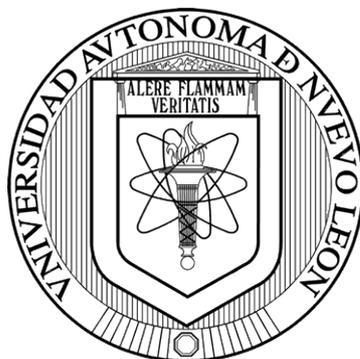


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MODULACIÓN POR ESTRÉS CRÓNICO DE LA ACTIVACIÓN  
POR LIPOPOLISACÁRIDO DE LINFOCITOS DE BAZO DE  
RATONES BALB/C**

**TESIS**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INMUNOBIOLOGÍA**

Presenta:

**ANA LUISA CANTÚ RUIZ**

NOVIEMBRE, 2020

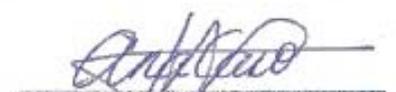
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
MODULACIÓN POR ESTRÉS CRÓNICO DE LA ACTIVACIÓN  
POR LIPOPOLISACÁRIDO DE LINFOCITOS DE BAZO DE  
RATONES BALB/C

Comité de Tesis

DIANA  
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández  
Presidente

  
Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Secretario

  
Dra. Ana Carolina Martínez Torres  
1er. Vocal

  
Dr. Ricardo A. Gómez Flores  
2do. Vocal

  
Dra. Patricia Tamez Guerra  
3er. Vocal

**MODULACIÓN POR ESTRÉS CRÓNICO DE LA ACTIVACIÓN  
POR LIPOPOLISACÁRIDO DE LINFOCITOS DE BAZO DE  
RATONES BALB/C**

DIRECCIÓN DE TESIS

DIANA  
CABALLERO

---

Dra. Diana Caballero Hernández  
Directora



Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Neuroinmunomodulación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

# ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	i
ÍNDICE	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Animales	13
1) Diseño experimental y protocolo de estrés crónico	13
Monitoreo del peso corporal	14
Obtención de muestras	14
Obtención de células mononucleares de bazo	14
2) Ensayo de proliferación y viabilidad	15
A) Ensayo de CFSE	15
B) Ensayo de calceína-AM	15
3) Evaluación del perfil de citocinas en linfocitos de bazo activados	15
4) Evaluación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos de bazo activados	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
RESULTADOS	17
1) Evolución del peso corporal	17
2) Conteo de células mononucleares de bazo de ratones de la cepa BALB/c.	17
3) Ensayos de viabilidad celular en linfocitos estimulados con LPS	19
4) Ensayos de proliferación celular en linfocitos estimulados con LPS	21
5) Evaluación del perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en linfocitos de bazo activados	22

6) Análisis de isotipo en células de bazo provenientes de ratones sometidos a estrés crónico	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIÓN	39
PERSPECTIVAS	40
REFERENCIAS	41

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Diana Caballero Hernández, por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio desde hace algunos años, ser mi guía durante todo este proceso y brindarme el apoyo, consejos y conocimientos cada vez que era necesario.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis: Dra. Ana Carolina Martínez Torres, la Dra. Patricia Tamez Guerra y el Dr. Ricardo Gómez Flores por brindarme su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

También, agradezco a la M.C. Helen Lorenzo Anota, por brindarme su apoyo, conocimientos y consejos durante el desarrollo de este proyecto, siendo parte fundamental para el desarrollo de este.

Finalmente, le agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, para llevar a cabo este trabajo de investigación, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo durante mis estudios de maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

## DEDICATORIA

En primer lugar, quisiera dedicar este proyecto a mis padres, Jaime Cantú Sandoval y María Luisa Ruiz Claudio, por brindarme todo su apoyo durante este proceso, dándome ánimos cada vez que era necesario. A mis hermanos, por ser espectadores durante la elaboración de este trabajo; por aguantar mi ánimo y las desveladas que de cierta manera los molestaban, así como las veces que tuvieron que escuchar las exposiciones para mis clases; gracias. Aimee, gracias por ser parte de esto, acompañándonos una a la otra cuando era necesario. También a morita, mi fiel compañera de desvelos.

También quisiera dedicar este trabajo a la Dra. Diana Caballero, por permitirme ser parte de su laboratorio, por compartir tanto conocimiento como experiencias a lo largo de este camino, por dejarme tantas enseñanzas que siempre serán parte fundamental de mi desempeño. Estoy infinitamente agradecida con usted, Dra.

Quisiera mencionar, además, a aquellas personas que estuvieron a lo largo de mi desarrollo como maestro en ciencias, mis compañeros de generación: ustedes son parte importante de esto. María, Xchel, Isaías: gracias por las charlas y los consejos cada vez que eran necesarios.

Otra parte fundamental del desarrollo de este trabajo son mis compañeros de laboratorio, los cuales estuvieron conmigo a lo largo de todo el camino: Jerónimo, Enrique, Isaías, Ada, Debbie, Juan y todos aquellos que, a pesar de estar aquí de manera fugaz fueron parte importante. A todos, gracias por las charlas, los consejos, la ayuda y los conocimientos brindados a lo largo de estos años.

Finalmente, me gustaría agradecer y dedicar este trabajo a una persona que fue parte fundamental del desarrollo de este trabajo: Helen, muchísimas gracias por todo. Por la paciencia, el tiempo que tenías que dedicar a explicarme cosas que eran completamente nuevas para mí, por asesorarme en los experimentos. Gracias por ser parte de esto.

## RESUMEN

El estrés crónico tiene la capacidad de alterar la homeostasis de los seres vivos, promoviendo el desarrollo de múltiples patologías. Diversos estudios han demostrado que el estrés modula las funciones del sistema inmunológico, tanto positiva como negativamente, esto a través de la activación de las principales vías mediadoras del estrés, cuyas hormonas alteran la funcionalidad de la inmunidad humoral y celular. En este proyecto, evaluamos el efecto de un protocolo de estrés crónico por restricción del movimiento de 23 días de duración sobre indicadores de estrés crónico y la activación de linfocitos de bazo por LPS en ratones BALB/c, considerando los parámetros proliferación, viabilidad, perfil de citocinas e isotipo de inmunoglobulina. El protocolo de estrés crónico tuvo entre sus efectos una menor ganancia de peso corporal en ambos sexos, con significancia estadística ciertos días del protocolo ( $p < 0.05$ ), observando una mayor pérdida de peso en machos. Con respecto a la viabilidad celular se detectó un incremento en células provenientes de machos bajo estrés, estimuladas con LPS a 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0.03$ ), este incremento no se observó en hembras. Con respecto al análisis de proliferación, en machos se observó una disminución de proliferación en ratones bajo estrés con respecto al grupo reposo con el tratamiento de LPS a 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0.003$ ), mientras que en hembras se detectó un incremento del índice de proliferación en células estimuladas con LPS a 25  $\mu\text{g/mL}$ , solo en condiciones de estrés. Al analizar el perfil de citocinas se identificaron diferencias por sexo en las células estimuladas con LPS bajo condiciones de estrés y reposo. En machos se observó la presencia de IL-10, con un efecto potenciado en condiciones de estrés, además de una mayor concentración de IFN- $\gamma$ . Fue posible detectar IL-6 en ambos protocolos al estimular las células con LPS ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, en hembras, se reportó un incremento de IL-10, IL-6 y una supresión de TNF- $\alpha$  en condiciones de estrés. Por citometría de flujo se analizó el cambio de isotipo de inmunoglobulinas encontrándose un perfil similar en machos y hembras, con la diferencia que, en hembras bajo estrés se detectó IgM sin un estímulo antigénico. En todos los casos fue posible detectar IgG2b, IgG2a e IgG1, tanto en células estimuladas como sin estimular con LPS. Por lo tanto, el protocolo de estrés crónico establecido tiene la capacidad de modular cambios morfométricos e inmunológicos en ratones BALB/c.

## ABSTRACT

Chronic stress has the potential to alter the homeostasis of organisms involved in the development of many diseases. Several studies have shown that stress has a connection with the modulation of the immune system, having positive and negative effects, due to the activation of the main stress-mediating pathways, whose hormones have an impact on the alteration of the functionality of humoral and cellular immunity. In this project, we studied the effect of a 23-day chronic stress protocol (restraint stress) on indicators of chronic stress and activation of spleen lymphocytes by LPS in BALB/c mice, considering the parameters proliferation, viability, cytokine profile and isotype. The chronic stress protocol caused less weight gain in both sexes, being statistically significant on certain days of the protocol ( $p < 0.05$ ), having a greater weight loss in males. Regarding cell viability, an increase in cells isolated from males under stress that were stimulated with LPS at 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0.03$ ) was detected, but not for females. Regarding the proliferation analysis, a decrease in proliferation was observed in stressed male mice with compared to the resting group stimulated with LPS at 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0.003$ ), whereas in females an increase in the proliferation index was detected in cells stimulated with LPS at 25  $\mu\text{g/mL}$ , only under stress conditions. When analyzing the cytokine profile, differences by sex were identified in cells from animals under stress and resting conditions stimulated with LPS. In males, the presence of IL-10 was observed, with an enhanced effect under stress conditions, in addition to a higher concentration of IFN- $\gamma$ . It was possible to detect IL-6 in both protocols by stimulating the cells with LPS ( $p < 0.05$ ). On the other hand, in females, an increase in IL-10, IL-6 and a suppression of TNF- $\alpha$  were reported under stress conditions. Isotype switching of immunoglobulins was analyzed by flow cytometry, finding a similar profile in males and females, with the difference that stress females showed IgM without antigenic stimulation. In all cases IgG2b, IgG2a and IgG1 were detected, both in stimulated and unstimulated cells. Therefore, chronic stress modulates immune function of B cells and morphometric changes in BALB/c mice.

## INTRODUCCIÓN

El estrés crónico es definido como una experiencia emocional negativa percibida por el sistema nervioso, la cual se acompaña de cambios bioquímicos, fisiológicos, cognitivos y conductuales predecibles que pueden generar distintas respuestas en el organismo, ya sea alterando su homeostasis de manera temporal, o adaptándose a sus efectos. La disregulación de la homeostasis debido a la exposición a estresores tiene un papel en el desarrollo de diversas patologías, como infecciones, enfermedades crónico-degenerativas o cáncer.

Se sabe que el estrés, a nivel fisiológico, es el producto de la activación de dos vías: la vía simpático-adrenomedular (SAM) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) liberando hormonas mediadoras del estrés como catecolaminas y glucocorticoides, para hacer frente al estrés a corto plazo o a su exposición prolongada. Se ha reportado que dichas hormonas impactan en la respuesta inmunológica, propiciando efectos inmunosupresores o estimuladores, según el tipo de estrés al que se someta el organismo, dando lugar a efectos beneficiosos o perjudiciales para su salud. Existe una relación entre la exposición a estrés crónico y la modulación de la respuesta inmune humoral. Se ha reportado que el incremento de los niveles de glucocorticoides induce apoptosis de las células B maduras, disminuyendo su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. De igual manera, la exposición a estresores se ha asociado con la modificación de la capacidad de las células B en respuesta a antígenos. Sin embargo, aún hay aspectos no explorados del efecto del estrés crónico en la inmunidad humoral de los mamíferos.

Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el efecto del estrés crónico sobre la respuesta de linfocitos de bazo de ratones BALB/c de ambos sexos.

## ANTECEDENTES

El estrés consiste en una serie de eventos, iniciado por un estímulo (estresor), que causa una reacción en el cerebro (percepción del estrés) que activa los sistemas de lucha o huida en el cuerpo (respuesta al estrés). La respuesta a un factor estresante varía dependiendo de numerosos factores, entre las cuales destacan las hormonas liberadas en situaciones de estrés, la duración de la exposición del estresor, así como la respuesta del individuo (Dhabhar, 2014). Se consideran dos tipos de estrés, los cuales se distinguen por la duración del evento estresor; el estrés agudo, el cual dura un periodo de min a horas y el estrés crónico, que persiste durante varias horas por día durante semanas o meses, teniendo ambos efectos opuestos en la salud del individuo (Dhabhar, 1997).

El estrés crónico o psicogénico se define como una experiencia emocional negativa, la cual es acompañada de cambios bioquímicos, fisiológicos, cognitivos y conductuales predecibles que dirigen hacia la alteración del estresor o a la adaptación de sus efectos, esto con el fin de mantener la homeostasis en el organismo (Baum, 1990; Wheaton, 1997). La exposición a una situación de estrés conduce a una mayor actividad del sistema simpático-adreno-medular (SAM) y del eje hipotalámico-pituitario adrenal (HPA). La actividad del SNS conduce a la liberación rápida de norepinefrina y epinefrina de la medula suprarrenal, siendo esto considerado como la primera ola de respuesta rápida. El aumento de la actividad del eje HPA conduce a la liberación de glucocorticoides de la corteza suprarrenal, siendo esta respuesta mucho más lenta, constituyendo la segunda onda de respuesta a estrés. Se ha reportado que, en situaciones de estrés, se activan las fibras nerviosas simpáticas para liberar concentraciones micromolares de este neurotransmisor en el microambiente de tejido local y concentraciones nanomolares en la circulación sistémica (Sloan, 2010), además de propiciar la desregulación del eje HPA causando el desarrollo de diversas patologías (Fink, 2017).

Recientemente se ha relacionado al estrés como un factor clave en la regulación de la función del sistema inmune, ya sea para su mejoramiento o la alteración de su función. Se ha demostrado que la desregulación del SNS y del eje HPA, debido a la exposición al estrés, tiene un impacto clave en los cambios del sistema inmunitario, como lo es en la distribución de leucocitos, la producción de citocinas y la diferenciación de las

células T (Qiao, 2018; Szelényi, 2007). El estrés agudo tiene un papel en el mejoramiento del sistema inmune innato y adaptativo, como lo son la maduración y el tráfico de células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos, así como la liberación de citocinas. Por otra parte, el estrés crónico suprime o desregula las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas a través de la alteración del equilibrio de citocinas de tipo 1 a tipo 2, la inducción de respuestas inflamatorias y la supresión de la función de las células inmunoprotectoras (Dhabhar, 2014).

### **Sistema inmunológico e inmunidad humoral**

El sistema inmunológico surge a partir de la necesidad de protección de los organismos multicelulares contra los agentes patógenos. Este se divide en dos tipos de inmunidad; innata y adaptativa, diferenciados por su grado de especificidad, compuestos por células y barreras que funcionan como línea de defensa contra una infección (Kindt, 2007; Abbas, 2015). La inmunidad innata, se considera como la primera línea de protección, siendo la menos específica, cuyos componentes son; barreras físicas y químicas, como epitelios y las membranas mucosas, así como enzimas como la lisozima, presente en las lágrimas; proteínas sanguíneas, donde se incluyen miembros del sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación; y, células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y algunos linfocitos como los NK (Abbas, 2015).

