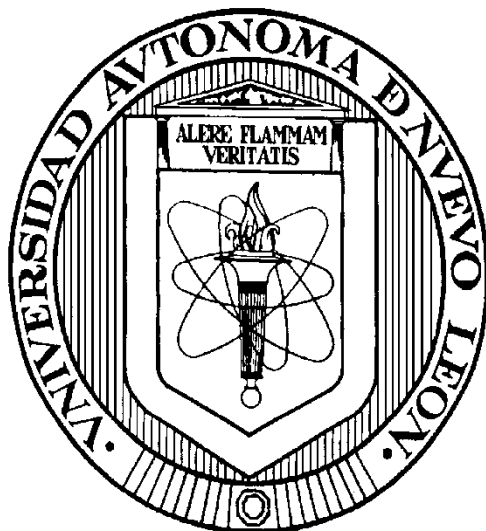


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

***ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ESTRÉS Y CITOCINAS EN  
PACIENTES INFECTADOS CON EL VIRUS DE INFLUENZA B***

**POR**

**CARLOS AUGUSTO LÓPEZ ACEVO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**AGOSTO 2021**

# **CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÉS Y CITOCINAS EN PACIENTES INFECTADOS CON EL VIRUS DE INFLUENZA B**

**Aprobación de la Tesis:**

---

**Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco**  
Director

---

**Dr. C. Mario César Salinas Carmona**  
Miembro

---

**Dr. Med. Luis Adrián Rendón Pérez**  
Miembro

---

**Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Miembro

---

**Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo**  
Miembro

---

**Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mis padres por que sin ellos nada de esto hubiera sido posible, su dedicación y entrega al trabajo y el siempre motivarme a con su ejemplo para siempre buscar la superación. A mi familia que siempre me ha apoyado en todos mis proyectos y que ha sido parte de este, donde se ha sacrificado tiempo de convivencia, por lo que agradezco infinitamente su comprensión y por estar a mi lado.

A las autoridades de esta prestigiada institución que facilitaron el poder terminar proyecto.

Al Dr. Adrián Rosas, a quien agradezco su paciencia, apoyo, tiempo, y sobre todo su disponibilidad y guía en estos años de desarrollo del proyecto.

A todos los profesores integrantes del comité de Tesis Doctoral, Dr. C. Mario César Salinas Carmona, Dr. Med. Luis Adrián Rendón Pérez, Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado, Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo que siempre estuvieron dando su apoyo y tiempo para la culminación de este trabajo.

A los que en su momento fueron mis pasantes, Dra Leslie Michelle Ruiz Cazares y Dra. Dania Dalel Pardinaz García, así mismo a Q.C.B Azalia Magdalena Martínez Castilla y a Q.C.B Erick Arrendondo-Loza que su colaboración fue esencial para esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo I                     | Página |
|--------------------------------|--------|
| 1. RESUMEN.....                | 1      |
| Capítulo II                    |        |
| 2. INTRODUCCIÓN.....           | 2      |
| 2.1 Antecedentes.....          | 5      |
| 2.2 Importancia.....           | 7      |
| 2.3 Originalidad.....          | 8      |
| 2.4 Justificación.....         | 9      |
| Capítulo III                   |        |
| 3. HIPÓTESIS.....              | 10     |
| Capítulo IV                    |        |
| 4. OBJETIVOS.....              | 11     |
| 4.1 Objetivo general.....      | 11     |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 11     |
| Capítulo V                     |        |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS.....     | 12     |
| 5.1 Población de estudio.....  | 12     |
| 5.2 Recursos biológicos.....   | 13     |
| 5.3 Recursos materiales.....   | 14     |
| 5.4 Recursos financieros.....  | 16     |

|   |    |
|---|----|
| 5.5 Recursos metodológicos.....                     | 17 |
| 5.5.1 Diseño experimental.....                      | 17 |
| 5.5.2 Selección de pacientes.....                   | 18 |
| 5.6 Enrolamiento.....                               | 19 |
| 5.6.1 Criterios de inclusión.....                   | 19 |
| 5.6.2 Criterios de exclusión.....                   | 19 |
| 5.6.3 Criterios de eliminación.....                 | 20 |
| 5.7 Procedimientos durante el estudio.....          | 21 |
| 5.7.1 Preparación de la muestra.....                | 21 |
| 5.7.2 Confirmación de virus y carga viral.....      | 22 |
| 5.7.3 Cuantificación de citocinas y cortisol.....   | 23 |
| 5.7.4 Recuento diferencial de leucocitos.....       | 23 |
| 5.7.5 Estrés percibido.....                         | 24 |
| 5.7.6 Percepción de la gravedad de los síntomas.... | 25 |
| 5.7.7 Protocolo de laboratorio.....                 | 26 |
| 5.7.8 Análisis de datos.....                        | 27 |
| Capítulo VI   |    |
| 6. RESULTADOS.....                                  | 28 |
| Capítulo VII  |    |
| 7. DISCUSIÓN.....                                   | 40 |
| Capítulo VIII                                       |    |
| 8. CONCLUSIÓN.....                                  | 44 |

Capitulo IX

9. ANEXOS.....45

9.1 Cuestionario.....45

Capítulo X

10. BIBLIOGRAFÍA.....47

Capítulo XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....50

## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla  | Página |
|--|--------|
| 1. Tabla 1. Niveles de citocina en plasma de controles y pacientes infectados con VIB.....   | 30     |
| 2. Tabla 2. Resultados de la regresión linear simple para determinar la relación entre los niveles de cortisol y otras variables en pacientes infectados con VIB. .... | 34     |
| 3. Tabla 3. Resultados de la regresión linear simple para determinar la relación entre la carga viral y otras variables en pacientes infectados con VIB.....           | 36     |
| 4. Tabla 4. Resultados de la regresión linear simple para determinar la relación entre el estrés percibido y otras variables en pacientes infectados con VIB. ....     | 39     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>Figura</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 1. Figura 1. Niveles de cortisol en el plasma de los controles y de los pacientes infectados por el VIB.....                             | 32            |
| 2. Figura 2. Los niveles de CCL20 se correlacionan positivamente con los niveles de cortisol en los pacientes infectados por el VIB..... | 33            |
| 3. Figura 3. El recuento de leucocitos en pacientes infectados por el VIB se correlacionó negativamente con la carga viral.....          | 37            |



## LISTA DE ABREVIATURAS

**%: Por ciento**  
**°C: Grados Celsius**  
**μL: Microlitros**  
**μm: micrómetros**  
**ADN: Ácido desoxirribonucleico**  
**ARN: Ácido ribonucleico**  
**ATP: Adenosin Trifosfato**  
**CDC: Centro de Control de Enfermedades (Center for Diseases Control)**  
**cDC: Células dendríticas convencionales (conventional dendritic cells)**  
**COVID-19: Enfermedad por coronavirus 2019**  
**ELISA: Enzimoimmunoanálisis**  
**HA: Hemaglutinina**  
**IFN: Interferón**  
**IRAK1: Quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1)**  
**kb: kilobases**  
**LPS: Lipopolisacárido**  
**IL: Interleucina**  
**mL: Mililitros**  
**NA: Neuraminidasa**  
**NK: Asesinas naturales (Natural killer)**  
**NLR: Receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos**  
**PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno (pathogen-associated molecular-pattern)**  
**pb: Pares de bases**  
**PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa**  
**pDC: Células dendríticas plasmacitoides (plasmacytoid dendritic cells)**  
**PSS-10: Escala de estrés percibido de 10 reactivos**  
**pH: Potencial de Hidrógeno**  
**PRR: Receptor de reconocimiento de patrón (pattern recognition receptor)**  
**qRT-PCR: Reacción de cadena de polimerasa cualitativa.**  
**RPM: Revoluciones por minuto**  
**TNF: Factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor)**  
**TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de TNF (TNF receptor-associated factor 6)**  
**VIA: Virus de la influenza A**  
**VIB: Virus de la influenza B**

