



Universidad Nacional de Rosario  
Facultad de Ciencias Médicas  
Instituto de Inmunología

**Estudios moleculares y funcionales en células mononucleares de pacientes con Tuberculosis pulmonar, estimuladas *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis* y tratadas con Cortisol y/o Dehidroepiandrosterona**

Autora: Lic. Verónica Vanina Bozza  
Directora: Dra. María Luisa Bay

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

2011

# INDICE

---

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

PUBLICACIONES Y PREMIOS

RESUMEN

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Tuberculosis	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Agente etiológico	2
1.2. Características generales sobre la Respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i>	4
1.2.1. Respuesta inmune innata contra <i>M. Tuberculosis</i>	5
1.2.2. Activación de los MΦs	8
1.2.3. Mecanismos efectores basados en intermediarios del oxígeno y del Nitrógeno	8
1.2.4. Mediadores solubles: Citocinas	9
1.2.4.1. Interleucina-12, interleucina-15 e interleucina-18	10
1.2.4.2. Interferón gamma	11
1.2.4.3. Factor de necrosis tumoral alfa	12
1.2.4.4. Interleucina-17, interleucina-23 e interleucina-27	12
1.2.4.5. Interleucina-10	13
1.2.4.6. Factor de Crecimiento Transformante beta	14
1.2.4.7. Otras interleucinas de relevancia	16
1.2.5. Células T	17
1.2.6. El rol de la apoptosis	19
1.2.6.1. Señalización y regulación del proceso apoptótico	20
1.2.6.2. Apoptosis en el contexto del Sistema Inmune	22
1.2.6.2.1. Muerte celular pasiva	22
1.2.6.2.2. Muerte celular inducida por activación	23
1.2.6.3. Apoptosis inducida por Glucocorticoides	24
1.3. Interacciones Neuroinmunoendócrinas	24
1.3.1. El eje HPA	25
1.3.2. Los Glucocorticoides y su función inmunológica	26
1.3.2.1. Modo de acción de los Glucocorticoides	26

1.3.2.2. Receptores de Glucocorticoides	27
1.3.2.3. Regulación del metabolismo del Cortisol en la periferia	28
1.3.2.4. Función Inmunológica de los glucocorticoides	28
1.3.2.5. Efectos de los Gc sobre la función de las células T	29
1.3.3. Otro regulador de importancia: la Dehidroepiandrosterona (DHEA)	29
1.3.3.1. Mecanismos de acción	30
1.3.3.2. Efectos sistémicos de la dehidroepiandrosterona	30
1.3.3.3. Rol inmunomodulador de la DHEA	31
Hipótesis de trabajo	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	
3.1. Grupos de estudio	37
3.2. Muestras	38
3.3. Separación de células mononucleares	38
3.4. Evaluación de la viabilidad celular	39
3.5. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo	39
3.6. Estudios de linfoproliferación	41
3.7. Estudio de los efectos <i>in vitro</i> del Cortisol y DHEA	41
3.8. Cuantificación de mediadores	42
3.9. Medición de las hormonas plasmáticas	42
3.10. Cuantificación de apoptosis de CMP por citometría de flujo, utilizando AnexinaV-FITC/Ioduro de propidio	43
3.11. Medición de subpoblaciones hipodiploides por citometría de flujo mediante la marcación con IP	44
3.12. Sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de Pacientes y Controles Sanos para los experimentos con la línea adrenal	45
3.13. Cultivos de la línea celular adrenal NCI-H295R	45
3.14. Evaluación de la viabilidad de las células adrenales	47
3.15. Análisis de la proliferación celular de la línea NCI-H295R	48
3.16. Cultivos de la línea celular adrenal NCI-H295R y tratamiento con anti-TGF- $\beta$	48
3.17. Tratamiento de la línea NCI-H295R con pooles de SN de cultivos de CMP estimuladas con antígenos de <i>M.tuberculosis</i> y adicionados con anti TGF- $\beta$	49