Por otra parte, la inmunidad adaptativa se desarrolla a partir de una respuesta a la infección, tiene la capacidad de discriminar entre diferentes microorganismos, presenta memoria, y tiene una respuesta antigénica más intensa después de una segunda exposición al microorganismo. Los elementos que comprenden este tipo de inmunidad son los linfocitos y los anticuerpos (Abbas, 2015; Kindt, 2007). La respuesta inmunitaria específica es clasificada en dos tipos, inmunidad humoral e inmunidad celular, según el linfocito que participe en la respuesta. La inmunidad humoral está compuesta por anticuerpos, producidos por los linfocitos B. Estos, al reconocer los antígenos microbianos, neutralizan la acción de los microorganismos y lo marcan para que sean eliminados mediante diferentes mecanismos efectores, por ejemplo, la inducción de fagocitosis y la liberación de mediadores de la inflamación (Hardy & Hayakawa, 2001). Por otro lado, la inmunidad celular es mediada por los linfocitos T, cuyo papel varía entre cada tipo de célula; algunas se encargan de regular el desarrollo de linfocitos B y la producción de anticuerpos, otros interactúan con

células fagocíticas destruyendo agentes patógenos, y además algunas tienen la capacidad de reconocer y destruir las células infectadas (Delves, 2008).

La protección conferida por el sistema inmunológico tiene como principio dos actividades vinculadas: el reconocimiento del antígeno por células del sistema inmunitario ya sea linfocitos o células fagocíticas y respuesta inmunitaria, donde finalmente queda eliminado el antígeno. El mantenimiento de una defensa inmunológica efectiva se da a través de la circulación de las células del sistema inmune por todo el organismo a través del sistema linfático, transportando los patógenos o las células presentadoras de antígeno hacia los ganglios linfáticos, donde las células se activarán, producirán anticuerpos y eliminarán el patógeno (Liao, 2014).

Como se mencionó anteriormente, la inmunidad humoral comprende tanto a los linfocitos B como a los anticuerpos secretados por el mismo linfocito. El desarrollo de las células B consta de varias etapas desde su estado inmaduro hasta su maduración. El desarrollo de la célula B inicia cuando las células madre linfoides se diferencian hacia el linaje de la célula B más temprano (pro-B), caracterizada primero por el reordenamiento génico de los loci de la cadena pesada  $D_H$  en  $J_H$  y posteriormente uno en  $V_H$  en  $D_HJ_H$  de  $Ig$ . El desarrollo de las cadenas L sustitutas y su emparejamiento con la cadena H permite la diferenciación de la célula pro-B en células B precursoras (pre-B). Posterior a ello, la célula pre-B se diferencia a célula B inmadura debido a un reordenamiento génico de la cadena ligera, la terminación de este reordenamiento permite que la célula tenga una especificidad antigénica (Stavnezer, 2014). Las células B inmaduras expresan mIgM en su superficie celular junto con  $Ig-\alpha$  e  $Ig-\beta$ , generando el receptor BCR, proporcionándole la capacidad de ser activadas al reconocer antígenos. La maduración de las células B precursoras requiere un microambiente apropiado para su eficiente desarrollo como la secreción de citocinas como IL-7 y factores de transcripción como E2A, EBF, y Pax5, indispensables para el desarrollo del linfocito B. La presencia de IL-7, secretada por células estromales, interactúa con los receptores de IL-7 de la célula pre-B, impulsando su proceso de maduración (Lebien, 2008).

Para que ocurra la activación, proliferación y diferenciación de las células B es indispensable la presencia de un antígeno. Esta activación de células B vírgenes conduce a la generación de células plasmáticas o células de memoria. Los antígenos

que son reconocidos por las células B se pueden dividir en dos tipos, antígenos dependientes de timo e independientes de timo, los cuales son reconocidos en presencia o en ausencia de células  $T_H$ , respectivamente. El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la pared bacteriana el cual funciona como un antígeno independiente de timo, y ha sido ampliamente utilizado para activar las células B en diversos estudios (Xu, 2008; Grover, 2012; Quintana, 2008).

La activación de la célula B, en el caso de antígenos independientes de timo, inicia una vez que el antígeno interacciona con el receptor de la célula B (BCR), iniciando una cascada de señalización que se caracteriza por la activación de la fosforilación de los ITAM de Ig- $\alpha$  e Ig- $\beta$  por tirosin cinasas de proteínas, como Lyn, Blk, y Fyn. Estas fosforilaciones crean sitios de unión a los cuales se fija Syk, posteriormente Syk fosforila la proteína adaptadora BLNK, creando sitios de unión para PLC $\gamma$ 2 y Btk. La activación de PLC $\gamma$ 2 promueve la hidrólisis de PIP $^2$ , un fosfolípido de membrana, produciendo los segundos mensajeros DAG e IP $^3$ , DAG y Ca $^{2+}$ , liberados por la acción de IP $^3$ , activan la cinasa de proteína C, induciendo vías adicionales de transducción. El complejo del receptor activado genera señales que activan vías de proteínas G pequeñas, activando las diferentes vías para expresión génica y cambios funcionales de la célula, conduciendo a su activación y diferenciación.

Por otra parte, la activación de la célula B por antígeno dependiente de timo es mucho más compleja, esta comienza por el reconocimiento del antígeno con mIg, generando una señal, lo que conduce a un incremento de la expresión de MHC clase II y el coestimulador B7. El complejo antígeno-anticuerpo es internalizado por endocitosis degradándose en péptidos, algunos de los cuales son unidos al MHC clase II y presentados a la membrana como complejos de péptido-MHC. Posteriormente, la célula  $T_H$  reconoce el antígeno-MHC II en la membrana de la célula B, activando la célula  $T_H$ , lo que causa que comience a expresar CD40L. La interacción CD40/CD40L proporciona una segunda señal, mientras que la interacción B7/CD28 coestimula la célula  $T_H$ . Posteriormente la célula B comienza a expresar receptores para citocinas, las cuales, al ser secretadas por la célula  $T_H$ , interaccionan enviando señales que apoyan la progresión de la célula B a la síntesis de DNA y su diferenciación (Kindt, 2007).

La activación y la diferenciación de las células B inducidas por antígeno se lleva a cabo por cambios en la expresión génica, dando lugar a la reacción del centro germinal, considerado la base de la inmunidad humoral dependiente de linfocitos T, conduciendo al desarrollo de células B plasmáticas o de memoria. Esta reacción es caracterizada ya sea por expansión clonal, recombinación de cambio de clase (CSR, la hipermutación somática (SHM) a través de maduración por afinidad (Leien, 2008). El cambio de isotipo de inmunoglobulina es mediado por recombinación de cambio de clase (CSR), donde se modifica el gen de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina de C $\mu$  a una de las regiones C $\gamma$  (IgG), C $\epsilon$  (IgE) o C $\alpha$  (IgA) cambiando el isotipo del anticuerpo de la célula B, conduciendo a funciones inmunológicas distintas (Duarte, 2016). Se ha reportado que la recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática son mediadas por la enzima citidina desaminasa inducida por activación (AID). Esta enzima desamina citosinas, generando residuos de uracilo en la región C $\mu$  S, los cuales son marcados por la uracilN-glicosilasa (UNG) siendo reconocidos por enzimas de reparación los cuales resuelven estas roturas del DNA bicatenario, remplazando la región C $\mu$  por las regiones C $\gamma$ , C $\epsilon$  o C $\alpha$ , uniendo las regiones S distales (Muramatsu, 2000; Pieper, 2013).

Diversos reportes han demostrado que el cambio de isotipo también es mediado por citocinas liberadas por células T como IL-4, IL-10, IL-13 y INF- $\gamma$ , cuya secreción genera efectos opuestos en la producción de isotipos generados por células B (Deenick, 2005; Schultz, 1991). Tangye y colaboradores (2002) reportaron que la administración de IL-10 e IL-4, sola o en combinación induce cambios en el isotipo de IgG, en células B humanas, una vez que estas eran activadas con CD40L, demostrando que la presencia de citocinas promueve el cambio de isotipo. Por otra parte, Deenick y colaboradores (2005) reportaron que existe una jerarquía en el cambio de isotipo debido a la presencia de citocinas, mencionando IFN- $\gamma$  como dominante a IL-4, mientras que estas últimas son dominantes a TGF- $\beta$ , esto al exponer las células B a múltiples citocinas. IL-21, a su vez, se ha asociado recientemente por tener un papel en el cambio de isotipo en células B humanas, específicamente en el cambio de IgG3 e IgA (Avery, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el estrés crónico, a través de la activación del eje HPA, se ha relacionado con la liberación de mediadores inflamatorios como

prostaglandinas, citocinas y quimiocinas. Se ha reportado que el estrés crónico en ratas incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias de hipocampo. Por otro lado, se ha reportado que los glucocorticoides y las catecolaminas promueven el cambio de las células Th1/Th2 las cuales se encuentran implicadas en la regulación de citocinas inflamatorias, como IL-4, IL-10, IL-13, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , representando un papel en la activación de células T citotóxicas, las células NK y los macrófagos, promoviendo tanto la inmunidad celular como humoral (Elenkov, 1999; Assaf, 2017). Es por ello, que la modulación de citocinas liberadas en respuesta a estrés podría influenciar el cambio de isotipo en las células B.

### **Estrés crónico en la respuesta inmunológica**

El estrés es considerado como un aspecto negativo en la vida cotidiana, al alterar la homeostasis del organismo siendo uno de los efectos principales de dicha desregulación el desarrollo de diversas patologías. Se ha reportado que el estrés tiene la capacidad de modular el sistema inmune, con efectos tanto inmunoestimulantes e inmunosupresores en la salud, dependiendo del tipo de estrés al que se vea sometido el individuo (Dhabhan, 2000). Se sabe que la activación de la respuesta inmune humoral involucra el inicio de una cascada de señalización teniendo como resultado la acción de los linfocitos B a través de la secreción de anticuerpos en respuesta a patógenos. Por otro lado, la estimulación de las células B por LPS induce la proliferación de las células B, la secreción de anticuerpos, mejorando además la expresión de MHC clase II y moléculas coestimuladoras (Xu, 2008; Lu, 2016). Schweighoffer y colaboradores (2017) demostraron que TLR4 a través de dos vías de señalización; la primera a través de BCR que conduce a la activación de SYK, ERK y ATF; y la otra a través de MYD88 que conduce a la activación de NF- $\kappa$ B, es capaz de propiciar la activación de los linfocitos B en presencia de LPS. Por lo tanto, las células B son un puente importante entre el sistema inmune innato y el adaptativo, debido a su capacidad de ser activadas por moléculas asociadas a patógenos, como LPS y generar anticuerpos específicos de antígeno.

Se ha reportado que el aumento de los niveles de glucocorticoides, en respuesta a un estresor, puede afectar la producción de anticuerpos, esto al disminuir el número de linfocitos B maduros disponibles para convertirse en células productoras de anticuerpos. Por otra parte, diversos estudios en humano y ratón, han reportado que

los linfocitos B en fase temprana (pro-B, pre-B y células B inmaduras) son sensibles a los niveles de glucocorticoides, causando apoptosis (Garvy,1993; Costa, 2018; Lill-Elghanian, 2002). McGregor y colaboradores (2016) realizaron un estudio donde, diversos estudiantes fueron monitoreados al comienzo de sus clases universitarias, así como una semana antes de presentar sus exámenes preliminares encontrando una relación de cada estado del estrés del estudiante con los niveles de cortisol y la disminución de los linfocitos B.

Con respecto al papel que el estrés tiene en la producción de anticuerpos se ha reportado poca información al respecto. Se ha demostrado que el estrés ejerce un efecto diferencial sobre la producción de anticuerpos dependientes de las células T. Silberman y colaboradores (2003) demostraron que en ratones BALB/c sometidos a estrés agudo por restricción de movimiento la producción de IgG incrementa, mientras que en el caso de estrés crónico disminuye, de igual forma los niveles de catecolaminas y corticosterona son modulados según el tipo de estrés. Por otra parte, Tournier y colaboradores (2001) reportaron una alteración de la respuesta humoral en ratones sometidos a estrés crónico e inmunizados con la vacuna TeNT, encontrando además una disminución de las citocinas IL-10 e INF- $\gamma$ , la proliferación de linfocitos y el cambio de isotipo IgM, IgG2a e IgG después de la estimulación con el antígeno.

El estrés crónico desencadena una serie de cambios en el cerebro, regulando hormonas del estrés como glucocorticoides y catecolaminas. Estas hormonas actúan con los receptores de glucocorticoides (GR), y los receptores adrenérgicos ( $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos) en la superficie celular de las células inmunes, inhibiendo o promoviendo la secreción de citocinas (Tian, 2014). Existen reportes con respecto al papel que tiene el estrés sobre el desarrollo de linfocitos. En linfocitos B y T de ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés crónico se encontró un cambio en los niveles de RNAm de tirosina hidroxilasa, crucial para la biosíntesis de catecolaminas, además de cambios en los niveles de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-2, así como un incremento tanto de células apoptóticas como de los niveles de Bax/Bcl-2 (Laukova, 2013). Ahmad y colaboradores (2015) reportaron que, el estrés crónico tiene un impacto significativo en la función de las células T y la producción de citocinas Th1/Th2 a través de la vía H4R, esto al emplear un agonista del receptor H4R en un modelo de estrés murino. Además, otros estudios reportan que los GC y CA son capaces de actuar sobre los receptores nucleares y citoplasmáticos de las células presentadoras de antígeno,

suprimiendo la producción de citocinas Th1 debido a la inhibición de la citocina IL-12 (Shaashua, 2012; Hu, 2014).

Por otra parte, se ha reportado que la activación del sistema nervioso simpático es capaz de regular la producción de citocinas (Szelényi, 2007). Como se mencionó anteriormente, los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ - adrenérgicos son expresados por las células del sistema inmune; desde neutrófilos, monocitos, macrófagos, células NK, y células dendríticas. Sin embargo, el subtipo más altamente expresado en las células del sistema inmune innato y adaptativo corresponde al tipo  $\beta_2$ -AR (Brunskole, 2013; Grailer, 2014; Izeboud, 1999; Tarr, 2012; Nijhuis, 2013). Las células B y T, elementos clave para la inmunidad innata y adaptativa, presentan en su superficie receptores adrenérgicos del tipo  $\beta_2$ , lo cual sugiere el papel que las hormonas liberadas bajo activación adrenérgica tienen en el desarrollo y funcionalidad de estos linfocitos. Se ha reportado que la norepinefrina, controla la diferenciación de las células T a través de la vía AR- $\beta_2$ , siendo, además, capaz de modular la secreción de citocinas IL-23 e INF- $\gamma$  en células dendríticas (Takenaka, 2016). Por otra parte, la activación de diferentes receptores adrenérgicos expresados por las células dendríticas modifica la capacidad de secreción de citocinas, de migración y su capacidad de presentar antígeno (Hervé, 2013; Wu, 2016; Qiao, 2018).