# CAPÍTULO I

## 1. RESUMEN

El virus de la influenza B (VIB) causa una infección respiratoria aguda. Las citocinas son mediadores importantes para la inmunidad durante las enfermedades infecciosas. El cortisol y el estrés se han relacionado con la susceptibilidad a padecer una enfermedad respiratoria y con la regulación de citocinas. Se sabe poco sobre la relación entre las citocinas sistémicas, el cortisol, la percepción del estrés y el recuento de células sanguíneas en pacientes infectados con VIB. **Objetivo:** Correlacionar los niveles de estrés, cortisol y citocinas en pacientes infectados con el virus de la influenza B. **Material y Métodos:** El diagnóstico de los pacientes con VIB fue realizado con el kit de RVP Luminex xTAG y confirmado por qRT-PCR. La carga viral del VIB fue determinada a través de qRT-PCR y el estrés percibido se evaluó utilizando la escala de estrés percibido (PSS-10). Se determinó el nivel de cortisol y de veinticinco citocinas plasmáticas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP3 $\alpha$ /CCL20, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) por ELISA. El recuento diferencial de leucocitos se midió con un protocolo de laboratorio estándar. **Resultados:** Se incluyeron 33 pacientes infectados con el VIB (nueve hombres y veinticuatro mujeres) con una edad media de 53 años (el percentil 25% era 44,5 y el percentil 75%, 57). Las citocinas Th1, Th17 e IL10 fueron más altas en los pacientes infectados con VIB ( $P < 0,05$ ). Los leucocitos y los neutrófilos están correlacionados negativamente con la carga viral ( $P < 0,05$ ). El estrés percibido tuvo un efecto negativo en los monocitos y las citocinas sistémicas en los pacientes infectados por el VIB ( $P < 0,05$ ). El nivel de cortisol fue mayor en los pacientes infectados con VIB y se correlacionó positivamente con el CCL20 ( $P < 0,05$ ); además mostró un efecto positivo en la mayoría de las citocinas sistémicas ( $P < 0,05$ ). **Conclusiones:** Se encontró un patrón de citocinas en pacientes infectados con VIB, así como un posible rol de la cuenta leucocitaria en el control de la infección. Nuestros resultados sugieren la importancia del cortisol y del estrés percibido en los niveles de citocinas sistémicas en pacientes infectados con VIB, pero son necesarios más estudios para entender su importancia en la producción de citocinas en una infección respiratoria.

## CAPÍTULO II

### 2. INTRODUCCIÓN

El estrés y las enfermedades respiratorias en nuestra sociedad toman una relevancia muy importante en estos momentos de pandemia presentada por el COVID-19. Actualmente se conoce que existe una relación entre el estrés y la forma como se comporta el sistema inmune, pero aún no se conoce del todo qué partes específicas se encuentran involucradas en este proceso (citocinas, células blancas, cortisol). Las infecciones de vías respiratorias superiores suelen asociarse a virus como el rinovirus, el coronavirus o el virus de la gripe.

La aparición de nuevos tipos de gripe, como el "síndrome de distrés respiratorio agudo severo", la gripe aviar AH5N1 y la última gripe pH1N1, y más reciente el COVID-19 ha hecho que se ponga más atención sobre estos virus, como una amenaza para la salud pública. De la población expuesta, sólo un porcentaje desarrollará la enfermedad clínica, lo cual sugiere que al menos una parte de esta variabilidad, en algunos casos, pudiera estar afectada por estrés psicológico. Esto se ve respaldado por la evidencia de que el estrés psicológico está asociado a cambios en parámetros inmunológicos relevantes; a nivel local se cree que éste influye a través de la inervación autónoma de los tejidos linfoides, así como a nivel sistémico, a través de los procesos mediados por hormonas sobre los leucocitos [1].

El estrés laboral se asocia con varios factores que suelen reflejarse en una

afectación del sistema inmune. Es necesario un esfuerzo continuo para establecer relaciones causa efecto entre el estrés y la inmunidad [2]. El estrés crónico es bien conocido que reduce la capacidad del sistema inmunitario para responder a las señales hormonales que desactivan la producción de citocinas proinflamatorias y sus respuestas demasiado intensas pueden dar lugar a una mayor respuesta sintomática. Diversos estudios de evaluación han respaldado la validez de las escalas de autoinforme de las infecciones respiratorias agudas. Por ejemplo, se ha demostrado que los síntomas autoinformados que alcanzan los criterios de un resfriado clínico se correlacionan con el uso de los servicios médicos [3,4].

Desde hace siglos se conoce que las experiencias vitales estresantes y el estado psicológico del individuo influyen en la manifestación y el curso de las enfermedades. En la década de 1960 se realizaron estudios para descubrir los vínculos entre el estrés psicológico y el sistema inmunitario.

La importancia del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (eje HPA) se puso de manifiesto muy pronto tras el descubrimiento de la función antiinflamatoria del cortisol (y, posteriormente, de los andrógenos suprarrenales). Lo anterior fue respaldado por investigaciones donde demostraban que los errores del eje HPA pueden incluso inducir enfermedades inflamatorias crónicas en modelos animales. Una segunda vía fue descubierta y estaba íntimamente relacionada con el sistema nervioso simpático (SNS), con las dos ramas del sistema medular suprarrenal (adrenalina) y las fibras nerviosas simpáticas (noradrenalina), que

llegan a casi todos los lugares del cuerpo y se pudieron observar los efectos simpáticos, anti y proinflamatorios [5].

Durante las décadas de 1980 y 1990, se descubren las funciones de más hormonas de estrés no suprarrenales, como las hormonas de la glándula tiroides, la hormona del crecimiento, las hormonas del sistema renina-angiotensina-aldosterona, y otras más que se han añadido al concepto de inmunomodulación inducida por el estrés. Por último, se ha observado que el sistema nervioso parasimpático (SNP), con su principal neurotransmisor, la acetilcolina, desempeña un papel antiinflamatorio e inmunosupresor, a través de los receptores nicotínicos de subunidad alfa 7; mientras que el estrés psicológico se inicia principalmente en el cerebro para influir en estas cuatro vías hormonales y neuronales principales y, por tanto, en el sistema inmunitario, éste puede influir en el cerebro y en los cuatro operadores posteriores [5].

## 2.1 Antecedentes

El virus de la influenza B (VIB) pertenece a la familia Orthomyxoviridae. Es un virus ARN envuelto y uno de los agentes etiológicos de la infección respiratoria aguda que tiende a ser pasado por alto debido a la prominencia del virus de la gripe A (VIA). También es responsable de cerca del 25% de los casos de gripe documentados en el laboratorio[6,7].

Las primeras etapas de la respuesta inmunológica comienzan con el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tales como los de tipo-Toll (TLR), RIG-I (RLR) y los de dominio de oligomerización de nucleótidos (NLR). Se producen interferones de tipos I y III (IFNs), citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$  o las quimiocinas CCL20, CXCL10 o CCL5, esto genera una respuesta inmune ampliamente efectiva la cual conduce a la resolución de la infección [8–11]. Estas citocinas regulan positivamente de manera autócrina y parácrina a las células circundantes con la consecutiva producción de otras interleucinas. La sintomatología de la infección respiratoria aguda se ha asociado con la respuesta inmune, la cual si no está regulada se produce una tormenta de citocinas responsable de la forma grave de la enfermedad [12,13]

Durante más de 30 años de estudios se ha identificado la íntima relación entre el estrés, la respuesta inmunológica y el desarrollo de enfermedades. En otros estudios se ha demostrado que el estrés está relacionado con la susceptibilidad al resfriado común, así como con una mayor gravedad de los síntomas [14]. La mayoría de las investigaciones se han centrado en la infección por el VIA; sin embargo, no se conoce bien el rol del estrés percibido, la producción del cortisol, y el recuento de leucocitos sobre los niveles de citocinas en pacientes infectados con el VIB.

## **2.2 Importancia**

Todo lo mencionado previamente evidencia que el entendimiento de como interactúan el sistema inmune y el sistema nervioso, sobre todo en los procesos que tienen que ver con la salud mental, aún no están muy claros y mucho menos en infecciones como en el caso de aquellas ocasionadas por el virus de influenza B. El conocer qué tan vulnerable puede ser una persona que se encuentra en una situación crónica de estrés es primordial ya que el cambio de estilo de vida, el fallecimiento de personas cercanas y el mismo padecimiento son motivos comunes de estrés y ansiedad.