3.18. Análisis estadístico	50
<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>CAPÍTULO 1</b>	
4.1. Evaluación de la apoptosis de CMP de Pacientes con TB y Controles, estimuladas con Mtb y co-cultivadas con distintas concentraciones de Cortisol y/o DHEA	
4.1.1. Descripción general de la población en estudio	51
4.1.2. Capacidad blastogénica de las CMP de Sujetos Sanos y Pacientes con TB pulmonar frente a Mtb sonicado	55
4.1.3. Efecto del Cortisol y DHEA sobre la apoptosis temprana de CMP de Controles y pacientes con TB	56
4.1.4. Efecto del Cortisol y DHEA sobre la apoptosis tardía de CMP de Controles y pacientes con TB	60
<b>CAPÍTULO 2</b>	
4.2. Análisis de los niveles plasmáticos de Cortisol, DHEA y DHEA-S y su relación con la producción de IFN- $\gamma$ en cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes de primer grado	
4.2.1. Descripción de la población estudiada	62
4.2.2. Cuantificación plasmática de DHEA, DHEA-S y Cortisol	65
4.2.3. Respuesta proliferativa antígeno-específica de CMP provenientes de Pacientes con TB pulmonar, Convivientes y Controles	66
4.2.4. Cuantificación de los niveles de INF- $\gamma$ en cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar, Convivientes y Controles, estimuladas con Tso y adicionadas con Cortisol y/o DHEA	67
<b>CAPÍTULO 3</b>	
4.3. Efectos de la adición de SN de cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar y Controles sobre la producción de esteroides por la línea celular NCI-H295R	69
4.3.1. Comportamiento de la línea NCI-H295R en las condiciones experimentales propuestas	69
4.3.1.1. Análisis de la viabilidad celular de cultivos de la línea NCI-H295R	69
4.3.1.2. Proliferación de la línea adrenal en diferentes medios de cultivo	71
4.3.1.3. Cuantificación de los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en cultivos de la línea adrenal NCI-H295R	72
4.3.2. Análisis de la modificación en la producción de esteroides adrenales	

por SN de cultivo de CPM de pacientes con TB pulmonar y Controles	74
4.3.2.1. Niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en sobrenadantes de la línea adrenal humana NCI-H295R adicionada con SN de CMP de Pacientes y Controles cultivadas durante 36 h	75
4.3.2.2. Niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en sobrenadantes de la línea adrenal humana NCI-H295R adicionada con SN de CMP de Pacientes y Controles cultivadas durante 24 h	77
4.3.2.3. Niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en sobrenadantes de la línea adrenal humana NCI-H295R adicionada con SN de CMP de Pacientes y Controles cultivadas durante 4 días.	79
4.3.3. Análisis de la modificación en la producción de esteroides adrenales por SN de cultivos de CMP de Pacientes con TB y Controles, tratados con anti-TGF- $\beta$	82
4.3.3.1. Cuantificación de DHEA y DHEA-S en cultivos de la línea adrenal NCI-H295R adicionados con <i>pools</i> de SN de CMP provenientes de Pacientes y Controles, cultivadas durante 36 h y tratados con anti-TGF- $\beta$	82
4.3.3.2. Cuantificación de Cortisol en cultivos de la línea adrenal NCI-H295R adicionados con <i>pools</i> de SN de CMP provenientes de Pacientes y Controles, cultivadas durante 36 h y tratados con anti-TGF- $\beta$	84
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
CAPÍTULO 1	
5.1. Evaluación de la apoptosis de CMP de Pacientes con TB y Controles, estimuladas con Mtb y co-cultivadas con distintas concentraciones de Cortisol y/o DHEA	86
CAPÍTULO 2	
5.2. Análisis de los niveles plasmáticos de Cortisol, DHEA y DHEA-S y su relación con la producción de IFN- $\gamma$ en cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes de primer grado	91
CAPÍTULO 3	
5.3. Efectos de la adición de SN de cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar y Controles sobre la producción de esteroides por la línea celular NCI-H295R	94
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES</b>	99
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	102