## JUSTIFICACIÓN

La modulación del sistema inmune por el estrés es un paradigma aceptado desde hace varias décadas, sin embargo, el conocimiento relativo a la respuesta inmune ha avanzado significativamente desde que se publicaron los estudios fundamentales que respaldan este paradigma, lo mismo ha sucedido con nuestra comprensión de la comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el inmune. En el aspecto técnico, hay avances significativos en la sensibilidad de los métodos utilizados para analizar las respuestas de ambos sistemas. Con respecto al bienestar animal, numerosos estudios han hecho evidente la importancia del cuidado y reproducción de los animales de experimentación, especialmente en un campo de estudio como el estrés, con la introducción de conceptos como “enriquecimiento ambiental”. También es ya evidente la importancia de realizar investigación pre-clínica con individuos de ambos sexos, puesto que este es un factor crítico para la correcta interpretación de los resultados y descripción del mundo natural. En ese contexto, este estudio es una oportunidad de actualizar y mejorar nuestra comprensión de los efectos del estrés sobre los seres vivos.

## **HIPÓTESIS**

El estrés crónico por restricción del movimiento modula indicadores de la activación de linfocitos de bazo por LPS, incluyendo viabilidad, proliferación, perfil de secreción de citocinas y cambio de isotipo de inmunoglobulinas en ratones BALB/c.

## **OBJETIVOS**

Determinar el efecto del estrés crónico por restricción del movimiento sobre indicadores de la activación de linfocitos de bazo, incluyendo viabilidad, proliferación, perfil de secreción de citocinas y cambio de isotipo de inmunoglobulinas en ratones BALB/c.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre la viabilidad y proliferación de linfocitos de bazo activados de ratones BALB/c.
2. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre el perfil de citocinas TH1/TH2/TH17 de linfocitos de bazo activados de ratones BALB/c.
3. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos de bazo activados de ratones BALB/c.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Se emplearon ratones BALB/c de ambos sexos, con una edad de 12-16 semanas al inicio de los experimentos, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL. Estos se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6 A.M. - 6 P.M.), a una temperatura ambiental controlada de 22 °C y humedad relativa de 45%. Todos los procedimientos de trabajo con los animales fueron aprobados por el comité interno de ética del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, con clave CEIBA-2020-013.

### 1) Diseño experimental y protocolo de estrés crónico

Para llevar a cabo los experimentos, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales en función del sexo y la aplicación o no del estrés crónico.

Experimento: ratones BALB/c sometidos a estrés crónico

1. Machos en condiciones normales de alojamiento (n=5)
2. Machos en condiciones de estrés crónico (n=5)
3. Hembras en condiciones normales de alojamiento (n=5)
4. Hembras en condiciones de estrés crónico (n=5)

Los animales de todos los grupos experimentales se sometieron a un proceso de aclimatación por una semana, donde se manipularon diariamente durante 5 min por un operador. El protocolo consistió en un paradigma de estrés crónico por restricción del movimiento por un lapso de 23 días según se muestra en la Tabla 1. A partir de los 84 días de edad, los ratones fueron expuestos a un protocolo de estrés por restricción de movimiento durante 4 horas diarias, de lunes a domingo, con descansos establecidos. Para lograrlo, los ratones se colocaron en forma individual en un tubo cónico de 50 mL bien ventilado, sin posibilidad de moverse hacia adelante o hacia atrás. El procedimiento se repitió durante los siguientes 22 días. Los animales control permanecieron en sus jaulas y no se perturbó su ambiente. La inducción se realizó en un horario de 11:00 A.M. a 3 P.M.

**Tabla 1.** Calendarización de protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento. F= Fecha, D=Día, P=Protocolo, E=Estrés, R=Reposo, S=Sacrificio y toma de muestra, W=Toma de peso corporal.

FECHA	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5
	Mar	Mie	Jue	Vie	Sab	Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie	Sab	Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie	Sab	Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie
D	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
S	RE	R	RE	RE	RE	RE	RE	RE	R	RE	R	RE													
ST																									X
W	X			X			X			X			X			X			X						X

### Monitoreo del peso corporal

Para determinar la evolución del peso corporal los ratones fueron pesados en distintos días durante el protocolo: días 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24. Para ello, se colocaron en un recipiente con el fin de mantener al ratón en una posición estable. Todas las mediciones del peso se realizaron antes del inicio del protocolo de estrés crónico.

### Obtención de muestras

Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron por punción cardiaca terminal, empleando pentobarbital como anestésico, con una concentración de 100 mg/Kg. La punción cardiaca terminal se llevó a cabo utilizando jeringas de 1 mL con aguja Luer Lock de 27G\*13 mm, con trazas de anticoagulante EDTA. La sangre obtenida se colocó en tubos de 1.5 mL con EDTA, dejándose reposar a 37 °C durante una hora y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min. Al finalizar se colectó el plasma y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Después de la punción cardiaca terminal se aseguró el sacrificio de los animales mediante dislocación cervical, removiéndose el bazo para posteriormente obtener los esplenocitos de ratón.

### Obtención de células mononucleares de bazo de ratón

Una vez recolectado el bazo se obtuvieron los esplenocitos mediante perfusión empleando una jeringa estéril con PBS estéril a una concentración de 1X, la suspensión se recuperó y se colocó en un tubo de 15 mL, el cual contiene 3 mL de Ficoll (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). Posteriormente se centrifugaron los tubos a 400 g por 30 min, para posteriormente recuperar la fase intermedia del tubo donde se encuentran las células mononucleares. Una vez obtenidas las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer, así como el colorante azul tripán, ajustando las células para los ensayos de proliferación y viabilidad.

## **2) Ensayo de proliferación y viabilidad**

Se sembraron 250,000 cel/pocillo obtenidos de los ratones reposo y estrés crónico, posteriormente se activaron con LPS a una concentración 10 y 25 µg/mL, incubándose por 72 horas a 37 °C. Una vez pasado este lapso se llevaron a cabo los ensayos de proliferación y viabilidad.

### **A) Ensayo de CFSE**

Una vez obtenidas las células mononucleares de bazo, se añadió el marcaje de CFSE 4 µM (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) en un volumen total de 2.5 mL de medio RPMI, homogenizándose la muestra con el fin de conseguir el marcaje en todas las células. Posteriormente se incubó en oscuridad por un lapso de 5-10 min a 37 °C, una vez finalizado el periodo de incubación se realizaron dos lavados con PBS 1X centrifugando a 400 g durante 7 min, con el fin de eliminar residuos de marcaje. Finalmente se agregó medio RPMI (Life Technologies, Carisbad, CA, USA) con 10% SFB para sembrar en placas de 96 pocillos (Corning, NY, USA) con una confluencia de 250,000 células por pocillo, incubándose a 37 °C por 72 horas.

### **B) Ensayo de calceína-AM.**

Una vez que las PBMCs tratados cumplan el periodo de incubación, las células se recuperaron en microtubos 0.6 mL, y se centrifugaron a 400 g por 10 min, se decantó el sobrenadante con bomba de vacío para posteriormente añadir el marcaje calcein-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a cada tubo, incubándose por 20 min a 37 °C en oscuridad. Después se realizó un lavado con PBS 1X, centrifugando los tubos a 400 g por 10 min. Por último, se decantó el sobrenadante con bomba de vacío y se resuspendió el pellet celular en 100 µL de PBS 1X para analizar mediante citometría de flujo, canal FL-1 (BD Accuri<sup>TM</sup> C6 Flow Cytometer; Becton- Dickinson Biosciences, Ann Arbor, MI, USA).

## **3) Evaluación del perfil de citocinas en linfocitos de bazo activados**

Se colectó el sobrenadante de los cultivos de células mononucleares de bazo activadas con LPS (10 y 25 µg/mL) e incubados por 72 horas para determinar el perfil de citocinas TH1/TH2/TH17, específico para las citocinas TNF α, INF-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A por medio de citometría de flujo empleando el kit Mouse

Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) de acuerdo con las instrucciones descritas del fabricante.

#### **4) Evaluación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos de bazo activados**

Una vez cumplido el periodo de incubación de las células mononucleares de bazo activadas con LPS se colectó el sobrenadante para determinar los diferentes isotipos de inmunoglobulinas IgA, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM mediante el kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Immunoglobulin Isotyping (BD Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

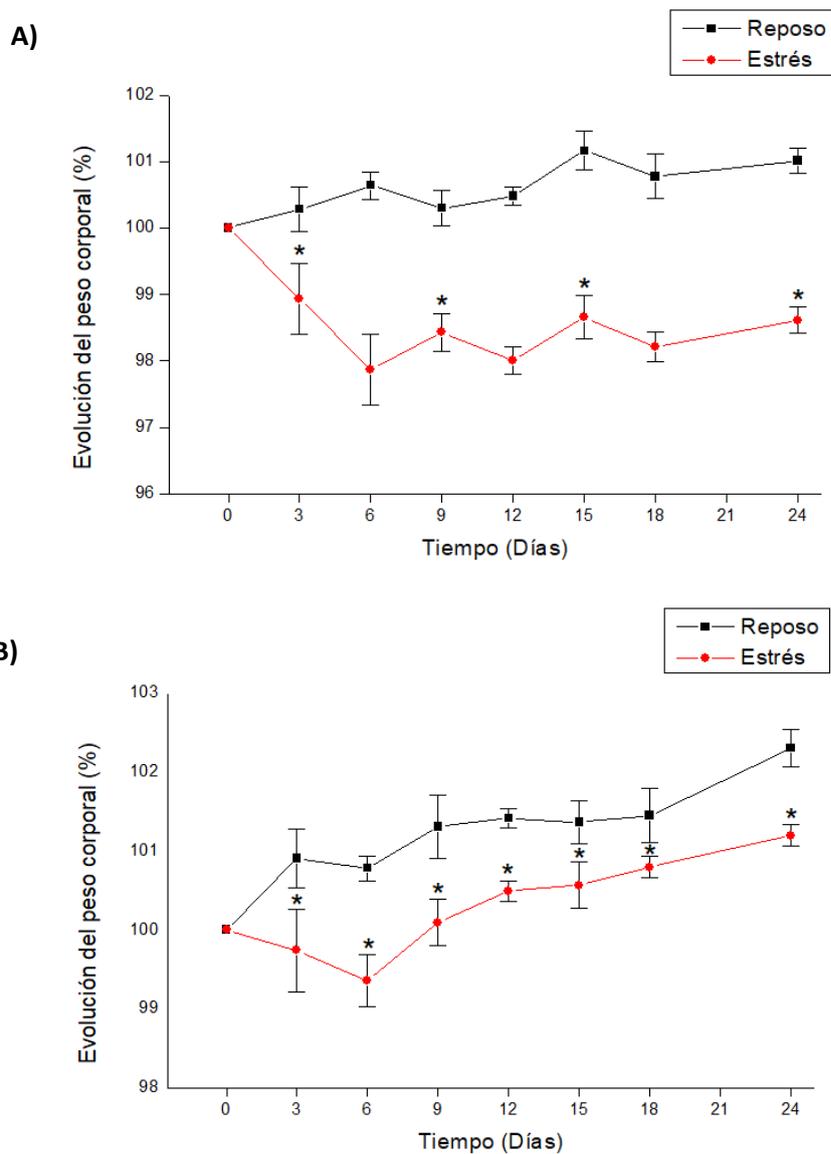
#### **Análisis estadístico**

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para contrastar la distribución continua de los datos obtenidos, una vez corroborado los datos y tras su ajuste a una distribución continua, se realizó la prueba  $t$  de student o Mann-Whitney, para determinar si existe diferencia, tomando en cuenta una  $p \leq 0.05$  y en caso de mostrar una diferencia significativa se sometieron a una prueba Tukey para comparación de medias.

# RESULTADOS

## 1) Evolución del peso corporal

La modulación del peso corporal es uno de los principales indicadores de los efectos del estrés crónico, debido a cambios metabólicos en el organismo, siendo principalmente la pérdida de peso del individuo. Por ello, se midió el peso corporal de los ratones durante la inducción del protocolo de estrés crónico, desde su inicio al día 0, como en los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del peso corporal en ratones de la cepa BALB/c (Figura 1).



**Figura 1.** Evolución del peso corporal en A) ratones macho y B) hembras, durante los 23 días de protocolo de estrés crónico. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar, considerándose como significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

Como se muestra en la Figura 1A, en los ratones macho en condiciones normales de alojamiento mantuvieron su peso corporal, mientras que los ratones estresados se observó una disminución de su peso, teniendo la pérdida de peso más alta el día 6 del experimento, siendo estadísticamente significativa con respecto al grupo reposo los días 0, 3, 9, 15 y 24, lo que nos indica que, en efecto, el peso corporal es modulado por el protocolo de estrés crónico. Los valores de  $p$  obtenidos en cada caso fueron los siguientes: Día 0:  $p=0.026$ ; día 3:  $p=0.045$ ; día 6:  $p=0.067$ ; día 9:  $p=0.045$ ; día 12:  $p=0.060$ ; día 15:  $p=0.045$ ; día 18:  $p=0.057$ ; día 24:  $p=0.05$ .

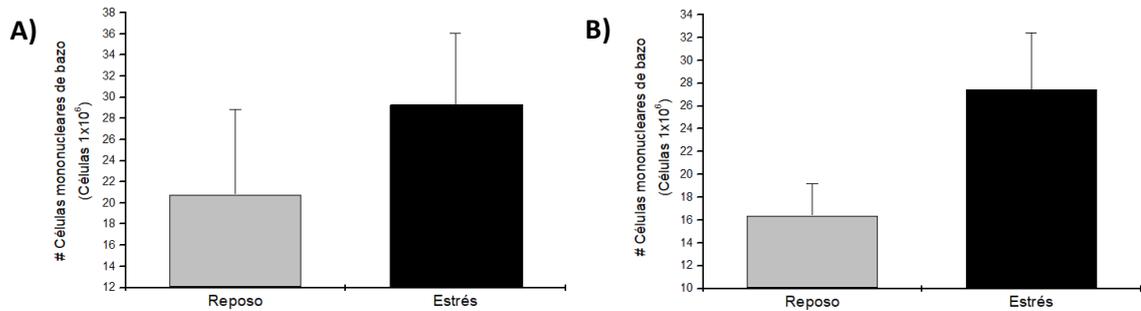
En el caso de las hembras (Figura 1B) se encontró un efecto similar, en los ratones bajo condiciones de estrés se reportó una disminución del peso corporal siendo estadísticamente significativo los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 del protocolo, en comparación con el grupo reposo, teniendo la mayor pérdida de peso documentada el día 6 del experimento, recuperando su peso inicial a partir del día 12. Esto nos indica que, en el caso de las hembras, la restricción de movimiento como inductor de estrés modula el peso corporal solo los primeros días del protocolo. Los valores de  $p$  obtenidos en cada caso fueron los siguientes: Día 0:  $p=0.089$ ; día 3:  $p=0.031$ ; día 6:  $p=0.020$ ; día 9:  $p=0.017$ ; día 12:  $p=0.023$ ; día 15:  $p=0.031$ ; día 18:  $p=0.020$ ; día 24:  $p=0.013$ .