### **2.3 Originalidad**

El presente estudio evaluó el nivel de estrés encontrado en pacientes con enfermedad respiratoria aguda ocasionada por el virus de influenza B y su correlación con la percepción de la intensidad de los síntomas, la cuenta diferencial de leucocitos y los niveles de 25 citocinas.

## **2.4 Justificación**

Las implicaciones que tiene el estrés en el sistema inmune aún no están del todo claras. Los estudios previos han sido limitados a correlacionarlo con algunas citocinas inflamatorias en infecciones respiratorias agudas y mucho menos en infecciones ocasionadas por el virus de influenza B, por lo que es necesario conocer cómo los niveles de estrés y citocinas afectan el curso natural de la enfermedad en infecciones ocasionadas por este virus.

## **CAPÍTULO III**

### **3. HIPÓTESIS**

A mayor estrés existe una mayor percepción de la intensidad de los síntomas, y esto se relaciona con un patrón de citocinas y la cuenta leucocitaria diferencial en pacientes con enfermedad respiratoria aguda ocasionada por el virus de influenza B.

## **CAPÍTULO IV**

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar la correlación de los niveles de estrés, cortisol y citocinas en pacientes infectados con el virus de influenza B.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Realizar la cuenta leucocitaria diferencial en pacientes infectados con el virus de influenza B.
2. Determinar la percepción del estrés en pacientes infectados con el virus de influenza B.
3. Cuantificar los niveles de cortisol y correlacionarlos con la percepción del estrés en pacientes infectados con el virus de influenza B.
4. Cuantificar los niveles de citocinas en pacientes infectados con el virus de influenza B.
5. Correlacionar los niveles de citocinas y cortisol con el estrés percibido en pacientes infectados con el virus de influenza B.

## **CAPÍTULO V**

### **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **5.1 Población de estudio**

Se incluyeron pacientes que acudieron a la consulta externa y/o urgencias del Hospital Universitario “Doctor José Eleuterio González” así como Servicios médicos de la UANL, de noviembre 2014 a febrero 2015 con un cuadro de infección respiratoria aguda. Se descartaron los pacientes con sospecha de infección bacteriana.

## **5.2 Recursos biológicos**

1. xTAG Respiratory Viral Panel Fast (Luminex Corporation)
2. QIAmp MinElute Virus Spin kit
3. Primer Design Advanced kit (Premier Biosoft, Palo Alto, CA)
4. Milliplex®MAP cytokine multiplex assay kit
5. Muestra de sangre venosa periférica.
6. Muestras de exudado faríngeo para obtención de ARN viral
7. Kit ELISA (Abcam) para cortisol

### 5.3 Recursos materiales

#### a) Lugar de Trabajo:

- 1) Servicio de Inmunología: Laboratorio de Inmunología Molecular.
- 2) Consulta de servicios médicos, consulta externa y/o urgencias del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL.

#### b) Equipos:

1. Campana de Flujo laminar (ThermoScientific 1300 Series A2)
2. Incubadora de 37 grados Celsius (Precisión)
3. Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)
4. Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).
5. Lector de microplacas (Biorad)
6. Micropipetas (BioPette, Labnet)
7. Ultracongelador -80 grados Celsius (Sanyo)
8. Centrifuga refrigerada (Eppendorff)
9. Vortex (Thermoline)
10. Balanza analítica (Scientific)
11. Computadora HP con Office XP 2000
12. Software GraphPrism (análisis Estadísticos)

#### c) Consumibles:

1. Puntillas para micropipetas de 10, 20, 200 y 1000 microlitros (Eppendorff)

2. Caja para crioviales (Corning)
3. Crioviales de 1.5 ml (Corning)
4. Tubos eppendorff 1.5 ml (Eppendorf)
5. Tubos con EDTA
6. Tubo PAXgene Blood ARN



#### **5.4 Recursos financieros**

Se recibió apoyo por parte del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, CONACYT SALUD 2013-01-281871.

## **5.5 Recursos metodológicos**

### **5.5.1 Diseño experimental**

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo y observacional. El tamaño de la muestra fue por conveniencia. La significación estadística de los datos se evaluó con Mann Whitney, Spearman r para correlación, y análisis de regresión lineal usando SPSS y GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., EE. UU.). un valor  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Los criterios de inclusión exigían que los participantes tuvieran al menos dieciocho años y estar diagnosticado con VIB por el sistema de detección de virus respiratorios xTAG Panel Fast (Luminex Corporation). Este estudio se realizó con la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, número de registro IN13-007. Después de obtener el consentimiento informado de los pacientes inscritos, los hisopados de garganta y muestras de sangre se recogieron el día de la inscripción. El tamaño de muestra obtenido fue de 33 sujetos con VIB y 8 sujetos clínicamente sanos como grupo control.

### 5.5.1 Selección de pacientes

La muestra fue compuesta de 63 sujetos hispanos de nacionalidad mexicana (100%) con una media de edad de 44.15 (SD = 15.936, rango 19-75) donde un 67% fueron mujeres y un 33% hombres. Estos pacientes acudieron a la consulta externa y/o urgencias del Hospital Universitario "Doctor José Eleuterio González" así como Servicios médicos de la UANL, de noviembre 2014 a febrero 2015. Se descartaron los pacientes con sospecha de infección bacteriana. Se incluyeron mayores de 18 años no importando género y con un diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda y sin evidencia clínica de infección bacteriana. Así mismo se excluyeron pacientes con diagnóstico previo de inmunosupresión, tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa, con cualquier neoplasia y/o que estuviera recibiendo quimioterapia, con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH, uso de esteroides de manera crónica, mujeres embarazadas, pacientes con internamiento por más de 48 horas en los tres meses previos por cualquier causa y personas que no firmaron el consentimiento informado. Así mismo se eliminaron aquellos pacientes a los cuales se les extrajo baja cantidad y mala calidad de muestra, que no fue posible obtenerla, o que hubo información incompleta del expediente.

Para la evaluación clínica a todos los voluntarios se les realizó una entrevista para confirmar síntomas de enfermedad respiratoria aguda y se descartaron los pacientes con sospecha de infección bacteriana, después de eso se les invitó a participar en el estudio una vez firmada la carta de consentimiento.

## **5.6 Enrolamiento**

### **5.6.1 Criterios de inclusión**

1. Pacientes mayores de 18 años no importando género.
2. Diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda. Sin evidencia de infección bacteriana.

### **5.6.2 Criterios de Exclusión**

1. Pacientes con diagnóstico previo de inmunosupresión
2. Internamiento en los tres meses previos por más de 48 horas por cualquier causa.
3. Tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa.
4. Paciente con cualquier neoplasia y/o que esté recibiendo quimioterapia.
5. Paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH.
6. Uso de esteroides de manera crónica.
7. Mujeres embarazadas.
8. Personas que no firmen el consentimiento informado.

### **5.6.3 Criterios de Eliminación**

1. No poder extraerse la muestra
2. Baja cantidad de muestra.
3. Mala calidad de la muestra.
4. Información incompleta del expediente

## **5.7 Procedimientos durante el estudio**

Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos los cuales son descritos a mayor detalle en los siguientes apartados: recolección de muestras por medio de hisopados de garganta, toma de muestras de sangre, extracciones de ácido nucleico, determinación de 25 citocinas en plasma, recuento diferencial de leucocitos, cuantificación del cortisol en sangre y la aplicación de la Escala de Estrés Percibido (PSS-10).

### **5.7.1 Preparación de la muestra**

Brevemente, hisopados de garganta se recogieron y almacenaron en el Sistema de Transporte Universal de Virus (Becton Dickinson, Maryland EE. UU.). Las muestras de sangre fueron recogidas en un PAXgene, tubo de ARN de sangre y un tubo de plástico con EDTA, que fueron centrifugados para obtener plasma y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, hasta su uso. Las obtenciones de las muestras sanguíneas se realizaron siguiendo la técnica de flebotomía estándar, se emplearon tubos con vacío interno y EDTA. Una vez colectada la muestra de sangre, una alícuota de 1.5 mL se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 mL el cual se centrifugó a  $1000 \times g$  durante 10 minutos, esto para separar el paquete globular del plasma. Posteriormente con ayuda de una pipeta automática y puntillas se recuperó el plasma teniendo cuidado de no contaminarlo con los componentes restantes, que se colocaron en un criotubo y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **5.7.2 Confirmación de virus y carga viral**

Las extracciones de ácido nucleico se realizaron con hisopos de garganta usando el QIAmp MinElute Virus Spin kit de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para confirmar la detección del agente etiológico, el protocolo basado en la sonda qRT-PCR del CDC para la detección de IBV se realizó como se ha descrito anteriormente [15].

