1	1	7,300	3,0	7,1	1	0
X	8,33	3,82	7,44	1,2	0,4	8,18	3,7	7,3	1	0,2
1	3,900	2,4	7,6	0	0	1,000	1,9	0,3	0,3	0
2	10,000	2,3	7,6	1	1	1,400	1,4	0,8	0,3	0
3	9,200	3,0	7,0	1	0	1,100	0,5	0,2	0	0
4	9,500	3,0	7,7	1	0	1,000	1,6	0,4	0	0
5	8,200	4,2	7,0	1	1	1,800	1,5	0,5	0	0
X	8,16	2,98	7,38	0,8	0,6	1,26	1,38	0,44	0,12	0,0
1	6,750	1,6	8,4	0	0	1,300	1,0	0,15	0	0
2	6,950	1,3	8,7	0	0	1,800	0,8	0,17	0	0
3	11,450	0,7	9,2	1	0	1,400	0,5	0,18	0,2	0
4	5,500	3,8	6,8	1	1	1,000	0,4	0,2	0,2	0
5	6,960	2,3	6,1	0	0	1,400	1,2	0,4	0	0
X	7,522	1,94	7,84	0,4	0,2	1,38	0,78	0,22	0,08	0,0

Leuc.: leucocitos, Poli.: polimorfonucleares, Linfo.: linfocitos, Mono.: monocitos, Eos.: eosinófilos.

Se puede apreciar que el grupo celular más afectado fue el de los linfocitos, el cual tuvo 94 % de disminución para el grupo 2 y 97 % de disminución para el grupo 3, con $p < 0,05$ para ambos grupos, partiendo de que X es la media de las células en cada caso.

Para los polimorfonucleares el porcentaje de disminución fue de aproximadamente 55 %, con $p < 0,05$ en el grupo 3. En el caso de los monocitos y los eosinófilos no hubo significación estadística, con $p = 0,54$ y $0,178$, respectivamente; estas células se observaron muy poco en los conteos, aun en el grupo control.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la gran afectación que sufren las células primordiales de la respuesta inmunológica cuando son sometidas a situaciones de estrés, como son los linfocitos. Ello tiene repercusión en la respuesta inmunitaria, porque a través de estos se ejecutan toda una serie de eventos específicos que tienen que ver con la activación de otras células inmunológicas, con la liberación de citocinas, con las respuestas inmediatas y tardías entre un conjunto de eventos moleculares que suscitan situaciones únicas de defensa contra virus, hongos y bacterias y la

síntesis de anticuerpos, por lo que al afectarse esta célula, ya sea en cantidad o en calidad, se afecta la inmunidad en general.

Se escogieron 2 modelos sencillos, pero las situaciones que modelan el estrés son diversas; se debe considerar que todas conducen al organismo a las mismas alteraciones del sistema neuroinmunoendocrinometabólico, y varios autores que se han dedicado a estudiar modelos de estrés han demostrado la inmunodeficiencia que se produce, además del aumento de la susceptibilidad para las infecciones con sus respectivas consecuencias.

Edgar VA y otros demostraron que las catecolaminas ejercen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos y sobre la proliferación de células B en respuesta a la cooperación. Además se observó un aumento significativo de la densidad de los receptores adrenérgicos B₂ en un modelo de depresión crónica comparado con los controles.¹ En otros modelos de estrés y ejercicios físicos se midieron los niveles de cortisona plasmáticos asociados con ejercicios que inducen inmunomodulación y se comparó con el grupo control sedentario. Los ratones tratados en comparación tenían un incremento de 35 % de la actividad de la succinato deshidrogenasa por unidad de proteína en el músculo cuádriceps femoral, además, esos ratones mostraron un aumento de la proliferación de los linfocitos esplénicos para varios mitógenos, lo cual se evidenció a las 72 h. Al aumentar la intensidad y duración del ejercicio se exhibió inmunodepresión. No obstante ello, los cambios en los niveles plasmáticos de corticosteroides después del ejercicio no están claramente asociados con la inmunosupresión o la inmuoestimulación.⁸