## 2) **Conteo de células mononucleares de bazo de ratones de la cepa BALB/c.**

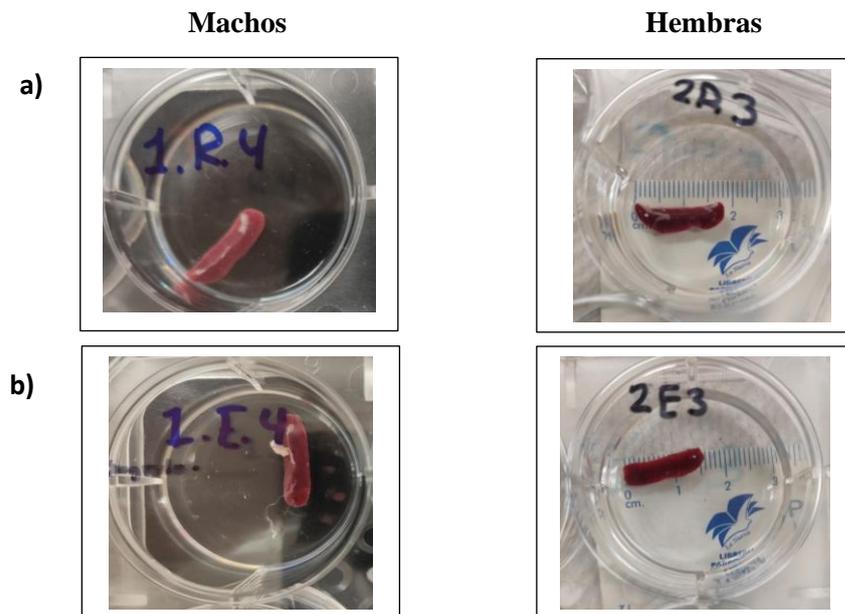
Una vez finalizado el protocolo experimental, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical, empleando pentobarbital como anestesia. Se extrajo el bazo y, mediante perfusión, se obtuvieron las células. Posteriormente se obtuvieron las células mononucleares de bazo y se cuantificaron utilizando azul tripán y la cámara de Neubauer. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos.

Como se muestra en la Figura 2A, los machos estresados presentaron  $28 \times 10^6$  células totales mientras que en el grupo reposo se obtuvieron  $22 \times 10^6$  células totales, obteniendo una mayor cantidad de células de bazo en los ratones en condición de estrés. Las hembras, por el contrario, reportaron una mayor cantidad de células en el grupo reposo con  $30 \times 10^6$ , mientras que en el grupo estrés se obtuvieron  $27 \times 10^6$  células totales. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los ratones estresados con respecto al control en ambos sexos (hembras:  $p=0.113$ ; machos:  $p=0.445$ ). Las diferencias entre la cantidad de células obtenidas, incluso entre

individuos provenientes del mismo grupo, podría deberse al peso del ratón, ya que presentaron diferentes tamaños del bazo entre los individuos, inclusive dentro del mismo grupo experimental. En la Figura 3 se muestran los bazos obtenidos de ratones bajo estrés crónico y reposo.



**Figura 2:** Células mononucleares de bazo obtenidas de ratones sometidos a restricción de movimiento y en condiciones normales de alojamiento en A) machos y B) hembras. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar, considerándose como significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .



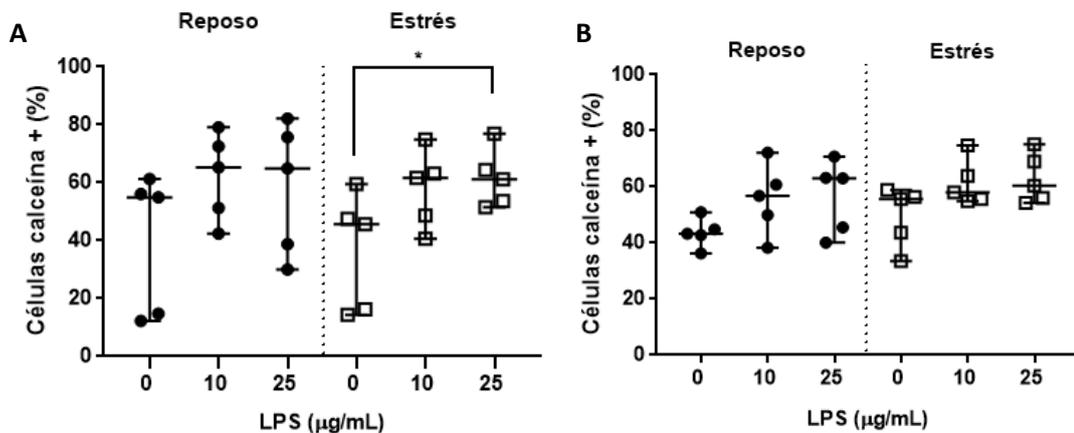
**Figura 3:** Imágenes representativas de bazos obtenidos de ratones en a) condiciones de reposo y b) estrés crónico.

### 3) Ensayos de viabilidad celular en linfocitos estimulados con LPS

Con el fin de evaluar el efecto que el estrés crónico tiene en la viabilidad de los linfocitos activados con LPS, se activaron células de bazo de ratones hembra y macho, en condiciones de reposo o estrés, incubándose por 72 horas. Posteriormente se

realizaron ensayos de viabilidad utilizando calceína-AM, analizándose por citometría de flujo.

En machos (Figura 4A), al realizar la prueba Mann-Whitney no se encontraron diferencias significativas entre los ratones estrés y reposo, al comparar las células sin activar, así como las células estimuladas con LPS a 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.8413$ ,  $p=0.5476$ ,  $p=0.099$ , respectivamente). Al comparar la viabilidad en las células provenientes de ratones en reposo se encontraron valores de 66.77% y 73.7% con respecto a las células sin LPS, sin observarse diferencias estadísticas entre ellos ( $p=0.2222$ ). En condiciones de estrés crónico, se encontró un incremento de la viabilidad de un 58.3% y 66.95% con las concentraciones 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Sin embargo, solamente la concentración 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue estadísticamente significativa ( $p=0.0317$ ) con respecto a las células sin estimulación. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.6905$ ).



**Figura 4:** Viabilidad celular de linfocitos de bazo estimulados con LPS a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 72 horas, provenientes de ratones bajo condiciones de reposo y estrés crónico. Panel A: machos y Panel B: hembras. Se consideran como significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

Como se muestra en la Figura 4B, en el caso de las hembras no se encontraron diferencias significativas en los grupos estrés y reposo en su estado basal, sin activación ( $p=0.3095$ ), como al estimularlas con LPS a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.5476$ ) y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.6905$ ). Al estimular las células con LPS incrementó la viabilidad celular, hasta un 70% en condiciones de reposo, no observándose diferencias estadísticas al compararlo con el control sin estímulo (LPS 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :  $p=0.1508$ ). Con respecto a la viabilidad de las células en condiciones de estrés se observó un incremento al

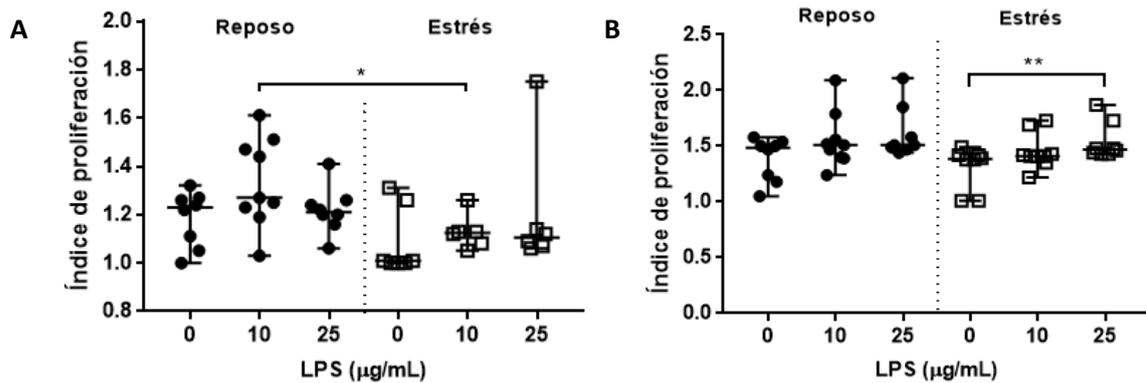
estimular las células con LPS a 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no siendo estadísticamente significativo con respecto a las células sin estímulo con una  $p=0.3095$ ,  $p=0.1508$ , respectivamente.

#### **4) Ensayos de proliferación celular en linfocitos estimulados con LPS**

Con el fin de evaluar si el estrés crónico es capaz de modular la proliferación de linfocitos de bazo se realizó un ensayo de proliferación utilizando CFSE como marcaje, en células de bazo estimuladas con LPS o sin estimular, analizándose por citometría de flujo.

En machos, (Figura 5A), al realizar la prueba Mann Whitney no se encontraron diferencias significativas entre los ratones estrés y reposo, sin estimular ( $p=0.1750$ ) y con LPS a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.1515$ ). Sin embargo, en las células con LPS a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observó una disminución estadísticamente significativa en el índice de proliferación en condiciones estrés, en comparación con el grupo reposo ( $p=0.0330$ ). En el grupo reposo no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, encontrándose en todos los casos un índice de proliferación entre 1 y 1.5. Los valores de  $p$  se muestran a continuación: LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.1457$  y LPS 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.9848$ . En el grupo estrés se encontró un incremento en la proliferación celular, sin embargo, en ningún caso fue significativo. Los valores de  $p$  se muestran a continuación: LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.1841$  y LPS 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.1235$ .

Como se muestra en la Figura 5B, en hembras no se encontraron diferencias significativas entre protocolos, obteniendo los siguientes valores de  $p$ : (LPS 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.1848$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.3855$  y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p=0.1667$ ). Al comparar las células en condición de reposo estimuladas a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.3086$ ) y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.1514$ ) con respecto a las células en condiciones basales no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, si fue posible observar una mayor proliferación. En el caso del grupo estrés, se encontró un incremento al estimular las células con LPS a ambas concentraciones, siendo solamente significativo en la concentración 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0.0036$ ), en comparación con las células en estado basal.



**Figura 5:** Índice de proliferación de linfocitos de bazo estimulados con LPS a 10 µg/mL y 25 µg/mL por 72 horas, provenientes de ratones bajo condiciones de reposo y estrés crónico. Panel A: machos y Panel B: hembras. Se consideran como significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

### 5) Evaluación del perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en linfocitos de bazo activados

Con el fin de determinar si el estrés crónico es capaz de modular el perfil de citocinas de tipo Th1, Th2 y Th17 se evaluaron las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17A e IL-10 obtenidas del sobrenadante de linfocitos de ratones estresados por restricción de movimiento mediante citometría de flujo.

Al medir los niveles de IL-2 (Figura 6a), provenientes de ratones macho no se observó ningún efecto entre el grupo reposo y estrés, esto al comparar tanto las células sin estímulo como las activadas con LPS a 10 µg/mL, y 25 µg/mL ( $p=0.6043$ ,  $p=0.3869$ ,  $p=0.1996$ , respectivamente). De igual manera, al comparar las células en condiciones de reposo estimuladas con LPS y sin estimular no se obtuvieron diferencias significativas ( $p=0.4557$ ) teniendo valores de 2.07-0.12 y 2.60-0.12 pg/mL. Con respecto al grupo estrés los niveles de IL-2 aumentaron en las células estimuladas con LPS, obteniendo valores de 0.88-0.12 y 0.89-0.0 pg/mL, sin embargo, no fueron estadísticamente significativos (LPS 10 µg/mL,  $p=0.6602$ ; LPS 25 µg/mL,  $p=0.3701$ ). Con respecto a los niveles de IL-4, reportados en la Figura 6b, al comparar los grupos reposo y estrés no se observaron diferencias entre las células sin estímulo como en el tratamiento con LPS (sin activar:  $p=0.6828$ , LPS 10 µg/mL:  $p=0.5350$ , LPS 25 µg/mL  $p=0.4126$ ), obteniendo valores de 0.76-0.0, 0.74-0.0 y 0.81-0.0 pg/mL. En el grupo reposo no se detectó ningún efecto al estimular las células con LPS (10 µg/mL,  $p=0.7552$ ; 25 µg/mL,  $p=0.7960$ ), observándose el mismo efecto en condiciones estrés (10 µg/mL,  $p=0.6970$ ; 25 µg/mL,  $p=0.9266$ ). Cabe añadir que los niveles encontrados

en su mayoría fueron de 0 pg/mL, lo cual nos indica una ausencia de esta citocina en las condiciones establecidas.

Como se observa en la Figura 6c, al comparar los niveles de IL-6 entre el grupo reposo y estrés no se observaron diferencias significativas entre las células sin estimular y las activadas con 10 µg/mL y 25 µg/mL de LPS ( $p=0.4452$ ,  $p=0.2343$ ,  $p=0.9452$ , respectivamente), sin embargo, si se reportaron diferencias significativas entre tratamientos. En el grupo reposo incrementaron los niveles de IL-6 con respecto al control obteniéndose valores de 199.59-0.56 y 338.56-0.56 pg/mL, siendo estadísticamente significativo en ambas concentraciones de LPS ( $p=0.0379$ ), teniendo una mejor respuesta en la concentración 25 µg/mL. Con respecto al grupo estrés, al estimular las células con LPS los niveles de IL-6 aumentaron, siendo en ambas concentraciones estadísticamente significativo (10 µg/mL,  $p=0.022$ , 25 µg/mL,  $p=0.0411$ ), con valores medios de 33.05-0.96 y 26.03-0.96 pg/mL. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de LPS utilizadas.