La carga viral fue determinada usando el Primer Design™ 91 Kit avanzado (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) según el protocolo del fabricante.

### **5.7.3 Cuantificación de citocinas y cortisol**

La determinación de 25 citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP3 $\alpha$ /CCL20, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) se realizó utilizando el Milliplex®MAP kit de ensayo de citocinas múltiples según las instrucciones del fabricante.

La determinación se realizó usando plasma. Los resultados fueron leídos en un Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hércules, CA). Los niveles de cortisol en plasma de los sujetos incluidos en el estudio fueron medidos usando un ELISA competitivo (Abcam) según las recomendaciones del fabricante.

### **5.7.4 Recuento diferencial de leucocitos**

El recuento diferencial de leucocitos se realizó usando sangre total con EDTA. Esto fue hecho con el Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japón).



### 5.7.5 Estrés percibido

Se evaluaron tres niveles de estrés utilizando la versión mexicana en español de la Escala de Estrés Percibido (PSS-10)[16,17] que se aplica a sí misma, tiene 10 elementos, y es una de las escalas más utilizadas para medir el estrés subjetivo. Esta escala muestra una adecuada consistencia interna y un análisis de dos factores (coeficiente alfa de Cronbach = 0.83) [18]. Las preguntas en esta escala son sobre sentimientos, pensamientos y actividades durante el mes pasado, incluyendo el día en que se obtuvo la muestra [16] . El cuestionario fue aplicado sólo el día 1.

Cada elemento se clasifica en una escala de 5 puntos que va desde nunca (0) hasta casi siempre (4) con puntuaciones más altas que indican más estrés percibido. Los puntos redactados positivamente fueron anotados al revés, y las puntuaciones sumaron 117 (por ejemplo, 0 = 4, 1 = 3, 2 = 2, etc., entonces se sumaron los 10 artículos). Los puntos 4, 5, 7 y 8 fueron declarados positivamente.

### **5.7.6 Percepción de la gravedad de los síntomas**

Para determinar la percepción de la gravedad de la infección respiratoria, se hizo un seguimiento a los pacientes cada día durante los primeros 7 días después del reclutamiento, éste se realizó por medio de una encuesta presencial en el día 1 y telefónica hasta el día 7, donde se les solicitó evaluarse con una escala del 0 al 3, donde 3 es lo más grave y 0 la ausencia del síntoma. Esta metodología fue adaptada según lo reporta Cohen y Oshansky [19,20].

### **5.7.7 Protocolo de laboratorio**

Una vez firmada la carta de consentimiento se llevó al participante a las instalaciones del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL en donde se aplicaron ambos cuestionarios y posterior a eso se obtuvo sangre venosa periférica de los pacientes para realizar la determinación de los niveles del cortisol y el recuento diferencial de leucocitos.

La toma de muestra se realizó al día del reclutamiento como ya se indicó y a los 7 días posteriores. Los niveles de cortisol se midieron empleando un kit de ELISA competitivo para su cuantificación en plasma de los sujetos incluidos en el estudio y se siguieron las recomendaciones del fabricante.

### **5.7.8 Análisis de datos.**

Se integró una base de datos computarizada. La significación estadística de los datos se evaluó con Mann Whitney, Spearman  $r$  para correlación, y análisis de regresión lineal usando SPSS y GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., EE.UU.). un valor  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## **CAPÍTULO VI**

### **6. RESULTADOS**

#### **Pacientes y controles**

Como grupo control se incluyeron ocho sujetos clínicamente sanos con una edad media de 32.5 años (el percentil 25% era 19 y el 75%, 54.25), tres de los cuales eran hombres y cinco mujeres. Los sujetos control no informaron de diabetes, tabaquismo o alergia y el recuento sanguíneo fue normal. Los 33 pacientes infectados con el VIB fueron nueve hombres y veinticuatro mujeres, con una edad media de 53 años (el percentil 25% era 44.5 y el 75%, 57).

No se encontraron diferencias en la edad en el grupo control ni en los pacientes infectados con el VIB ( $P=0.0709$ ). De los pacientes incluidos cinco tenían diabetes, dos informaron que fumaban, catorce reportaron alergias, y doce se vacunaron contra la influenza. Siete pacientes tenían mono-infección y 26, coinfecciones (VIA, virus sincitial respiratorio, coronavirus HKU1, rinovirus, virus de la parainfluenza y metapneumovirus humano).

## **Determinación de los niveles de citocinas plasmáticas**

Veinticinco citocinas plasmáticas fueron analizadas por 141 ensayos multiplex en el plasma de los sujetos en estudio y del grupo control. De los resultados obtenidos detectamos tres grupos de citocinas plasmáticas en los pacientes infectados con el virus del VIB. En el primer grupo se observaron los niveles más altos de las citocinas Th17 (IL-17F e IL-17E), Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ), y la inmunorreguladora (IL-10),  $P < 0,05$ . En el segundo grupo se detectaron los niveles más bajos de citocinas como la hematopoyética (GM-CSF), las proinflamatorias (IL-1 $\beta$  e IL-6), la alarmina (IL-33), las Th2 (IL-4 e IL-13) y la antiviral (IL-28A),  $P < 0,05$ . El tercer y último grupo fue el de las citocinas IL-2, IL-5, IL-9, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, CCL20, y TNF- $\alpha$ , en las cuales no se observó una diferencia estadística con el grupo control  $P > 0,05$ , ver Tabla 1.

**Tabla 1. Niveles de citocinas en plasma de controles y pacientes infectados con VIB**

| Citocina           | Control (n=8)*<br>(pg/ml) | VIB<br>(pg/ml)      | P                    |
|--------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|
| IL-17F             | 30.56 (26.73-40.49)       | 80 (35-135.7)       | 0.0064 <sup>†</sup>  |
| GM-CSF             | 1405 (907.2-1599)         | 0 (0-0)             | <0.0001 <sup>†</sup> |
| IFN- $\gamma$      | 80.69(55.79-103.6)        | 152.2 (71.35-232.7) | 0.0335 <sup>†</sup>  |
| IL-10              | 19.71(5.77-26.75)         | 33.98 (15.72-48.76) | 0.0266 <sup>†</sup>  |
| CCL20              | 116.3(85.05-137)          | 131.6 (81.01-181.9) | 0.4526               |
| IL-12p70           | 97.84 (59.42-113.3)       | 81.56 (38.61-131.6) | 0.8595               |
| IL-13              | 316.4 (242.7-346.7)       | 119.4 (61.42-208.6) | 0.0001 <sup>†</sup>  |
| IL-15              | 70.74 (53.62-74.64)       | 43.38 (23.20-65.28) | 0.0610               |
| IL-17 <sup>a</sup> | 64.34 (35.97-77.39)       | 80.54 (37.29-122.0) | 0.3117               |
| IL-22              | 861 (634.7-941.9)         | 760 (0-1093)        | 0.7039               |
| IL-9               | 32.24 (20.93-38.68)       | 57.39 (22.36-95.53) | 0.1106               |
| IL-1 $\beta$       | 66.48 (49.73-76.33)       | 21.03 (8.98-32.36)  | <0.0001 <sup>†</sup> |
| IL-33              | 121.8 (76.98-129.3)       | 58.06 (28.53-99.16) | 0.0121 <sup>†</sup>  |
| IL-2               | 67.19 (41.13-78.66)       | 42.05 (14.35-68.46) | 0.1269               |
| IL-21              | 170.2 (136.9-199.9)       | 162.8 (79.09-257.4) | 0.9415               |
| IL-4               | 530.8 (428.4-644.0)       | 260 (65-485.0)      | 0.0077 <sup>†</sup>  |
| IL-23              | 14058 (10717-15463)       | 9117 (4597-12223)   | 0.0545               |
| IL-5               | 36.99 (34.10-46.39)       | 23.01 (13.46-43.06) | 0.1551               |
| IL-6               | 59.12 (44.41-71.48)       | 40.56 (19.11-53.75) | 0.0263 <sup>†</sup>  |
| IL-17E             | 886.1 (597.4-998.0)       | 1890 (1265-4087)    | 0.0007 <sup>†</sup>  |

\*Los datos están expresados como mediana (25% y 75% percentiles)  $\uparrow$ Diferencia estadística.