Mucho tiene que ver para el mantenimiento de una adecuada inmunidad la administración o el consumo de una dieta balanceada, rica en vitaminas, oligoelementos, ácidos grasos, entre otros. Referido a ello *Furukawa N* y *Tashiro T* realizaron un estudio donde le administraron a pacientes con estrés posoperatorio severo una emulsión que contenía 50 % de ácidos grasos de tipo omega 6, para medir posteriormente la respuesta de células T; se demostró que la emulsión amplificó la respuesta al estrés porque disminuyó considerablemente la proliferación de células T estimuladas con concanavalina A y fotohemaglutinina, también se observó un aumento de IL.⁹ Se ha reportado que la lipooxigenasa cataliza los primeros 2 pasos de la biosíntesis de leucotrienos, el estrés severo aumenta la actividad celular de la 5 lipo-oxigenasa de los linfocito B, específicamente de la línea B I41-E95-A, lo cual está relacionado con la activación de la P38 MPA Kinasa y es requerido para activar los mecanismos de síntesis de leucotrienos por las células B.¹⁰

Este estudio es el comienzo de una serie de investigaciones que se realizarán referidas a la inmunonutrición, el estrés oxidativo y la inmunidad en humanos, y constituye una investigación preliminar de gran importancia.

Alteration of the leukocytic levels in BALB/C mice subjected to stress

SUMMARY

A study was conducted with 15 mice, which were subdivided into 3 groups of 5 each. The control group, that was maintained under normal conditions, and 2 experimental groups that were subjected to stress caused by hunger and cold, to evaluate the leukocytes' affection. Blood samples were taken from the animals at the beginning and at the end of every experiment to perform white blood cell counts. At the end of the study, it was observed that the leukocytic populations, mainly the lymphocytes, were significantly affected.

Key words: Immunodeficiency, immunology, stress.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Edgar VA, Silberman DM, Cremaschi GA, Zieher LM, Genaro AM. Altered lymphocyte catecholamines reactivity in mice subjected to chronic mild stress. *Biochem Pharmacol* 2003;65(1):15-23.
2. Venkatraman JJ, Pendergost DR. Effect of dietary intake on immune function in athletes. *Sport Med* 2002;32(5):323-37.
3. Wu H, Wang J, Cacioppo JT, Glase R, Kiecott-Glase JK, Malarkey WB. Chronic stress associated with spousal care giving of patients with Alzheimer's dementia is associated with down regulation of B lymphocyte GH mRNA. *J Gerontol A Biol Sci* 1999;54(4):212-5.
4. Garvy BA, King LE, Telford WG, Morford LA Fraker PJ. Chronic elevation of plasma corticosterone causes reductions in the number of cycling cell of the lineage murine bone marrow and induces apoptosis. *Immunology* 1993;80(4):587-92.
5. Domínguez-Gerpe L, Lefkovits I. Lymphocyte protein synthesis: evidence that murine T cell are more affected by stress than B cell. *Immunol Lett* 1996;52(2-3):109-23
6. Gorizontov PD, Fedotova MI, Belousova OI, Khaitov RM, Chermeneva LI. Effect of exposure to stress on the role of T and B lymphocytes in the response of the hematopoietic system. *Biul Eksp Biol Med* 1990;89(4):415-7.
7. Villar J. Recomendaciones de la declaración de Helsinki sobre la investigación clínica y guías principales en el cuidado y uso de animales da laboratorio. *Med Clin* 1988;91:702-3.
8. Hoffman-Goetz L, Thorne R J, Houston ME. Splenic immune response following treadmill exercise in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1988;66(11):1415-9.
9. Furakawa K, Yamamori H, Takegi K, Hayashi N, Suzuki R, Nakajima N, et al. Influence of soybean emulsion on stress response and cell mediated immune function in moderately or severely stressed patient. *Nutrition* 2002;18(3):235-40.
10. Werz O, Klemm J, Radmark O, Samuelsson B. p 38 MAP kinase mediated stress-induced leukotriene in a human B-lymphocyte cell line. *Leukoc Biol* 2001;70(5):830-8.

Recibido: 13 de octubre de 2005. Aprobado: 19 de enero de 2006.
Dra. *Edelis Castellanos Puerto*. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto".
Avenida Monumental y Carretera del Asilo, municipio Habana del Este, Ciudad de La Habana,
Cuba. Correo electrónico: edelis.castellanos@infomed.sld.cu