# 1 Abreviaturas

---

Ac	Anticuerpos	MC	Medio de Cultivo
ACTH	Adenocorticotrofina	M CIA	Muerte celular inducida por activación
ADN	Acido desoxiribonucléico	Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
AED	Androstenediol	MTT	Metil Tetrazolium
Ag	Antígeno	MΦs	Macrófagos
AMP	Adenosina monofosfato	MR	Receptor para mineralocorticoides
Asp	Aspartato	NADPH	Nicotinamida Adenina dinucleótido
Atb	Antibiótico	NFκB	Factor nuclear κB
CD	“Cluster” de diferenciación	NK	Células citotóxicas naturales
Cél	Células	nm	Nanómetro
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	NO	Óxido Nítrico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
Con A	Concanavalina A	PE	Ficoeritrina
CPA	Célula Presentadora de Antígeno	PPD	Derivado proteico purificado
CPM	Células Periféricas Mononucleares	PS	Fosfatidilserina
cpm	Cuentas por minuto	RI	Respuesta Inmune
CR	Receptores para Complemento	RIN	Reactivos intermediarios del Nitrógeno
CRH	Hormona liberadora de Corticotrofina	RIO	Reactivos intermediarios del Oxígeno
DE	Desvío estándar	rpm	Revoluciones por minuto
DED	Dominio efector de muerte	SABi	Suero humano AB inactivado
Dh	Deshidrogenasa	SFB	Suero Fetal Bobino
DHEA	Dehidroepiandrosterona	SI	Sistema Inmune
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona sulfato	SN	Sobrenadantes
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético	SNC	Sistema Nervioso Central
EE	Error estándar	TB	Tuberculosis
ELISA	Enzimoinmunoensayo	TB-Lev	Pacientes con TB Leve
FcR	Receptor para la porción Fc	TB-Mod	Pacientes con TB Moderada
FEC	Factor estimulante de colonias	TB-Sev	Pacientes con TB Severa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	TCR	Receptor de células T
Fk	Forskolin	TGF-β	Factor de crecimiento Transformante-β
GC	Glucocorticoides	TGF-βR	Receptor para TGF-β
GMP	Guanosina mono fosfato	Th1	Linfocito T colaborador tipo1
GR	Receptor de GC	Th2	Linfocito T colaborador tipo 2
GRE	Elementos de Respuesta a GC	TLR	Receptores Toll-like
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal	TNF R	Receptor para TNF
hsp	Proteínas de choque térmico	Tso	Sonicado total de Mtb
IE	Índice de estimulación		
IFN-γ	Interferón-γ		
IGF-I	Factor de crecimiento insulino-símil –I		
IL	Interleucina		
IL-R	Receptor de interleucina		
iNOS	Enzima óxido-nítrico sintetasa inducible		
IP	Ioduro de Propidio		
LT	Linfocitos T		
MC	Mineralocorticoides		

## 2 Publicaciones y Premios

---

Parte de los resultados expuestos en este trabajo se tesis fueron publicados en las siguientes revistas científicas