La prueba de Mann Whitney fue usada en el análisis estadístico.

### **Determinación de los niveles plasmáticos de cortisol**

El cortisol en plasma fue evaluado por ELISA en los sujetos en estudio y en el grupo control. En los resultados obtenidos se observó que el cortisol fue diez veces mayor en los pacientes infectados con VIB en comparación con los controles ( $P < 0.00001$ ) y que sus niveles se correlacionaron positivamente con los de CCL20 en 180 ng/ml ( $r = 0.4418$ ,  $P = 0.0101$ ), (ver Figuras 1 y 2).



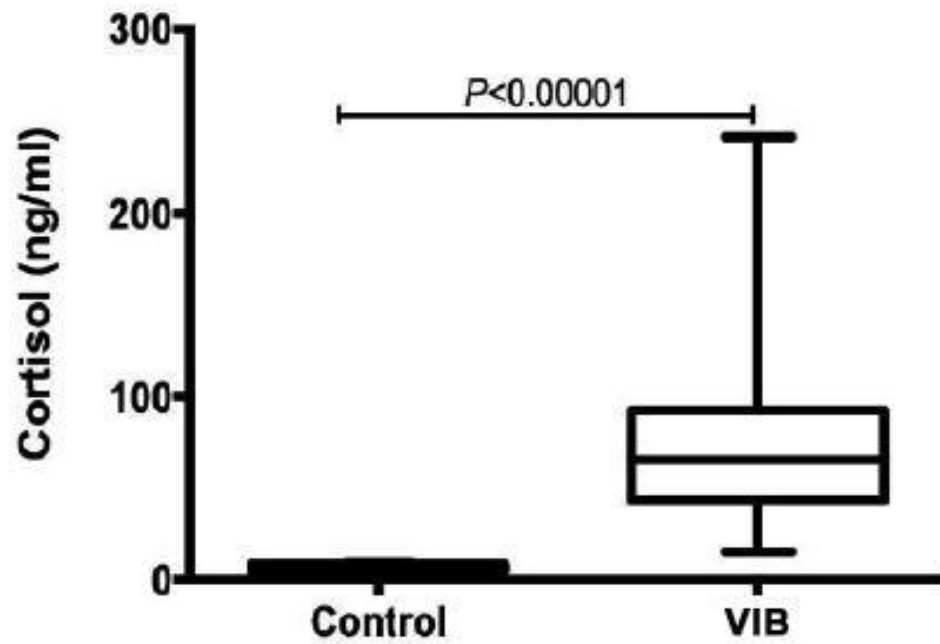
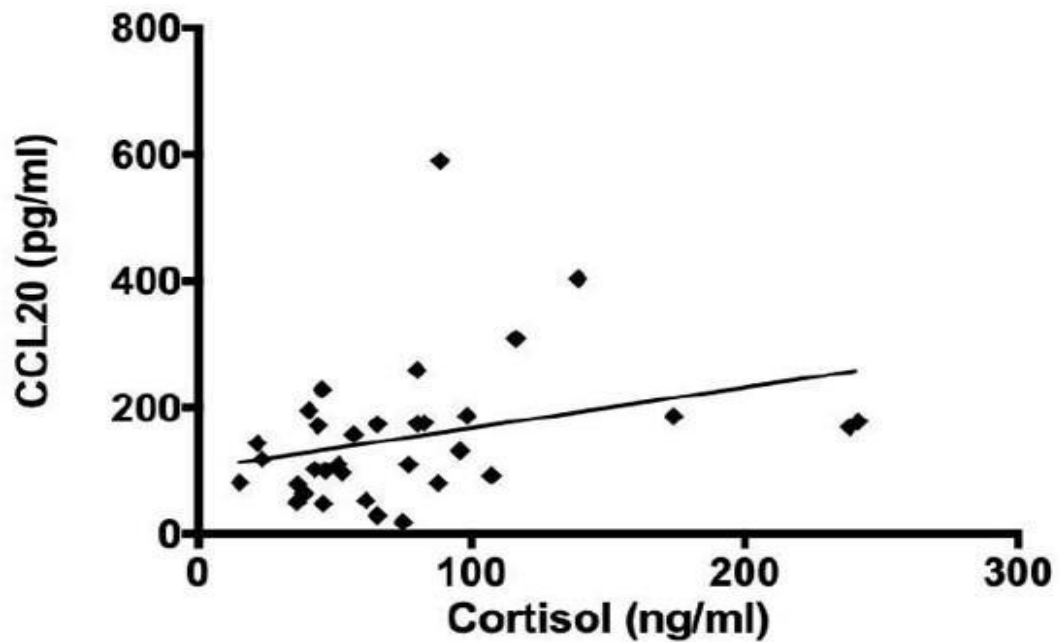


Figura 1. Niveles de cortisol en el plasma de los controles y de los pacientes infectados por el VIB.



**Figura 2. Los niveles de CCL20 se correlacionan positivamente con los niveles de cortisol en los pacientes infectados por el VIB.**

En el análisis de regresión lineal, los niveles de cortisol tuvieron un efecto de relación positiva con las citocinas plasmáticas tales como: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17E, IL-17F, IL-21, IL-23 y IL-28A, ( $P < 0.05$ ); ver Tabla 2.

**Tabla 2. Resultados de la regresión lineal simple para determinar la relación entre los niveles de cortisol y otras variables en pacientes infectados con VIB.**

| <i>Citocinas</i> | <i>Pendiente</i> | <i>Intervalo de Confianza</i> | <i>P</i> |
|------------------|------------------|-------------------------------|----------|
| <i>IL17F</i>     | 0.711            | 0.062 a 1.360                 | 0.032    |
| <i>IL10</i>      | 0.641            | -0.088-1.371                  | 0.015    |
| <i>IL13</i>      | 1.094            | 0.514-1.674                   | 0.0006   |
| <i>IL15</i>      | 0.292            | 0.035-0.549                   | 0.026    |
| <i>IL1B</i>      | 0.195            | 0.009-0.382                   | 0.04     |
| <i>IL2</i>       | 0.36             | 0.042-0.679                   | 0.027    |
| <i>IL21</i>      | 1.065            | 0.067-2.063                   | 0.037    |
| <i>IL4</i>       | 2.298            | 0.610-3.985                   | 0.009    |
| <i>IL23</i>      | 255.4            | 19.16-491.7                   | 0.037    |
| <i>IL5</i>       | 0.248            | 0.072-0.424                   | 0.007    |
| <i>IL6</i>       | 0.281            | 0.117-0.444                   | 0.001    |
| <i>IL17E</i>     | 15.57            | 2.752-28.38                   | 0.018    |
| <i>IL28A</i>     | 11.16            | 1.316-21.00                   | 0.027    |

## **Determinación de la carga viral, leucocitos en sangre y recuento diferencial**

Se determinaron la cuenta de leucocitos en sangre y el recuento diferencial, así como las cargas virales del VIB de cada paciente con resultado positivo. Los valores encontrados oscilaron entre 2.427-5.624 Log<sub>10</sub> copias/uL. También analizamos la correlación entre la carga viral y las citocinas, recuento diferencial de leucocitos, cortisol y estrés percibido. No encontramos una correlación entre la carga viral y las citocinas analizadas, el cortisol o el estrés percibido ( $P>0.05$ ). Se utilizó una regresión lineal para evaluar el efecto de las citocinas, el recuento diferencial de leucocitos, el cortisol y estrés percibido en la carga viral. Encontramos una relación negativa entre la carga viral y el recuento de leucocitos, así como con el recuento absoluto de neutrófilos; véase la tabla 3.

El recuento de leucocitos se correlacionó negativamente con la carga viral ( $r=-0.3946$ ,  $P=0.0231$ ), Figura 3.