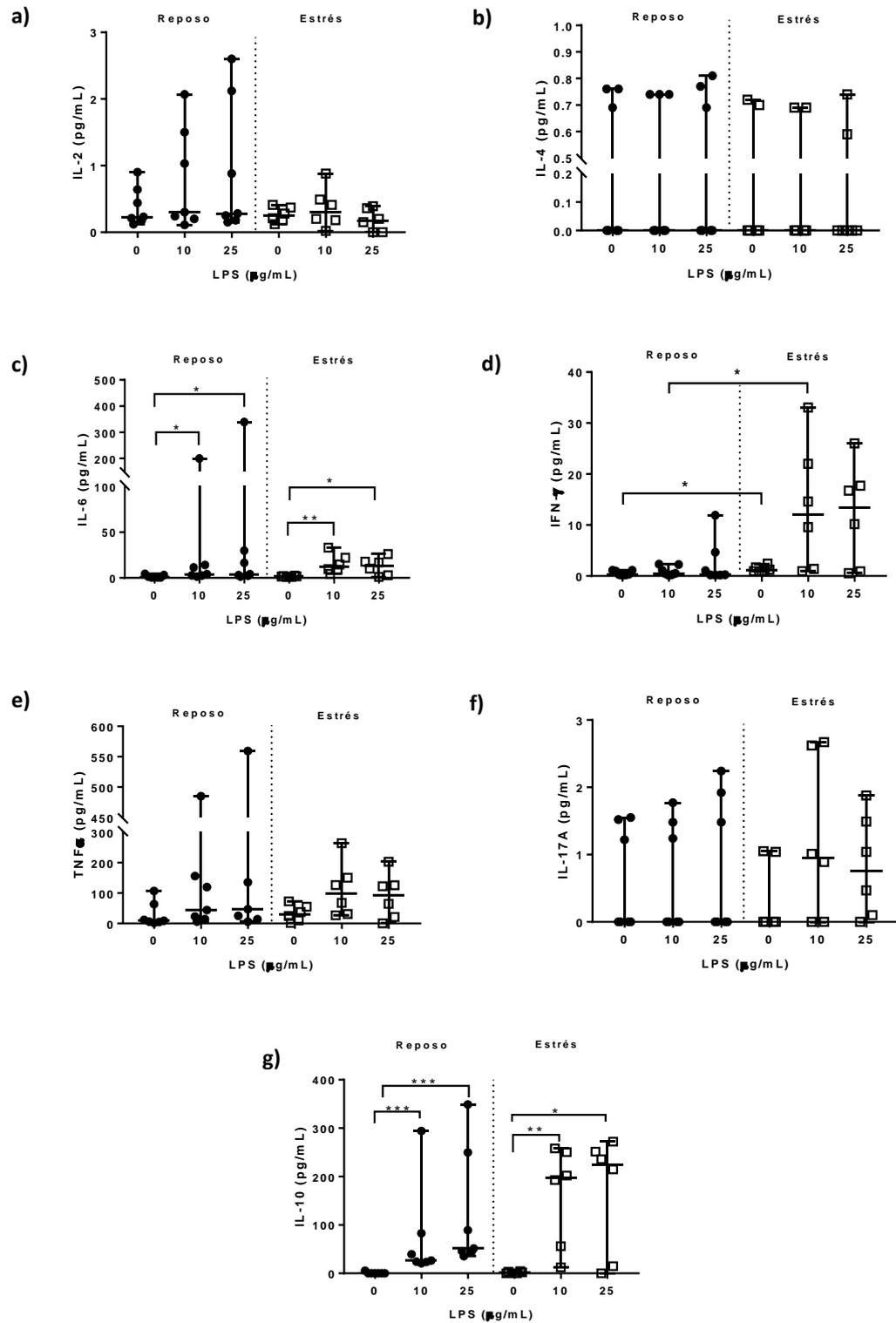
En la Figura 6d se muestran los resultados correspondientes a IFN- $\gamma$ , encontrándose un incremento significativo en condiciones estrés sin estímulo obteniendo valores de 2.42-0.16 pg/mL ( $p=0.0466$ ), así como con LPS a 10 µg/mL con un rango de 33.05-0.10 pg/mL, en ambos casos comparándolo con el grupo reposo ( $p=0.0221$ ). Esto nos indica que la presencia de IFN- $\gamma$  es modulado por el estrés crónico. Por otra parte, a la concentración de 25 µg/mL se observó un aumento de IFN- $\gamma$  con un valor medio de 26.03-0.17 pg/mL, no siendo significativo ( $p=0.051$ ). Estos resultados demuestran que el estrés modula la liberación de esta citocina Th1. Con respecto a los resultados correspondientes de los niveles de esta citocina entre cada grupo por separado no se observaron diferencias significativas tanto en condiciones de reposo (10 µg/mL,  $p=0.4347$ , 25 µg/mL,  $p=0.9709$ ), como en estrés (10 µg/mL,  $p=0.0844$ , 25 µg/mL,  $p=0.02879$ ), reportándose valores promedio de 2.31-0.10, 11.92-0.16 pg/mL, en ratones control y 0.91-33.05 y 26.03-0.91 pg/mL en ratones estresados.

Al analizar TNF- $\alpha$  (Figura 6e) no se observaron diferencias significativas entre protocolos (sin activar,  $p=0.5338$ ; LPS 10 µg/mL,  $p=0.5338$  y LPS 25 µg/mL,  $p=0.8337$ ) con valores promedio de 106.49-1.76, 485.09-5.85 y 559.26-0.00 pg/mL, respectivamente. En condiciones de reposo se reportó un incremento al estimular las células con LPS con valores de 119.67-1.76 pg/mL en el caso de 10 µg/mL y 559.26-

1.76 pg/mL a 25 µg/mL, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ( $p=0.0973$ ) con respecto al control. De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de las células del grupo estrés (10 µg/mL,  $p=0.0931$  y 25 µg/mL  $p=0.3095$ ), observándose valores de 264.03-1.78 y 213.09-1.78 pg/mL, respectivamente.

En la Figura 6f se muestran los niveles correspondientes a IL-17A reportándose en un rango de 1.55-0.00 pg/mL en células sin LPS, 2.67-0.00 pg/mL al estimular con LPS a 10 µg/mL y 2.24-0.00 pg/mL en LPS a 25 µg/mL, sin encontrar diferencias significativas entre las condiciones de estrés y reposo (sin activar,  $p=0.4371$ ; 10 µg/mL,  $p=0.4901$ ; 25 µg/mL,  $p=0.7203$ ). De igual manera no se obtuvieron resultados significativos al comparar cada grupo por separado entre tratamientos. Los valores de  $p$  obtenidos se muestran a continuación: grupo reposo (10 µg/mL,  $p=0.999$ ; 25 µg/mL,  $p=0.7552$ ), grupo estrés (10 µg/mL,  $p=0.3723$ ; 25 µg/mL,  $p=0.1991$ ). De igual manera se muestran los valores medios de cada concentración: reposo (LPS 10 µg/mL: 1.77-0.00 pg/mL, 25 µg/mL: 2.24-0.00 pg/mL); estrés (LPS 10 µg/mL: 2.67-0.00 pg/mL, 25 µg/mL: 1.88-0.00 pg/mL).

Con respecto a IL-10 (Figura 6g), no se observaron diferencias significativas entre protocolos (sin activar,  $p=0.4126$ ; LPS 10 µg/mL,  $p=0.2949$ ; LPS 25 µg/mL,  $p=0.9452$ ). Sin embargo, si se observan diferencias entre tratamientos. Los valores reportados corresponden a lo siguiente: sin activar, 5.37-0.00 pg/mL, LPS 10 µg/mL, 294.08-20.89 pg/mL, LPS 25 µg/mL, 348.79-0.00 pg/mL. En el caso del grupo reposo, se observa un aumento de IL-10 al estimular las células con LPS a 10 µg/mL (294.08-0.00 pg/mL) y 25 µg/mL (348.79-0.00 pg/mL) siendo estadísticamente significativo en comparación con las células sin estímulo ( $p=0.006$ ), teniendo un mejor efecto a 25 µg/mL. Por otra parte, en el grupo estrés, se observó un incremento de IL-10 en las células estimuladas con LPS en comparación con las que no tienen LPS siendo estadísticamente significativo en ambos casos: 10 µg/mL, 258.01-0.00 pg/mL ( $p=0.0022$ ), 25 µg/mL, 272.19-0.00 pg/mL ( $p=0.0281$ ). Cabe añadir que, si bien no hubo diferencias significativas entre protocolos, se observó una mayor concentración de IL-10 en el grupo estrés, lo cual nos indica que la secreción de esta citocina es potenciada en condiciones de estrés crónico.



**Figura 6:** Efecto del estrés crónico en la modulación del perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en machos de la cepa BALB/c. Después de someter a los ratones a un protocolo de restricción de movimiento, se aislaron linfocitos de bazo, se ajustaron a 250,000 células/pozo y se activaron con LPS (10 μg/mL y 25 μg/mL), por 72 horas. Posteriormente se cuantificaron las citocinas Th1/Th2/Th17 mediante citometría de flujo. Se consideran como significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

Al igual que en machos, en hembras se evaluó el perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 del sobrenadante proveniente de células en condiciones de reposo y estrés, ya sea estimuladas o sin estímulo.

Al analizar IL-2 (Figura 7a), no se observaron diferencias significativas entre protocolos, ya sea en células sin activar ( $p=0.8968$ ), activadas con LPS a 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.500$ ) o LPS a 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.8413$ ), cuyos valores oscilan entre 2.26-0.00  $\text{pg/mL}$ , 2.26-0.00  $\text{pg/mL}$  y 2.44-0.00  $\text{pg/mL}$ , respectivamente. De igual forma no se encontraron cambios en los niveles de IL-2 al comparar las células sin estímulo con las tratadas con LPS a 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.354$ ) y 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.2222$ ) tanto en el grupo reposo como el grupo estrés ( $p=0.4603$ ,  $p=0.5873$ ). Los niveles obtenidos de cada una de las muestras se presentan a continuación: 2.26-0.00  $\text{pg/mL}$  y 2.44-0.00  $\text{pg/mL}$ . En el caso de IL-4, el cual se representa en la Figura 7b, tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre protocolos, tanto en células sin activar ( $p=0.3095$ ), tratadas con LPS a 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.7381$ ) y 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.8413$ ). Al comparar los niveles de IL-4 dentro de cada grupo experimental, bajo las diferentes condiciones no se encontraron diferencias significativas con respecto a las células sin estímulo, tanto en condiciones de reposo (10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.5873$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.5952$ ) como en el grupo estrés (10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.4127$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.8889$ ). En todos los casos los niveles obtenidos de IL-4 oscilan entre 0.5 y 0.8  $\text{pg/mL}$ , lo que nos indica una baja concentración de esta citocina en sobrenadante.

En la Figura 7c, se muestran los niveles de IL-6 de los grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos, bajo ninguna de las condiciones empleadas (sin LPS, 4.31-0.57  $\text{pg/mL}$  ( $p=0.0999$ ); 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.6905$  y 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.8413$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos dentro de los grupos. En condiciones de reposo se observa un aumento de IL-6 al estimular las células con LPS a las dos concentraciones ( $p=0.0159$ ), encontrándose el mismo efecto en el grupo estrés ( $p=0.0079$ ), dichos valores oscilan entre 0.84-0.54 y 0.78-0.54  $\text{pg/mL}$  en condiciones de reposo mientras que, en condiciones estrés, se observan valores de 70.45-0.71 y 72.26-0.57  $\text{pg/mL}$ .

En la Figura 7d se muestran los niveles correspondientes a IFN- $\gamma$ , cuyos valores encontrados fueron los siguientes: sin activar, 0.78-1.93  $\text{pg/mL}$ ; LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 6.13-1.21  $\text{pg/mL}$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 11.33-1.01  $\text{pg/mL}$ . No se observaron diferencias

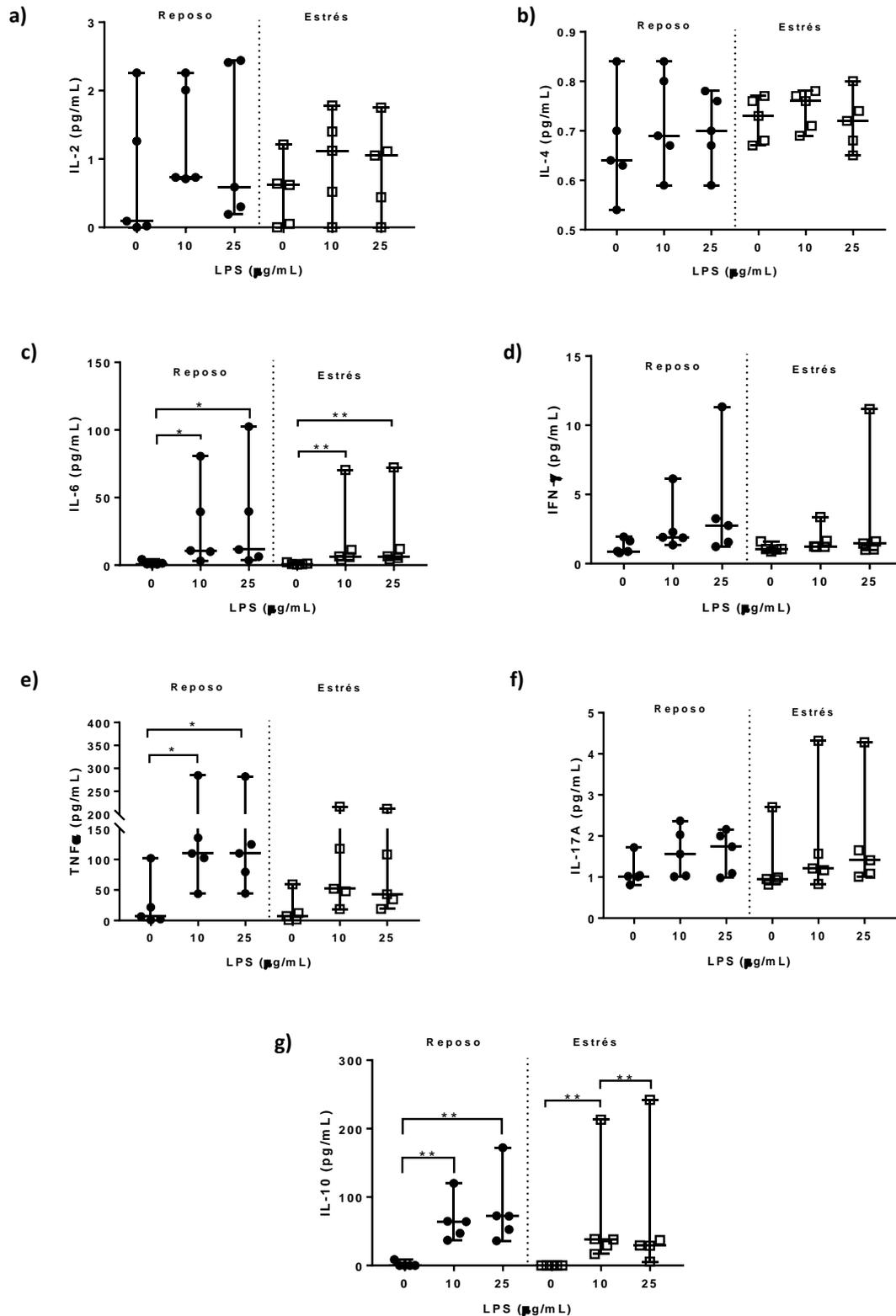
significativas entre los ratones estrés y reposo, tanto en células sin estimular ( $p=0.8889$ ) como en las tratadas con LPS a 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.1508$ ) y 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0.3095$ ), lo cual nos indica que el estrés no tiene un efecto en la secreción de esta citocina Th1, por lo menos en hembras de la cepa BALB/c. Al estimular las células con LPS, no se mostró ningún efecto, tanto en el grupo reposo (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0952$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0952$ ), como el grupo estrés (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0556$ , LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.4524$ ). Los valores correspondientes a esta citocina en cada una de las concentraciones empleadas se muestran a continuación según el orden mencionado: 6.13-0.78, 11.33-0.88 y 3.37-0.88, 11.17-0.88  $\text{pg/mL}$ .