- ✓ **Bozza Verónica**, D'Attilio Luciano, Dídoli Griselda, Radcliffe Stella, Besedovsky Hugo, del Rey Adriana, Bay María Luisa, Bottasso Oscar. "Inhibition of DHEA production by factors released from M. tuberculosis-stimulated peripheral blood mononuclear cells is abrogated by transforming growth factor- $\beta$  neutralization" enviado para su evaluación y publicación.
- ✓ **Bozza Veronica**; D'Attilio Luciano; Didoli, Griselda; Santucci Natalia; Nannini Luis; Bogue Cristina; Del Rey Adriana; Besedovsky Hugo; Bay Maria Luisa; Bottasso Oscar. "The Adrenal Steroid response during Tuberculosis and Its Effects on the Mycobacterial-driven IFN- $\gamma$  Production of patients and Their Household Contacts. **Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1153: 247–255 (2009).**
- ✓ **Bozza, Verónica**; D'Attilio, Luciano; Dídoli, Griselda; Rondelli Flavia; Farroni, Miguel; Bogué, Cristina; Giordano, Ricardo; Bottasso, Oscar; Bay, María Luisa. "Cortisol-induced changes in the apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients and their association with the *in vitro* IFN- $\gamma$  production". **Biocell 32(1): 91, (2008).**
- ✓ **Bozza Verónica**, D'Attilio Luciano, Mahuad Carolina, Giri Adriana, Del Rey Adriana, Besedovsky Hugo, Bottasso Oscar, Bay Maria Luisa. "Altered Cortisol/DHEA ratio in tuberculosis patients and its relationship with abnormalities in the mycobacterial-driven cytokine production by peripheral blood mononuclear cells". **Scandinavian Journal of Immunology 66: 97–103, (2007).**
- ✓ Mahuad Carolina, **Bozza Verónica**, Pezzotto Stella Maris, Bay María Luisa, Besedovsky Hugo, del Rey Adriana, Bottasso Oscar "Impaired Immune Responses in Tuberculosis Patients Are Related to Weight Loss That Coexists with an Immunoendocrine Imbalance" **Neuroimmunomodulation, 14:193-199, (2007).**
- ✓ Del Rey Adriana, Mahuad Carolina, **Bozza Verónica**, Bogue Cristina, Farroni Miguel, Bay Maria Luisa, Bottasso Oscar, Besedovsky Hugo "Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. **Brain, Behavior, and Immunity 21 (2): 171-179, 2007.**

Premios:

- ✓ Premio de la Sociedad de Biología de Rosario 2007. Área Biomédica.

Trabajo: **Interacción inmunoendócrina. Expresión de receptores de glucocorticoides y severidad de la Tuberculosis.** D'Attilio, L; Trini, E; **Bozza, V**; Dídoli, G; Nannini, LJ; Gardeñez, W; Giri, A; Bottasso, O; Bay, ML.

- ✓ Premio de la Sociedad de Biología de Rosario 2006. Área Biomédica.

Trabajo: **Modificaciones en la relación cortisol/dhea en pacientes con tuberculosis (tb) y su asociación con la respuesta inmune específica *in vitro*.** **Bozza, V**; D'Attilio, L; Mahuad, C; Dídoli, G; Giri, A; Bottasso, O; Bay, M L.

*A mi familia, y a todos los que de una manera u otra  
hicieron posible este trabajo de Tesis...*

*¡MUCHAS GRACIAS!*



### 3 Resumen

---

La tuberculosis (TB) constituye la enfermedad infectocontagiosa que mayor número de muertes causa en el mundo. Su curso no depende sólo de la activación del Sistema Inmune sino también de su interacción con otros Sistemas como el Neuroendócrino. En trabajos previos demostramos la inhibición provocada por el Cortisol (GC), tanto en la blastogénesis como en la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y el efecto inhibitorio de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la síntesis de TGF- $\beta$  a partir de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes con TB, estimuladas específicamente. A fin de conocer si dicha inhibición se relacionaba con un aumento en la apoptosis de células inmunocompetentes, se cultivaron CMP de Pacientes con TB y Controles, estimuladas con Mtb sonicado (Tso), a las que se les adicionó GC y DHEA. Pudo observarse que la estimulación con Tso indujo mayor apoptosis en las células provenientes de pacientes con TB, sin modificaciones tras la adición de GC y/o DHEA.

Por las características de la TB humana, donde es difícil definir el tiempo transcurrido entre el contacto con la micobacteria y la manifestación clínica y a fin de lograr una mayor conocimiento al respecto se estudiaron individuos con exposición conocida, esto es, los Convivientes íntimos de pacientes bacilíferos sin signos y síntomas de enfermedad. In vitro, éste grupo presentó los niveles más altos de linfoproliferación al estimular con Tso, mientras que los pacientes los más descendidos, comportamiento que también se observó al cuantificar la producción de IFN- $\gamma$ . Más aún, el co-cultivo de las CMP estimuladas específicamente, con GC y DHEA, mostró una inhibición en la síntesis de este mediador en todos los grupos, aunque los Convivientes continuaron presentando las mayores concentraciones.