**Tabla 3. Resultados de la regresión linear simple para determinar la relación entre la carga viral y otras variables en pacientes infectados con **VIB.****

| <i>Variable</i>    | <i>Pendiente</i> | <i>Intervalo de Confianza</i> | <i>P</i> |
|--------------------|------------------|-------------------------------|----------|
| <i>Leucocitos</i>  | -1.252           | -2.279 - -0.224               | 0.018    |
| <i>Neutrófilos</i> | -0.998           | 0-1.854- -0.144               | 0.023    |

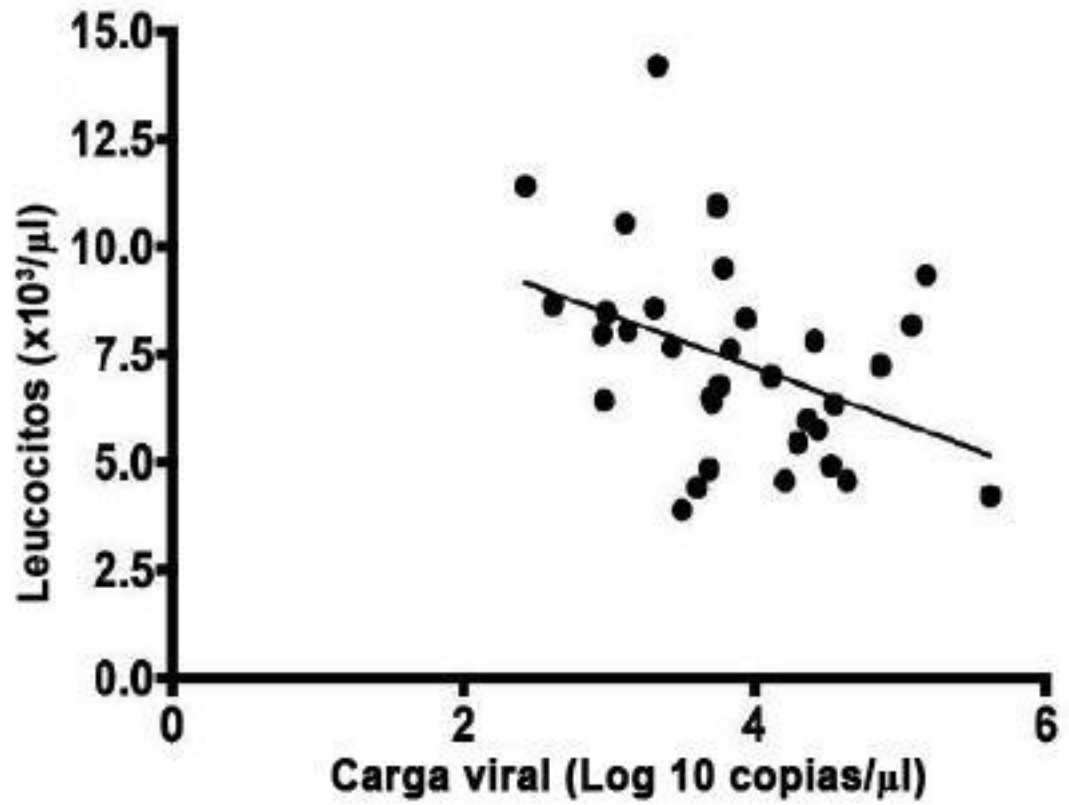


Figura 3. El recuento de leucocitos en pacientes infectados por el VIB se correlacionó negativamente con la carga viral.

## **Determinación del estrés percibido y su correlación con las citocinas, el cortisol y el recuento diferencial de leucocitos.**

El estrés percibido se determinó utilizando una escala previamente validada y reportada en español. También analizamos su correlación con las citocinas y el cortisol en plasma, y con el recuento diferencial de leucocitos. No encontramos una correlación entre el estrés percibido, el cortisol, las citocinas analizadas, y el recuento de leucocitos ( $P>0.05$ ). Sin embargo, el estrés percibido tuvo un efecto de relación negativa sobre el porcentaje de monocitos en la sangre y los niveles de citocinas en el plasma (como IL-1 $\beta$ , IL-5 y IL-6, IL-10, IL-15,) ( $P<0.05$ ); ver Tabla 4.

**Tabla 4. Resultados de la regresión lineal simple para determinar la relación entre el estrés percibido y otras variables en pacientes infectados con VIB.**

| <i>Variable</i>    | <i>Pendiente</i> | <i>Intervalo de Confianza</i> | <i>P</i> |
|--------------------|------------------|-------------------------------|----------|
| <i>IL10</i>        | -1.1775          | -3.535 a -0.014               | 0.048    |
| <i>IL15</i>        | -3.626           | -6.621 a .0.630               | 0.019    |
| <i>IL1B</i>        | -2.304           | -4.520 a -0.087               | 0.042    |
| <i>IL5</i>         | -2.309           | -4.477 a -0.140               | 0.037    |
| <i>IL6</i>         | -2.359           | -4.485 a -0.233               | 0.03     |
| <i>% Monocitos</i> | -0.005           | -0.320 a -0.031               | 0.018    |



## CAPITULO VII

### 7. DISCUSIÓN

En este estudio, examinamos la respuesta inmune sistémica contra el VIB con o sin coinfecciones por otro virus respiratorio, casi todas las investigaciones se centran sólo en la detección del agente etiológico, a pesar de los informes de coinfección de virus respiratorios comunes [21]. Un informe anterior demostró que la infección de VIB se desarrolla con menos sintomatología grave en comparación con la VIA; sin embargo, actualmente se observan casos graves causados por ambos virus [22], por lo que el estudio de la respuesta inmunológica contra un patógeno emergente como el VIB se ha vuelto importante.

Los pacientes infectados con VIB mostraron una cuenta específica de citocinas Th1 y Th17 en la etapa temprana de la infección, con el acompañamiento de IL-10. Se describió que la IL-23 promueve el desarrollo de células T CD4+, productoras de IL-17 y también aumenta la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  de manera autócrina y parácrina [23]. Las citocinas Th17 juegan un papel importante en la resolución de la infección por el virus VIA [24]. Nuestro grupo y otros han reportado resultados similares anteriormente en el suero de pacientes con enfermedad VIA severa[25][26]. El incremento de estas citocinas inflamatorias puede contribuir a la inmunopatogénesis en la infección de virus respiratorios. Se ha informado que la terapia anti-IL17 ha abogado en la disminución de la inflamación en un modelo animal [27]. En este estudio, se detectaron niveles altos de IL-10 en nuestros pacientes; otros autores han

descrito similares resultados[28]. Una posible explicación es que la IL-10 es reconocida como una citocina antiinflamatoria y un regulador negativo de la respuesta inmune innata y adaptativa. Un estudio informó que el bloqueo del IL-10R resultó en aumento y aceleración de la mortalidad, pero no afectó la carga viral [29]. El segundo grupo de citocinas encontradas en niveles más bajos en pacientes infectados por el VIB probablemente es causado por la regulación inmune de la IL-10 y las citocinas Th1 y Th17, o todas aquellas que pueden estar actuando en el tejido pulmonar.

El recuento de leucocitos y neutrófilos están correlacionados negativamente con la carga viral del VIB. No hay datos reportados al respecto, pero un grupo de investigación informó de que las cifras bajas o con función inadecuada de los neutrófilos, puede facilitar la progresión de la VIA leve, a la enfermedad clínica grave[30].

En este estudio, el estrés percibido tuvo un efecto negativo en los monocitos sanguíneos y en los niveles de citocinas. Como se ha mencionado anteriormente, el estrés psicológico se ha relacionado con la influenza y puede aumentar la respuesta inmune humoral, pero reduce la respuesta inmune celular [31,32]. La reducción de monocitos en el número y función se ha reportado en los sujetos una semana después del período de examen[33]. Este resultado mostró que el estrés tiene un impacto en las células inmunes en poco tiempo. En nuestra población de estudio, este efecto puede ser similar al estrés percibido o para el reclutamiento de monocitos en el tracto respiratorio para combatir la infección por VIB.

Por otra parte, un grupo informó que el estrés percibido tenía un efecto negativo en la producción de citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) por los leucocitos estimulados con la vacuna de la influenza *in vitro* [34].