En el caso de  $\text{TNF}\alpha$  (Figura 7e), no se observaron diferencias entre ambos grupos bajo ninguna de las condiciones establecidas en el experimento (sin activar,  $p=0.9999$ ; 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.5476$ ; 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.2222$ ), obteniéndose los siguientes valores: LPS 0  $\mu\text{g/mL}$ , 59.34-0.1  $\text{pg/mL}$ ; LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 284.47-10.85  $\text{pg/mL}$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 281.9-18.92  $\text{pg/mL}$ . Bajo un estímulo, en este caso LPS, en el grupo reposo se encontró un incremento de  $\text{TNF}\alpha$ , siendo este estadísticamente significativo con respecto a las células sin LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0159$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0317$ ). En cambio, en el grupo estrés no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0556$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.0556$ ). Los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  reportados en los tratamientos se mencionan a continuación: reposo (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ : 284.47-0.91  $\text{pg/mL}$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 281-0.91  $\text{pg/mL}$ ), estrés (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 216-1.00  $\text{pg/mL}$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 211.85-1.00  $\text{pg/mL}$ ).

Por otra parte, al analizar los niveles de IL-17A, una citocina proinflamatoria cuyo resultado se muestra en la Figura 7f, no se detectaron diferencias significativas entre grupos, oscilando los valores entre 2.70-0.81  $\text{pg/mL}$  en células sin LPS, 4.32-0.83  $\text{pg/mL}$ , en células estimuladas con LPS 10  $\mu\text{g/mL}$  y 4.28-0.98  $\text{pg/mL}$  en el caso de la estimulación con 25  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual muestra que, el protocolo de restricción de movimiento llevado a cabo en este proyecto no induce cambios en los niveles de esta citocina. Con respecto al análisis de los grupos experimentales se detectó un incremento en los niveles de IL-17A, comparándolo con las células sin estimulación. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se observaron diferencias significativas. Los valores de IL-17A se muestran a continuación: reposo (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 2.37-0.81

pg/mL ( $p=0.2460$ ), LPS 25  $\mu\text{g/mL}$  2.16-0.81 pg/mL ( $p=0.1508$ ), estrés: (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 4.32-0.82 pg/mL ( $p=0.3095$ ), LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 4.28-0.82 pg/mL ( $p=0.0952$ )).

En cuanto a los niveles de IL-10, provenientes de células mononucleares de bazo (Figura 7g), no se observaron diferencias significativas entre los grupos (sin activar,  $p=0.9999$ ; LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.3095$  y LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p=0.2222$ ). Los niveles obtenidos fueron los siguientes: 0  $\mu\text{g/mL}$ , 8.58-0.00 pg/mL; 10  $\mu\text{g/mL}$ , 213.18-29.36 pg/mL y 25  $\mu\text{g/mL}$ , 242.13-5.58 pg/mL. Al comparar las células estimuladas con LPS en condiciones de reposo se encontró un incremento de los niveles de IL-10 en ambas concentraciones empleadas, siendo estadísticamente significativas con respecto al control (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 120.04-0.00 pg/mL ( $p=0.0079$ ), LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 172.13-0.00 pg/mL ( $p=0.0079$ )). En condiciones de estrés se observó un incremento significativo de IL-10 al estimular las células con LPS, con respecto al control basal (LPS 10  $\mu\text{g/mL}$ , 213.18-0.00 pg/mL ( $p=0.0079$ ), LPS 25  $\mu\text{g/mL}$ , 242.13-0.00 pg/mL ( $p=0.0079$ )).



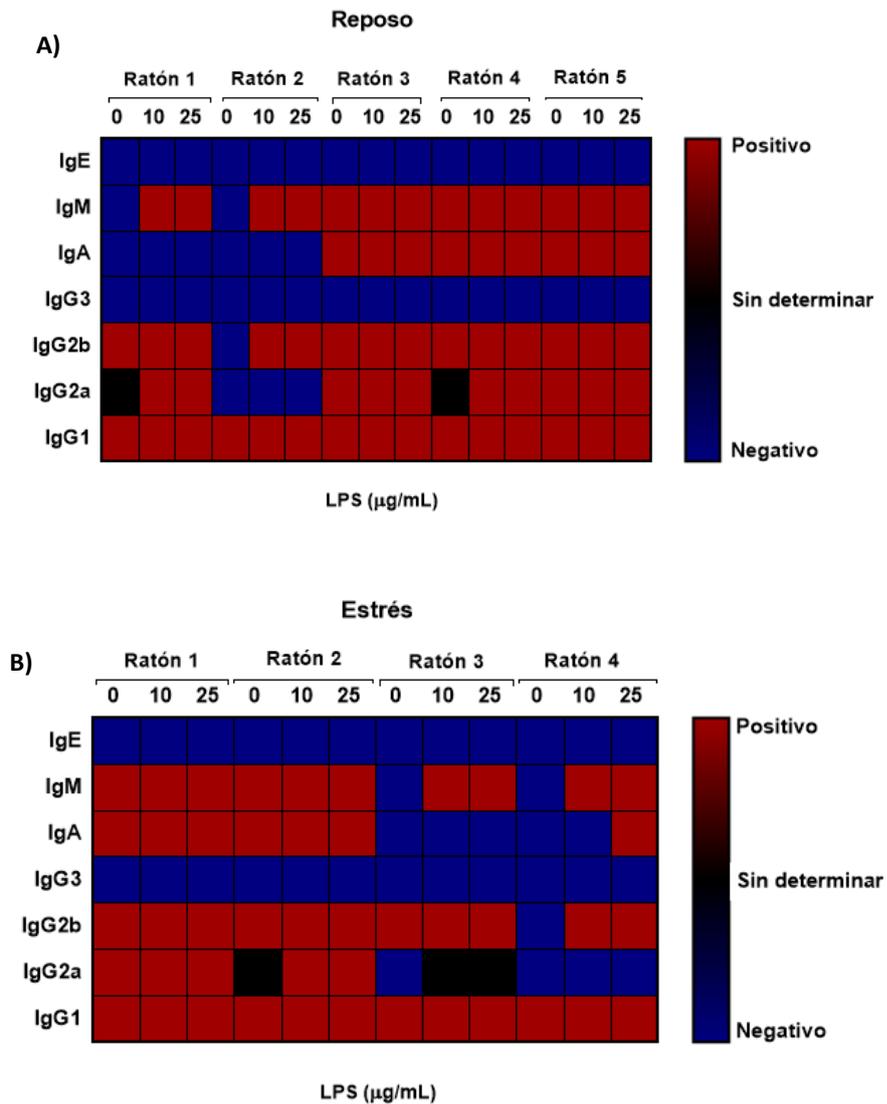
**Figura 7:** Efecto del estrés crónico en la modulación del perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en hembras de la cepa BALB/c. Después de someter a los ratones a un protocolo de restricción de movimiento, se aislaron células mononucleares de bazo, se sembraron 250,000 células/pozo y se activaron con LPS (10  $\mu\text{g/mL}$  y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 72 horas. Posteriormente se cuantificaron las citocinas Th1/Th2/Th17 mediante citometría de flujo. Se consideran como significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

## **6) Análisis de isotipo en células de bazo provenientes de ratones sometidos a estrés crónico**

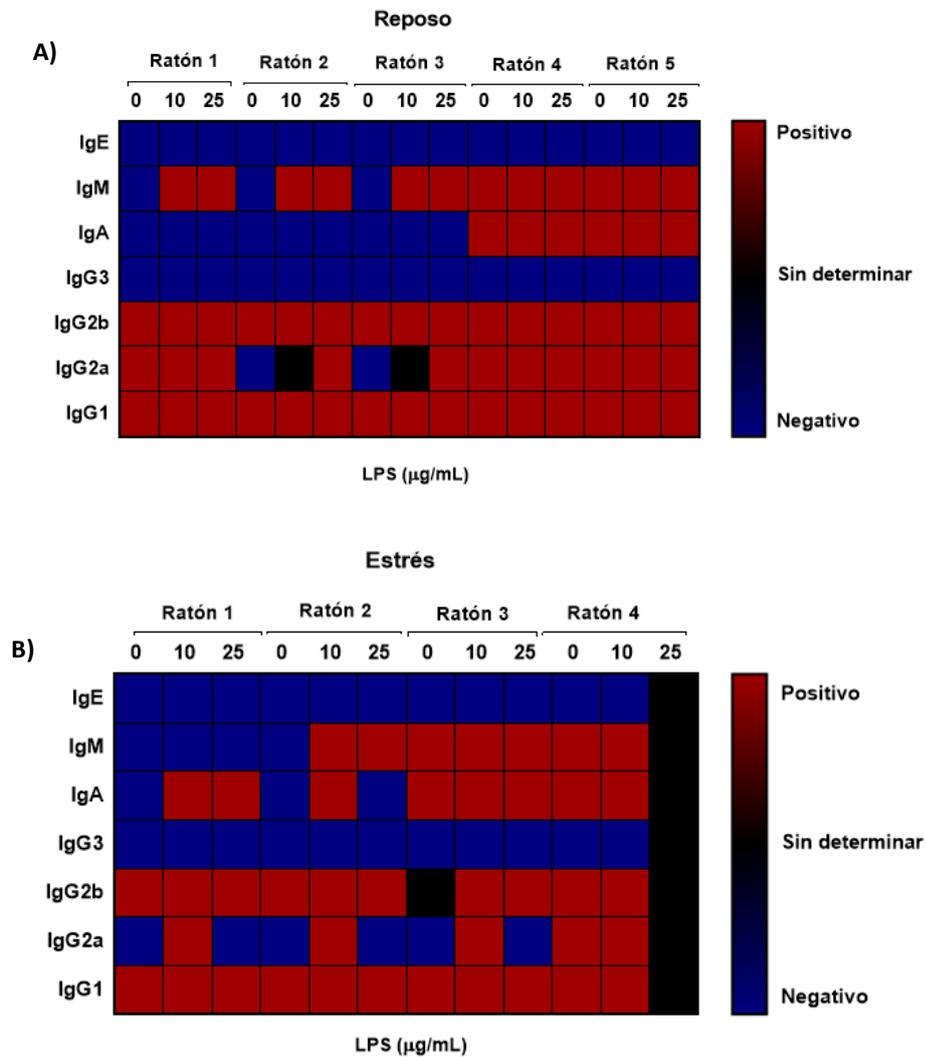
Con el fin de observar si el estrés crónico es capaz de modular el cambio de isotipo de inmunoglobulinas se colectaron las células de bazo estimuladas con LPS o sin estimular y se analizaron por citometría de flujo.

En machos en condiciones reposo, sin estimulación con LPS se observó la presencia de las inmunoglobulinas IgM, IgA, IgG2b e IgG1, encontrándose en 3 de los 5 ratones empleados. Al analizar los isotipos en las células bajo estímulo se encontró la presencia de IgM, IgA, IgG2b, IgG2a e IgG1 en las células tratadas con ambas concentraciones de LPS, En ninguno de los casos se detectó la presencia de IgE e IgG3. En el grupo estrés se observó un perfil similar que en el grupo reposo. En células sin LPS se detectó la presencia de IgM, IgA, IgG2b e IgG1, considerando en todos los casos 2 de 4 ratones. En las células estimuladas fue posible la detección de IgM, IgA, IgG2b, IgG1, encontrando además la presencia de IgG2a, tanto en la concentración 10  $\mu\text{g/mL}$  como 25  $\mu\text{g/mL}$ . De igual manera, en ningún caso fue posible la detección de IgG2 e IgE. En hembras se observó un perfil similar en condiciones reposo y estrés crónico. En el grupo reposo se detectó la presencia de IgG2b, IgG2a e IgG1 en células sin LPS, por otra parte, al tratar las células se observó la presencia de IgM, en ambas concentraciones de LPS. En todos los casos se determinó la presencia en 3 ratones de 5. En el caso del grupo estrés, el perfil de isotipo no cambio, con excepción de la presencia de IgM e IgA en las células sin estimulación, así como la ausencia de IgG2a. En las células con LPS se observó la presencia de IgM, IgA, IgG2b e IgG1, no detectando IgG2b. En todos los casos se determinó la presencia de cada isotipo en 2 ratones de 4. En ninguno de los casos fue posible la detección de IgE e IgG3.

La detección de dichos isotipos, en todas las condiciones y protocolos nos indica una respuesta humoral contra antígenos bacterianos, sin embargo, es necesario cuantificar dichos isotipos para poder comparar su presencia entre las concentraciones de LPS empleadas y las células sin estimular.



**Figura 8:** Efecto del estrés crónico en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en el sobrenadante de células de bazo de ratones macho BALB/c. Panel A: reposo, Panel B: estrés. Después de someter a los ratones a un protocolo de restricción de movimiento, se aislaron células mononucleares de bazo, se sembraron 250,000 células/pozo y se activaron con LPS (10  $\mu\text{g/mL}$  y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 72 horas. Posteriormente se cuantificaron los isotipos de inmunoglobulinas mediante citometría de flujo.