Citocinas inhibitorias de la respuesta inmune antituberculosa, como TGF- $\beta$  e IL-6 presentan reconocida influencia sobre la síntesis de esteroides, este hecho y la inhibición observada en la síntesis de DHEA por parte de células de la línea adrenal NCI-H295R, producida por los sobrenadantes (SN) de cultivos de CMP, estimuladas con Tso, nos sugirieron que algunos de ellos podrían estar implicados en la inhibición de la síntesis de DHEA adrenal. Como el TGF- $\beta$  se encontraba significativamente incrementado en el plasma de los pacientes se investigó el potencial efecto modulador del mismo sobre la síntesis de DHEA y GC en cultivos de la línea NCI-H295R. El tratamiento con SN de CMP estimuladas durante 36hs. con Tso inhibió la producción de DHEA, y ello fue revertido por la adición de anti-TGF- $\beta$  25:1. Sin embargo, frente a este tratamiento, la producción de GC aumentó. Pudo demostrarse el TGF- $\beta$  es al menos uno de los responsables de la inhibición en la producción de DHEA por las células adrenales.

Estos resultados originales contribuyen con nueva evidencia para lograr un mejor conocimiento en cuanto a la comunicación neuroinmunoendócrina en TB

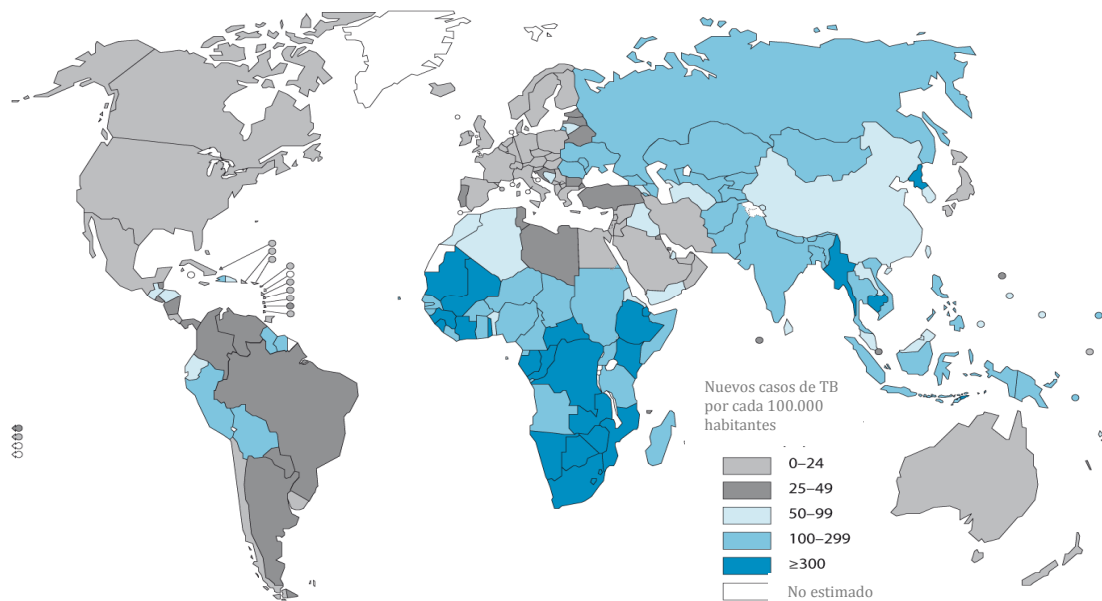
# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. La Tuberculosis

### 1.1.1. Generalidades

Como enfermedad infecto contagiosa, la tuberculosis (TB), es una de las causas de muerte más importantes en el mundo, con 2 millones de casos fatales y aproximadamente 9 millones de nuevos casos por año (1).



---

Figura 1: Número estimado de nuevos casos de tuberculosis durante el año 2009, © WHO, 2010.

---

Esta patología ya se hallaba presente mucho antes del comienzo de la historia escrita, dejó su marca en el avance de las ciencias biomédicas y el agente causal, el *Mycobacterium tuberculosis*, fue uno de los mayores flagelos de la humanidad. Existen registros de TB en Egipto, India y China, con 5000, 3300 y 2300 años de antigüedad, respectivamente (2).