En este estudio, los niveles de cortisol se correlacionaron positivamente con los niveles plasmáticos del CCL20 en los pacientes infectados con VIB. Este es el primer informe que correlaciona el cortisol con el CCL20 (o MIP-3 $\alpha$ ), una quimiocina que atrae fuertemente a las células dendríticas inmaduras, de memoria, linfocitos T y, en menor medida, neutrófilos. Por otra parte, el cortisol mostró efectos positivos en los niveles de citocinas plasmáticas (IL-1, IL-2, IL-21, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17E, IL-17F, IL-23, e IL28A). El cortisol ha sido implicado en la inhibición de la expresión de la IL-10 en las células B de personas con aterosclerosis [35]. Los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y depresión mostraron niveles más altos de IL-1 y TNF- $\alpha$  en esputo, y una disminución del cortisol salival [36]. Se ha reportado una correlación inversa entre el cortisol y las citocinas proinflamatorias en sujetos con estrés psicológico [37]. Por otro lado, en pacientes con cáncer colorrectal, el cortisol se correlacionó positivamente con los niveles de IL-6 y TGF- $\beta$  [38]. En los pacientes infectados con el virus sincitial respiratorio, el cortisol se correlacionó positivamente con IL-6 [39]. Todos estos informes revelan que el efecto del cortisol en los niveles de citocinas depende de diferentes condiciones como la aterosclerosis, el EPOC, el estrés, el cáncer y la infección respiratoria viral. Diaz y colaboradores encontraron una correlación positiva con la IL-6. En este estudio, nosotros encontramos una correlación positiva del cortisol con los niveles de varias citocinas, una de las limitaciones fue el tamaño de la muestra de casos y

controles, pacientes infectados y coinfectados con VIB. Nosotros hemos presentado el posible papel del cortisol y el estrés percibido sobre los niveles de citocinas en pacientes infectados con el VIB.

Nuestros hallazgos mostraron un patrón de citocinas Th1, Th17 e IL-10 en pacientes infectados con VIB, y el posible papel del recuento de leucocitos (especialmente neutrófilos) en el control del VIB. Estos resultados también sugieren la importancia del estrés percibido y el cortisol con los niveles de citocinas sistémicas en estos pacientes, pero se necesitan más estudios para entender este complejo sistema psico-endocrino-inmunológico y poder dilucidar su papel en la producción de citocinas en otras enfermedades infecciosas respiratorias como COVID-19.

## **CAPITULO VIII**

### **8. CONCLUSIÓN**

Las citocinas Th1, Th17 e IL10 fueron más altas en los pacientes infectados con VIB ( $P < 0,05$ ). Los leucocitos y los neutrófilos están correlacionados negativamente con la carga viral ( $P < 0,05$ ). El estrés percibido tuvo un efecto negativo en los monocitos y las citocinas sistémicas en los pacientes infectados por el VIB ( $P < 0,05$ ). El nivel de cortisol fue mayor en los pacientes infectados con VIB y se correlacionó positivamente con el CCL20 ( $P < 0,05$ ); además mostró un efecto positivo en la mayoría de las citocinas sistémicas ( $P < 0,05$ ).

El cortisol y el estrés percibido están asociados con los niveles de citocinas en pacientes infectados con el virus de la influenza tipo B.

## CAPITULO IX

### 9. ANEXOS

#### 9.1 Cuestionario estrés percibido

Versión en español PSS-10

Las preguntas en esta escala hacen referencia a sus sentimientos y pensamientos durante el **último mes**. En cada caso, por favor indique con una "X" cómo usted se ha sentido o ha pensado en cada situación.

|  | Nunca | Casi nunca | De vez en cuando | A menudo | Muy a menudo |
|--|-------|------------|------------------|----------|--------------|
| 1. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado afectado por algo que ha ocurrido inesperadamente?  | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |
| 2. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido incapaz de controlar las cosas importantes en su vida?                                    | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |
| 3. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido nervioso o estresado?   | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |
| 4. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha manejado con éxito los pequeños problemas irritantes de la vida?                                     | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |
| 5. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que ha afrontado efectivamente los cambios importantes que han estado ocurriendo en su vida? | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |
| 6. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado seguro sobre su capacidad para manejar sus problemas personales?                              | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |
| 7. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las cosas le van bien?   | 0     | 1          | 2                | 3        | 4            |

|  |   |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|---|
| 8. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que no podía afrontar todas las cosas que tenía que hacer?                 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 9. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar las dificultades de su vida?                                      | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 10. En el último mes, ¿con que frecuencia se ha sentido que tenía todo bajo control?   | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 11. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado enfadado porque las cosas que le han ocurrido estaban fuera de su control? | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 12. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha pensado sobre las cosas que le quedan por hacer?                                  | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 13. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar la forma de pasar el tiempo?                                     | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 14. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las dificultades se acumulan tanto que no puede superarlas?           | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |

### **Escala de Estrés Percibido (Perceived Stress Scale, PSS)**

Esta escala es un instrumento de auto informe que evalúa el nivel de estrés percibido durante el último mes, consta de 14 ítems con un formato de respuesta de una escala de cinco puntos (0 = nunca, 1 = casi nunca, 2 =de vez en cuando, 3 = a menudo, 4 = muy a menudo). La puntuación total de la PSS se obtiene invirtiendo las puntuaciones de los ítems 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 13 (en el sentido siguiente: 0=4, 1=3, 2=2, 3=1 y 4=0) y sumando entonces los 14 ítems. La puntuación directa obtenida indica que a una mayor puntuación corresponde un mayor nivel de estrés percibido.

## CAPÍTULO X

### 10. Bibliografía

- [1] A. Pedersen, R. Zachariae, D.H. Bovbjerg, Influence of psychological stress on upper respiratory infection—a meta-analysis of prospective studies, *Psychosom. Med.* 72 (2010) 823–832. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181f1d003>.
- [2] A. Nakata, Psychosocial job stress and immunity: A systematic review, *Methods Mol. Biol.* 934 (2012). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7_3).
- [3] G.E. Miller, S. Cohen, S. Pressman, A. Barkin, B.S. Rabin, J.J. Treanor, Psychological stress and antibody response to influenza vaccination: when is the critical period for stress, and how does it get inside the body?, *Psychosom. Med.* 66 (2004) 215–223. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000116718.54414.9e>.
- [4] C.J. Heijnen, Receptor regulation in neuroendocrine-immune communication: Current knowledge and future perspectives., *Brain. Behav. Immun.* 21 (2007) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.08.008>.
- [5] R.H. Straub, M. Cutolo, Psychoneuroimmunology—developments in stress research, *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 168 (2018) 76–84. <https://doi.org/10.1007/s10354-017-0574-2>.
- [6] H. AJ, G. V, D. AR, L. YP, The evolution of human influenza viruses, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356 (2001) 1861–1870. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2001.0999>.
- [7] G. WP, Editorial commentary: Changing epidemiology of influenza B virus, *Clin. Infect. Dis.* 59 (2014) 1525–1526. <https://doi.org/10.1093/CID/CIU668>.
- [8] I. A, P. PS, Innate immunity to influenza virus infection, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 315–328. <https://doi.org/10.1038/NRI3665>.
- [9] K. MJ, F. E, R. RE, Influenza virus activation of the interferon system, *Virus Res.* 209 (2015) 11–22. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2015.02.003>.
- [10] W. W, Z. W, D. ES, B. JL, Z. MH, M. JP, RIG-I and TLR3 are both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells, *Virology.* 482 (2015) 181–188. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.03.048>.
- [11] C. Lai, X. Wang, P. Yang, Clinical Microbiology: Open Access Cytokines Network and Influenza Virus Infection, *Clin Microb.* 3 (2014) 3. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000147>.
- [12] L. Q, Z. YH, Y. ZQ, The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy, *Cell. Mol. Immunol.* 13 (2016) 3–10. <https://doi.org/10.1038/CMI.2015.74>.
- [13] O. MB, R. H, Cytokine storm plays a direct role in the morbidity and mortality from influenza virus infection and is chemically treatable with a single sphingosine-1-phosphate agonist molecule, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 378 (2014) 129–147. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-05879-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05879-5_6).
- [14] C. S, J.-D. D, D. WJ, M. GE, F. E, R. BS, T. RB, Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 5995–5999. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1118355109>.
- [15] S. SB, S. R, Evaluation of three influenza A and B real-time reverse