**Figura 9:** Efecto del estrés crónico en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en el sobrenadante de células de bazo de ratones hembra BALB/c. Panel A: reposo, Panel B: estrés. Después de someter a los ratones a un protocolo de restricción de movimiento, se aislaron células mononucleares de bazo, se sembraron 250,000 células/pozo y se activaron con LPS (10  $\mu\text{g/mL}$  y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 72 horas. Posteriormente se cuantificaron los isotipos de inmunoglobulinas mediante citometría de flujo.

## DISCUSIÓN

El estrés crónico es considerado como una experiencia emocional negativa, la cual tiene efectos en la salud del individuo, propiciando el desarrollo de diversas patologías en el organismo. La exposición a diversos estresores ya sea de forma aguda o crónica, permiten la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y el eje simpato-adreno-medular (SAM) permitiendo la liberación de catecolaminas y glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores), hormonas del estrés que tienen un impacto en la regulación del sistema inmune (Fink, 2017; Qiao, 2018).

La pérdida o ausencia de ganancia del peso corporal es un indicador del estrés crónico en los individuos, esto al inducir cambios metabólicos que alteran la homeostasis del organismo, en conjunto con los cambios fisiológicos y conductuales que induce el estresor. Diversos autores han reportado que, en ratones sometidos a un protocolo de estrés, se presenta pérdida de peso corporal, un incremento en los niveles plasmáticos de glucocorticoides y catecolaminas, así como conductas relacionadas con ansiedad o depresión (Jeong, 2013; Shoji, 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado en la literatura con respecto a la pérdida del peso corporal, observándose una pérdida del peso en los ratones estresados en ambos sexos, principalmente los primeros días del protocolo. Jeong y colaboradores (2013) reportaron una pérdida de peso corporal en los ratones sometidos a un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento, siendo atribuido principalmente a la disminución del consumo de alimento, esto debido a la desregulación de las hormonas reguladoras del apetito como grelina y leptina. Sin embargo, en nuestro experimento no se monitoreó el consumo de alimento y agua, por lo cual no es posible establecer una relación entre el consumo de alimento y el peso corporal. Con respecto a la pérdida de peso por sexo se observa un efecto más pronunciado en machos que en hembras, las cuales a partir de la semana del protocolo de estrés recuperaron su peso corporal, teniendo una mayor ganancia que al inicio del protocolo. Esto puede ser debido a que durante el protocolo de estrés prolongado los ratones pueden adaptarse a las condiciones en las que se mantienen, disminuyendo los efectos que comúnmente se diferencian en situaciones de estrés, como lo es la activación de la vía HPA, la estabilización de los niveles de corticosterona, entre otros factores (Belda, 2015; Grissom, 2009).

Existen reportes que relacionan el estatus hormonal según el sexo con la adaptación o respuesta con el estrés crónico, teniendo diferentes respuestas bajo las mismas condiciones. Dichas variaciones abarcan desde la cantidad de hormonas de estrés liberadas hasta cambios cognitivos y morfométricos como la pérdida de peso, sin embargo, son pocos estudios los que se relacionan específicamente a las diferencias por sexo. Se ha reportado que las hembras tienen menor pérdida de peso corporal en condiciones de estrés crónico (Bowman, 2006), siendo uno de los posibles motivos el papel del estrógeno en la regulación del peso corporal. (Shi, 2009). Además, se ha reportado que los niveles basales de corticosterona pueden ser un indicio de la susceptibilidad al estrés, siendo reflejada dicha susceptibilidad a través de la pérdida de peso corporal y los niveles de corticosterona posteriores al estrés (Kim, 2013). Por lo tanto, la medición de los niveles de corticosterona previo y posterior al protocolo de estrés crónico nos podría permitir correlacionar la susceptibilidad al estrés con los efectos producidos.

El bazo es un órgano linfóide secundario, el cual cumple un papel crítico en la prevención y el desarrollo de enfermedades. Bajo la influencia de un microambiente inflamatorio o el desarrollo de situaciones patológicas, es posible causar alteraciones morfométricas en dicho órgano. Con el fin de determinar si el estrés crónico tiene efectos sobre el bazo, se contabilizaron los esplenocitos obtenidos de ratones sometidos a estrés por restricción de movimiento, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos, en ninguno de los dos sexos. Uno de los principales motivos de este resultado es debido a la gran variabilidad de células obtenidas en cada ratón, causado principalmente por el tamaño del bazo y la variabilidad del peso corporal de los ratones. A pesar de no encontrar diferencias significativas fue posible observar una tendencia a un mayor número de células en los ratones estresados, lo cual nos indica alteraciones en el bazo, sin embargo, es necesario considerar la longitud y el peso de dicho órgano para poder confirmar si realmente existe un cambio morfológico. Con respecto a este hecho se ha reportado que en ratones sometidos a estrés crónico hay alteraciones morfológicas en el bazo, siendo una de ellas la esplenomegalia, lo cual podría ser una de las razones de la variabilidad en la cantidad de células, así como el incremento de los esplenocitos en ratones estrés (Foertsch, 2020; Avitsur, 2003; Stankiewicz; 2014).

Como se ha mencionado con anterioridad, el funcionamiento de las células del sistema inmune se ve afectado bajo la influencia de estresores, como lo es la respuesta a antígeno, la sensibilidad a glucocorticoides, la proliferación de los linfocitos y su viabilidad celular (Dragos, 2010; Bagatini, 2017). Es por ello por lo que, con el fin de observar si un estímulo estresor es capaz de alterar el funcionamiento de las células inmunes se planteó tratar con LPS células de bazo en condiciones de estrés.

Si bien nuestros resultados nos muestran una tendencia de incremento de la viabilidad al estimular con LPS las células, en ambos protocolos solo se observó un aumento significativo en la viabilidad celular en ratones estresados, en las células con LPS a 25 µg/mL, lo que nos indica una mayor reactividad al LPS en condiciones estrés. Nuestros resultados de viabilidad coinciden con lo reportado por Edgar, *et al* (2003) donde se observa una afectación de la viabilidad y proliferación celular solamente en células T estimuladas con ConA mientras que las células B tratadas con LPS incrementa la proliferación en ratones sometidos a estrés crónico. Por otra parte, Foertsch y colaboradores (2020) reportaron que existe un incremento de la viabilidad en células estimuladas con LPS bajo estrés social. De esta forma, el incremento de la viabilidad por LPS en células B puede darse a través de la vía TLR4 (Schweighoffer, 2017). Uno de los motivos de dicho efecto en la viabilidad podría ser debido a la ausencia del receptor de la hormona liberadora de corticotropina, una de las hormonas involucradas en la activación de la vía hipotalámica- pituitaria- adrenal y la posterior liberación de glucocorticoides, debido a que se ha reportado que la presencia de dicho receptor puede afectar la viabilidad celular en situación de estrés, esto en células B murinas, sin embargo, la población de células T no es afectada (Harlé, 2018). Es por ello por lo que es necesario identificar las poblaciones celulares para discernir cuál de estas es mayormente afectada en condiciones estrés.

Por otra parte, al realizar los ensayos de proliferación encontramos un efecto diferencial en machos y hembras en condiciones reposo y estrés bajo un estímulo estresor. Existen reportes contradictorios al respecto, donde se observa una disminución de la población de leucocitos, tanto en ratas como en ratones, (Divyashree, 2015; Laukova, 2018), así como un incremento de la sensibilidad a glucocorticoides en células B humanas (Lill- Elghanian, 2002; Maydych, 2017). En machos, se observó una disminución de la proliferación celular en condiciones estrés al estimular con LPS en comparación con las células en condiciones reposo, coincidiendo

con lo reportado por los autores previamente mencionados. Mientras que en hembras incrementó el índice de proliferación en células estresadas al estimularlas con LPS, contrastando con lo reportado por diversos autores donde, bajo diversas condiciones de estrés crónico, se observa un impacto en la población de linfocitos, siendo esto atribuido principalmente a la susceptibilidad a glucocorticoides que la célula adquiere (McGregor, 2016; Costa, 2018). Estos resultados nos indican que, entre sexos, existe un efecto diferencial en la proliferación celular en ambos protocolos.

Bajo la influencia de un estresor se desencadena una serie de cambios en el cerebro, trayendo consigo la activación del eje HPA y SAM con la subsecuente liberación de catecolaminas y glucocorticoides, los cuales tienen un efecto en la diferenciación de las células del sistema inmune, así como en su capacidad de secretar citocinas (Tian, 2014; Laukova, 2013).

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria, producida por una variedad de células del sistema inmune, como las células T, células B, macrófagos y células dendríticas, cuyo papel principal es bloquear los mediadores inflamatorios, así como diferenciación de las células Th1. Nuestros resultados indican un incremento de los niveles de interleucina-10, tanto en machos como en hembras, al estimular las células con LPS, en ambos protocolos. Sin embargo, fue posible identificar una mayor concentración de esta citocina en ratones estresados, por lo tanto, el estrés potencia los niveles de IL-10. Con respecto a ello, se ha reportado un incremento en los niveles de IL-10 en ratones bajo un protocolo de estrés crónico, tanto a nivel plasmático, como a nivel sobrenadante (Curtin, 2009) y transcripcional (Hu, 2014), en ratones de la cepa BALB/c, C57BL/6 y en ratas Sprague-Dawley, sometidos a un protocolo de restricción de movimiento. Por otra parte, la citocina pro-inflamatoria IL-17A no presentó ningún cambio bajo tratamientos ni entre protocolos, por lo que no hay una modulación del fenotipo Th17 en ninguna condición, ni entre sexos. Esto contrasta con lo reportado por Harpaz (2002) donde se observó un incremento de IL-17 en ratones sometidos a estrés crónico, propiciando una susceptibilidad autoinmune.

Con respecto a la citocina Th1, TNF- $\alpha$ , no se observó una modulación en ninguno de los protocolos establecidos, por lo menos en machos. En cambio, en el caso de las hembras, se observó un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  en las células estimuladas con LPS solamente en condiciones de reposo, siendo este efecto inhibido en estrés. Se

ha reportado que el incremento de IL-10 es capaz de suprimir la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , esto en ratas sometidas a nado forzado (Connor, 2005), lo cual se observa en nuestro experimento correspondiente a hembras.

Al analizar IFN- $\gamma$ , una citocina proinflamatoria encargada de la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en linfocitos Th1, además de participar en la activación de células dendríticas, macrófagos, y linfocitos NK, se encontró un incremento de los niveles de IFN- $\gamma$  en ratones macho estresados, tanto en células sin estimular como al estimularlas con LPS, lo que nos indica que la secreción de esta citocina es mediada por el estrés. Existen reportes al respecto donde se observa una disminución (Tournier, 2001), así como un incremento (Aviles, 2004; Merlot, 2002) de los niveles de IFN- $\gamma$  en diferentes protocolos de estrés, como restricción de movimiento, estrés social y nado forzado. Esto nos indica que la secreción de esta citocina varía dependiendo del tipo de protocolo establecido.

IL-6 es una citocina proinflamatoria, liberada bajo situaciones de estrés y secretada tanto por células del sistema inmune, así como por adipocitos y células epiteliales, teniendo un papel en la proliferación de la célula B, así como en el desarrollo de enfermedades, como el cáncer. Tanto en hembras como en machos se observó un incremento de los niveles de IL-6 al estimular las células con LPS. Esto coincide con lo reportado por Voorhees y colaboradores (2013) donde se reporta un incremento de los niveles plasmáticos de IL-6 en ratones estrés, así como en sobrenadantes de células de ratones sometidos a estrés social (Merlot, 2002). Con respecto a la citocina IL-4 e IL-2 no se observaron diferencias significativas en las células estimuladas con LPS, por lo que no ocurrió un cambio de la respuesta Th1/Th2. Esto contrasta con lo reportado por Ahmad y colaboradores (2015) donde, en ratones sometidos a un protocolo de estrés crónico se observa un impacto en la función de las células T y la producción de citocinas Th1/Th2 a través de la vía H4R, esto al emplear un agonista del receptor H4R. De igual manera, es necesario realizar mediciones a nivel plasmático, así como en tejido cerebral para determinar el perfil regulatorio de citocinas en condiciones de estrés a nivel sistemático.

El estrés ejerce un efecto diferencial en la producción de anticuerpos de la célula T, esto a través de dos mecanismos; la secreción de citocinas T<sub>H</sub>, así como la recombinación de cambio de clase, el cual involucra el cambio de isotipo de

inmunoglobulinas (Stavnezer, 2008). Sin embargo, los reportes con respecto al estrés y el cambio de isotipo han sido pocos. Existen reportes que señalan que la presencia de IL-10 e IL-4 induce cambios de isotipo IgG, esto en células B humanas (Tangye, 2002). Esto coincide con nuestros resultados en ratones macho donde se observa la presencia de IgG2b, IgG2a e IgG1, tanto en células estimuladas como sin estímulo en ambas condiciones, lo que nos indica la activación de una respuesta humoral, y, en el caso de IgG2 dicha secreción es a través del reconocimiento con polisacáridos. De igual manera, IgA, una inmunoglobulina encontrada en mucosas se encontró en ambas condiciones, así como la inmunoglobulina IgM, relacionada con la respuesta inmune primaria (Schroeder, 2013). La presencia de IgA coincide con lo reportado por Jarillo-Luna (2004) donde indica que en ratones en condiciones de estrés agudo y crónico se encuentra presente IgA, con un incremento y una disminución de sus niveles, respectivamente, tanto a nivel plasmático como en tejido intestinal. Además, se ha reportado que la presencia de las citocinas IL-10 e IL-6 potencian la secreción de IgA (Hummelshoj, 2006). Si bien, en los ratones en reposo también se detectaron todos los isotipos no es posible confirmar si los niveles son menores a los encontrados en condiciones estrés sin estimular ya que el kit de detección es cualitativo. Por lo tanto, es necesario cuantificar los niveles obtenidos en cada condición, para poder dilucidar si hay un cambio en los niveles de estas inmunoglobulinas.

En el caso de hembras se observó un perfil similar que en machos; en todas las condiciones se detectó la presencia de IgG2b, IgG2a, IgG1, tanto en células estimuladas como sin LPS. Una vez tratadas con LPS fue posible detectar la presencia de IgA e IgM, esta última implicada en la respuesta humoral primaria, esto en condiciones reposo. Al analizar las células en condiciones estrés fue posible la detección de IgG2b, IgG2a e IgG1 en todas las condiciones, sin embargo, en las células en condiciones basales se observó además la presencia de IgM, lo cual nos sugiere que el estrés por sí mismo podría ser capaz de inducir la producción de anticuerpos y su posterior cambio de isotipo. Estos resultados coinciden con lo reportado por diversos autores donde se observa un cambio en los niveles de IgM, IgA, IgE e IgG a nivel sérico en ratones sometidos a estrés (Moazzam, 2013; Tournier, 2001). Sin embargo, nuestros resultados no pueden comprobarse en su totalidad, debido a que el resultado que plantea es cualitativo, por lo que es necesario cuantificar los niveles obtenidos para determinar si existen cambios mediados por el estrés.