- transcription-PCR assays and a new 2009 H1N1 assay for detection of influenza viruses, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 3870–3875. <https://doi.org/10.1128/JCM.02464-09>.
- [16] G.-R. MT, R.-A. MN, H. RL, The perceived stress scale (PSS): normative data and factor structure for a large-scale sample in Mexico, *Span. J. Psychol.* 16 (2013). <https://doi.org/10.1017/SJP.2013.35>.
- [17] B. SH, F. RS, M. SD, R. SC, S. GR, K. EA, M. VL, Reliability and validity of the Perceived Stress Scale-10 in Hispanic Americans with English or Spanish language preference, *J. Health Psychol.* 24 (2019) 628–639. <https://doi.org/10.1177/1359105316684938>.
- [18] E.J. Pedrero Perez, Á.O. Arroyo, Perceived stress in addicted individuals in treatment by the Cohen scale: Psychometric properties and results of its application, *Ann. Psychol.* (2010). [https://www.researchgate.net/publication/286354892\\_Perceived\\_stress\\_in\\_addicted\\_individuals\\_in\\_treatment\\_by\\_the\\_Cohen\\_scale\\_Psychometric\\_properties\\_and\\_results\\_of\\_its\\_application](https://www.researchgate.net/publication/286354892_Perceived_stress_in_addicted_individuals_in_treatment_by_the_Cohen_scale_Psychometric_properties_and_results_of_its_application) (accessed August 4, 2021).
- [19] C. S, D. WJ, S. DP, Psychological stress, cytokine production, and severity of upper respiratory illness, *Psychosom. Med.* 61 (1999) 175–180. <https://doi.org/10.1097/00006842-199903000-00009>.
- [20] O. CM, G. AJ, W. SS, J. T, W. D, R. PL, C. MA, H. T, D. JP, W. RJ, T. PG, Mucosal immune responses predict clinical outcomes during influenza infection independently of age and viral load, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (2014) 449–462. <https://doi.org/10.1164/RCCM.201309-1616OC>.
- [21] S. I, R. M, D. S, G. D, B. LB, Co-infections with influenza and other respiratory viruses, *Adv. Exp. Med. Biol.* 756 (2013) 291–301. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0\\_36](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0_36).
- [22] S. S, C. SS, P. A, D. T, K. PD, Y.-H. K, F. MM, H. M, S. R, L. R, M. C, H. EB, Z. S, H. GE, F. B, M.-H. C, T. A, H. V, L. ML, S. W, P. A, B. A, F. AM, Comparing clinical characteristics between hospitalized adults with laboratory-confirmed influenza A and B virus infection, *Clin. Infect. Dis.* 59 (2014) 252–255. <https://doi.org/10.1093/CID/CIU269>.
- [23] I. Y, I. H, The IL-23/IL-17 axis in inflammation, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1218–1222. <https://doi.org/10.1172/JCI28508>.
- [24] W. X, C. CC, Y. M, D. J, P. VK, L. VH, K. KH, Z. J, Y. KY, Z. BJ, L. L, A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection, *Cell. Mol. Immunol.* 8 (2011) 462–468. <https://doi.org/10.1038/CMI.2011.38>.
- [25] B.-M. JF, O. de L. R, P. T, R. J, A. R, R. P, M.-L. I, V. D, G. MC, S. C, M. D, G. JM, T.-A. A, R. MJ, M. ML, H. S, S. E, G. M, F. V, D.C. A, M. MA, V. B, L. CJ, R.-D. M, G. JC, C. R, L. A, R. S, E. JM, H. C, G. I, T. N, B. D, L. A, C. P, R. T, K. DJ, Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza, *Crit. Care.* 13 (2009). <https://doi.org/10.1186/CC8208>.
- [26] R.-R. EJ, O.-S. A, M.-M. C, S.-C. MC, R. A, M.-T. VL, R.-T. AG, TGF- $\beta$  Blood Levels Distinguish Between Influenza A (H1N1)pdm09 Virus Sepsis and Sepsis due to Other Forms of Community-Acquired Pneumonia, *Viral Immunol.* 28 (2015) 248–254. <https://doi.org/10.1089/VIM.2014.0123>.
- [27] S. A, Y. K, T. A, S. O, I. Y, N. LP, M. BJ, Targeting IL-1 $\beta$  and IL-17A driven

- inflammation during influenza-induced exacerbations of chronic lung inflammation, *PLoS One*. 9 (2014).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0098440>.
- [28] Y. X, Z. X, Z. B, W. J, Z. Z, T. Z, S. J, S. J, G. Y, Y. Z, W. F, Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6, *PLoS One*. 6 (2011).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0028680>.
- [29] S. J, M. R, K. CL, B. TJ, Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10, *Nat. Med*. 15 (2009) 277–284.  
<https://doi.org/10.1038/NM.1929>.
- [30] T. MD, D. YM, J. JE, A. GP, B. AG, R. PC, Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection, *J. Immunol*. 183 (2009) 7441–7450. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902497>.
- [31] C. S, T. DA, S. AP, Psychological stress and susceptibility to the common cold, *N. Engl. J. Med*. 325 (1991) 606–612.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199108293250903>.
- [32] P. IH, T. KY, L. C, K. JJ, L. SJ, Psychological stress may induce increased humoral and decreased cellular immunity, *Behav. Med*. 26 (2000) 139–141.  
<https://doi.org/10.1080/08964280009595761>.
- [33] M. V, C. M, D. N, E. M, D. J, D. S, W. OT, K. T, W. C, Impact of chronic and acute academic stress on lymphocyte subsets and monocyte function, *PLoS One*. 12 (2017). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0188108>.
- [34] S. V, N. JL, P. TE, S. LA, M. DO, Effect of perceived stress on cytokine production in healthy college students, *West. J. Nurs. Res*. 37 (2015) 481–493.  
<https://doi.org/10.1177/0193945914545658>.
- [35] H. Y, C. Y, G. L, L. L, X. X, W. T, Cortisol is associated with low frequency of interleukin 10-producing B cells in patients with atherosclerosis, *Cell Biochem. Funct*. 35 (2017) 178–183. <https://doi.org/10.1002/CBF.3262>.
- [36] D. YJ, Y. CJ, L. B, W. X, L. YB, J. HL, C. YX, S. J, L. QL, G. WY, Z. HY, L. BJ, W. JF, D. JC, Association of pro-inflammatory cytokines, cortisol and depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Psychoneuroendocrinology*. 46 (2014) 141–152.  
<https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2014.04.020>.
- [37] K.-E. SR, M.-A. V, F. PJ, K. C, S. A, Cortisol responses to mild psychological stress are inversely associated with proinflammatory cytokines, *Brain. Behav. Immun*. 17 (2003) 373–383. [https://doi.org/10.1016/S0889-1591\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(03)00029-1).
- [38] R. T, I. PF, B. J, M. MC, I. S, B. B, J. C, L. F, Elevated serum cytokines correlated with altered behavior, serum cortisol rhythm, and dampened 24-hour rest-activity patterns in patients with metastatic colorectal cancer, *Clin. Cancer Res*. 11 (2005) 1757–1764. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2000>.
- [39] P. V Díaz, A.A. Gaggero, R.A. Pinto, R. Mamani, P.A. Uasapud, M.R. Bono, Aumento de interleuquinas proinflamatorias y de cortisol plasmático en bronquiolitis por virus respiratorio sincicial: relación con la gravedad de la infección, *Rev. Med. Chil*. 141 (2013) 574–581. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013000500004>.

**CAPÍTULO XI**  
**11. RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Carlos Augusto López

Acevo

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÉS Y CITOCINAS EN  
PACIENTES INFECTADOS CON EL VIRUS DE INFLUENZA B

Campo de Estudio: Ciencias de Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Aguascalientes, Aguascalientes el 18 de Mayo de  
1979, hijo de Carlos López Ramos y María Arcelia Acevo Chávez

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado  
obtenido Médico Cirujano y Partero en 2003

Maestría en Psicoterapia en 2012

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la  
Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2017