## **CONCLUSIÓN**

El estrés crónico por restricción del movimiento modula el peso corporal de ratones BALB/c, así como indicadores de la activación de linfocitos de bazo por LPS, como viabilidad, proliferación, perfil de secreción de citocinas Th1/Th2 y cambio de isotipo de inmunoglobulinas, siendo dichos efectos de manera diferencial por sexo.

## **PERSPECTIVAS**

- 1) Comparar los efectos mediados por un protocolo de estrés agudo en el sistema inmunológico humoral y celular con los obtenidos en el protocolo de estrés crónico
- 2) Evaluar la expresión del gen *aicda* en células de bazo, para correlacionar el cambio de isotipo de inmunoglobulinas.

## REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. 2015. *Inmunología celular y molecular. StudentConsult*. Maarsen, Países Bajos: Elsevier.
- Ahmad, S. F., Zoheir, K. M. A., Ansari, M. A., Korashy, H. M., Bakheet, S. A., Ashour, A. E., & Attia, S. M. 2015. Stimulation of the histamine 4 receptor with 4-methylhistamine modulates the effects of chronic stress on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunobiology*, 220(3), 341-349.
- Assaf, A. M., Al-Abbassi, R., & Al-Binni, M. 2017. Academic stress-induced changes in Th1- and Th2-cytokine response. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8), 1237-1247.
- Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R., & Tangye, S. G. 2008. IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*, 181(3), 1767-1779.
- Aviles, H., Johnson, M. T., & Monroy, F. P. 2004. Effects of Cold Stress on Spleen Cell Proliferation and Cytokine Production during Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. *Neuroimmunomodulation*, 11(2), 93-102.
- Avitsur, R., Padgett, D. A., Dhabhar, F. S., Stark, J. L., Kramer, K. A., Engler, H., & Sheridan, J. F. 2003. Expression of glucocorticoid resistance following social stress requires a second signal. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(4), 507-513.
- Bagatini, M. D., Cardoso, A. M., Santos, A. A., & Carvalho, F. B. 2017. Immune System and Chronic Diseases. *Journal of Immunology Research*, 1-3.
- Belda Poyato. 2015. Sensibilización de la respuesta emocional y neuroendocrina al estrés: Contribución de las características de los estímulos estresantes y mecanismos implicados. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Bowman, R. E., Maclusky, N. J., Diaz, S. E., Zrull, M. C., & Luine, V. N. 2006. Aged rats: Sex differences and responses to chronic stress. *Brain Research*, 1126(1), 156-166.

- Brunskole Hummel, I., Reinartz, M. T., Kälble, S., Burhenne, H., Schwede, F., Buschauer, A., & Seifert, R. 2013. Dissociations in the Effects of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Agonists on cAMP Formation and Superoxide Production in Human Neutrophils: Support for the Concept of Functional Selectivity. *PLoS ONE*, 8(5), e64556.
- Costa, K. 2018. Glucocorticoid susceptibility and in vivo ABCB1 activity differ in murine B cell subsets. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(3), 3081-3097.
- Connor, T. J., Brewer, C., Kelly, J. P., & Harkin, A. 2005. Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. *Journal of Neuroimmunology*, 159(1-2), 119-128.
- Curtin, N. M., Mills, K. H. G., & Connor, T. J. 2009. Psychological stress increases expression of IL-10 and its homolog IL-19 via  $\beta$ -adrenoceptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3), 371-379.
- Deenick, E. K., Hasbold, J., & Hodgkin, P. D. 2005. Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells. *European Journal of Immunology*, 35(10), 2949–2955.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M., & Aparicio Alonso, P. 2008. Roitt. *Inmunología. Fundamentos (11a edición)*. *Inmunología*, 27(4), 212-214.
- Dhabhar F.S., McEwen BS. 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun*. 11:286–306.
- Dhabhar, F. S. 2000. Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Skin Immunity: The Role of Stress Hormones and Leukocyte Trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 876-893.
- Dhabhar, F. S. 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58(2-3), 193-210.

- Divyashree, S., Sarjan, H. N., & Yajurvedi, H. N. 2016. Effects of long-term chronic stress on the lymphoid organs and blood leukocytes of the rat (*Rattus norvegicus*). *Canadian Journal of Zoology*, 94(2), 137-143.
- Dragos, D, Tănăsescu, M. 2010. The effect of stress on the defense systems. *Journal of Medicine and Life*, 3(1):10-18.
- Duarte, J. H. 2016. Functional switching. *Nature Immunology*, 17(S1), S12.
- Edgar, V. A., Silberman, D. M. i. ´., Cremaschi, G. A., Zieher, L. M., & Genaro, A. M. 2003. Altered lymphocyte catecholamine reactivity in mice subjected to chronic mild stress. *Biochemical Pharmacology*, 65(1), 15-23.
- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. 1999. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 10(9), 359-368.
- Fink, G. 2017. Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology. Maarssen, Países Bajos: Elsevier Gezondheidszorg.
- Foertsch, S., Langgartner, D., & Reber, S. O. 2020. Abdominal surgery prior to chronic psychosocial stress promotes spleen cell (re)activity and glucocorticoid resistance. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8.
- Garvy B., Telford L., Fraker P. & Morford. 1993. Chronic elevation of plasma corticosterone causes reductions in the number of cycling cells of the B lineage in murine bone marrow and induce apoptosis. *Immunology*, 80(4),587-592.
- Grailer, J. J., Haggadone, M. D., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., & Ward, P. A. 2014. Induction of M2 Regulatory Macrophages through the b2-Adrenergic Receptor with Protection during Endotoxemia and Acute Lung Injury. *Journal of Innate Immunity*, 6(5), 607-61.
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. 2009. Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 215-224.
- Grover, R. K., Cheng, J., Peng, Y., Jones, T. M., Ruiz, D. I., Ulevitch, R. J., Lerner, R. A. 2012. The costimulatory immunogen LPS induces the B-Cell clones that

- infiltrate transplanted human kidneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6036-6041.
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. 2001. B Cell Development Pathways. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 595-621.
- Harlé, G., Kaminski, S., Dubayle, D., Fripiat, J.-P., & Ropars, A. 2018. Murine splenic B cells express corticotropin-releasing hormone receptor 2 that affect their viability during a stress response. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Harpaz, I., Abutbul, S., Nemirovsky, A., Gal, R., Cohen, H., & Monsonogo, A. 2013. Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: Glucocorticoids as a double-edged sword. *European Journal of Immunology*, 43(3), 758-769.
- Hervé, J., Dubreil, L., Tardif, V., Terme, M., Pogu, S., Anegon, I., *et al.* 2013.  $\beta$ -Adrenoreceptor Agonist Inhibits Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3163-3171.
- Hu, D., Wan, L., Chen, M., Caudle, Y., LeSage, G., Li, Q., & Yin, D. 2014. Essential role of IL-10/STAT3 in chronic stress-induced immune suppression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 36, 118-127.
- Hummelshoj, L., Ryder, L. P., & Poulsen, L. K. 2006. The Role of the interleukin-10 Subfamily Members in Immunoglobulin Production by Human B Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(1), 40-47.
- Izeboud, C. A., Mocking, J. A. J., Monshouwer, M. 1999. Participation of  $\beta$ -Adrenergic Receptors on Macrophages in Modulation of LPS-Induced Cytokine Release. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 19(1-4), 191-202.
- Jarillo-Luna, A., Rivera-Aguilar, V., Garfias, H. R., Lara-Padilla, E., Kormanovsky, A., & Campos-Rodríguez, R. 2007. Effect of repeated restraint stress on the levels of intestinal IgA in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 32(6), 681-692.
- Jeong, J. Y., Lee, D. H., & Kang, S. S. 2013. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinology and Metabolism*, 28(4), 288.

- Kim, J.-G., Jung, H.-S., Kim, K.-J., Min, S.-S., & Yoon, B.-J. 2013. Basal blood corticosterone level is correlated with susceptibility to chronic restraint stress in mice. *Neuroscience Letters*, 555, 137-142.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Martínez, R. P. 2007. *Inmunología de Kuby*. New York, Estados Unidos: McGraw-Hill Education.
- Laukova, M., Vargovic, P., Vlcek, M., Lejavova, K., Hudecova, S., Krizanova, O., & Kvetnansky, R. 2013. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. *Immunobiology*, 218(5), 780-789.
- Laukova, M., Vargovic, P., Rokytova, I., Manz, G., & Kvetnansky, R. 2017. Repeated Stress Exaggerates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in the Rat Spleen. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(1), 195-208.
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570-1580.
- Liao, S., & von der Weid, P. Y. 2015. Lymphatic system: An active pathway for immune protection. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38, 83-89.
- Lill-Elghanian, D., Schwartz, K., King, L., & Fraker, P. 2002. Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Early B Cells from Human Bone Marrow. *Experimental Biology and Medicine*, 227(9), 763-770.
- Lu, M., & Munford, R. 2016. LPS stimulates IgM production in vivo without help from non-B cells. *Innate Immunity*, 22(5), 307-315.
- Maydych, V., Claus, M., Dychus, N., Ebel, M., Damaschke, J., Diestel, S., Watzl, C. 2017. Impact of chronic and acute academic stress on lymphocyte subsets and monocyte function. *PLOS ONE*, 12(11), e0188108.
- McGregor, B. A., Murphy, K. M., Albano, D. L., & Ceballos, R. M. 2016. Stress, cortisol, and B lymphocytes: a novel approach to understanding academic stress and immune function. *Stress*, 19(2), 185-191.
- Merlot, E., Moze, E., Dantzer, R., & Neveu, P. J. 2004. Cytokine Production by Spleen Cells after Social Defeat in Mice: Activation of T Cells and Reduced Inhibition by Glucocorticoids. *Stress*, 7(1), 55-61.

- Moazzam S, Hussain MM, Saleem S. 2013. Effect of ascorbic acid and alpha tocopherol on immune status of male Sprague Dawley rats exposed to chronic restraint stress. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 24(3-4):31-5.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. 2000. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell*, 102(5), 553-563.
- Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. 2013. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971.
- Nijhuis, L. E., Olivier, B. J., Dhawan, S., Hilbers, F. W., Boon, L., Wolkers, M. C., *et al.* 2014. Adrenergic  $\beta$ 2 Receptor Activation Stimulates Anti-Inflammatory Properties of Dendritic Cells In Vitro. *PLoS ONE*, 9(1), e85086.
- Qiao, G., Chen, M., Bucsek, M. J., Repasky, E. A., & Hylander, B. L. 2018. Adrenergic Signaling: A Targetable Checkpoint Limiting Development of the Antitumor Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-15.
- Quintana, F. J., Solomon, A., Cohen, I. R., & Nussbaum, G. 2008. Induction of IgG3 to LPS via Toll-Like Receptor 4 Co-Stimulation. *PLoS ONE*, 3(10), e3509.
- Schultz, C. L., & Coffman, R. L. 1991. Control of isotype switching by T cells and cytokines. *Current Opinion in Immunology*, 3(3), 350–354.
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41-S52.
- Schweighoffer, E., Nys, J., Vanes, L., Smithers, N., & Tybulewicz, V. L. J. 2017. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1269-1280.
- Shaashua, L., Sominsky, L., Levi, B., Sorski, L., Reznick, M., Page, G. G., & Ben-Eliyahu, S. 2012. In vivo suppression of plasma IL-12 levels by acute and chronic stress paradigms: Potential mediating mechanisms and sex differences. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(6), 996-1005.

- Shi, H., & Clegg, D. J. 2009. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & Behavior*, 97(2), 199-204.
- Silberman, D. 2003. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *Journal of Neuroimmunology*, 144(1-2), 53–60.
- Sloan, E. K., *et al.* 2010. The Sympathetic Nervous System Induces a Metastatic Switch in Primary Breast Cancer. *Cancer Research*, 70(18), 7042-7052.
- Shoji, H., & Miyakawa, T. 2019. Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacology Reports*, 40(1), 73-84.
- Stankiewicz, A. M., Goscik, J., Swiergiel, A. H., Majewska, A., Wiczorek, M., Juszcak, G. R., & Lisowski, P. I. 2014. Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex. *BMC Neuroscience*, 15(1), 1-39.
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. 2008. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annual Review of Immunology*, 26(1), 261–292.
- Stavnezer, J., & Schrader, C. E. 2014. IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *The Journal of Immunology*, 193(11), 5370–5378.
- Szelényi, J., & Vizi, E. S. 2007. The Catecholamine Cytokine Balance: Interaction between the Brain and the Immune System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113(1), 311–324.
- Takenaka, M. C., Araujo, L. P., Maricato, J. T., Nascimento, V. M., Guerreschi, M. G., Rezende, R. M., *et al.* 2015. Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor–Mediated Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 196(2), 637-644.
- Tarr, A. J., Powell, N. D., Reader, B. F., Bhave, N. S., Roloson, A. L., Carson, W. E., 3rd, & Sheridan, J. F. 2012.  $\beta$ -Adrenergic receptor mediated increases in activation and function of natural killer cells following repeated social disruption. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(8), 1226-1238.

- Tangye, S. G., Ferguson, A., Avery, D. T., Ma, C. S., & Hodgkin, P. D. 2002. Isotype Switching by Human B Cells Is Division-Associated and Regulated by Cytokines. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4298-4306.
- Tian, R., Hou, G., Li, D., & Yuan, T.-F. 2014. A Possible Change Process of Inflammatory Cytokines in the Prolonged Chronic Stress and Its Ultimate Implications for Health. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-8.
- Tournier, J.-N., Mathieu, J., Mailfert, Y., Multon, E., Drouet, C., Jouan, A., & Drouet, E. 2001. Chronic restraint stress induces severe disruption of the T-cell specific response to tetanus toxin vaccine. *Immunology*, 102(1), 87–93.
- Voorhees, J. L., Tarr, A. J., Wohleb, E. S., Godbout, J. P., Mo, X., Sheridan, J. F., Marsh, C. B. 2013. Prolonged Restraint Stress Increases IL-6 Reduces IL-10 and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10. *PLoS ONE*, 8(3), e58488.
- Wu, H., Chen, J., Song, S., Yuan, P., Liu, L., Zhang, Y. & Wei, W. 2016.  $\beta$ 2-adrenoceptor signaling reduction in dendritic cells is involved in the inflammatory response in adjuvant-induced arthritic rats. *Scientific Reports*, 6(1).
- Xu, H., Liew, L. N., Kuo, I. C., Huang, C. H., Goh, D. L.-M., & Chua, K. Y. 2008. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology*, 125(2), 218-228