Las momias egipcias ponen de manifiesto las huellas de esta enfermedad, con anormalidades y deformidades características que también se ven reflejadas tanto en las piezas de arte egipcio como en las de arte precolombino (Figura 2).

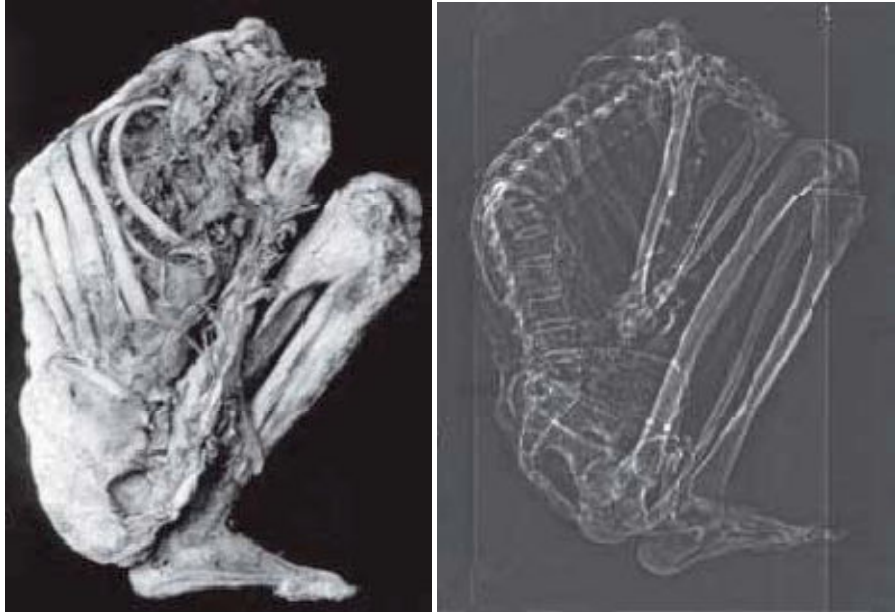


Figura 2: Izquierda: Momia 003, Museo Arqueológico de la Casa del Marqués de San Jorge, Bogotá, Colombia. Derecha: Tomografía computada mostrando lesiones vertebrales. Figuras tomadas del libro: Tuberculosis 2007, from basic science to patient care; Palomino *et al*, 2007

Desde mediados de los años 80 el mundo fue testigo de un dramático aumento en los casos de tuberculosis, la causa de este incremento se debe a que el riesgo de reactivación de la TB latente se vio acrecentado a raíz de la mayor expectativa de vida de nuestra sociedad, a la aparición de co-infección con el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV) y la desmedida urbanización, migración, marginación y desnutrición, entre otros factores (3).

Es así como un tercio de la población mundial se encuentra infectada por el *M. tuberculosis*, y el 5 o 10% de esta población corre el riesgo de desarrollar una tuberculosis primaria. El continuo deterioro de las condiciones socioeconómicas con la pauperización, fundamentalmente de los países del tercer mundo, ha contribuido a un aumento de los casos existentes.

### 1.1.2. Agente etiológico

Como se señaló previamente el agente causal de esta patología es el *M. tuberculosis*, un bacilo ácido-alcohol resistente, cuya vía de transmisión principal es la aérea generando, como consecuencia mayor incidencia de tuberculosis pulmonar.

La progresión de la infección producida por esta bacteria es extremadamente variable, regulada principalmente por la integridad del sistema inmune del hospedador, que podrá

eliminar con éxito al patógeno, mantenerlo en condiciones de latencia o dar origen a una enfermedad activa (4).

Al respecto, un gran número de reportes indican diferencias en la susceptibilidad hacia la enfermedad, tanto en humanos como en animales de experimentación; (5,6) y sugieren a la vez que la activación del eje Hipotalámico-pituitario-Adrenal (HPA) puede estar involucrada en tales variaciones.

En la actualidad se conocen 60 especies pertenecientes al genero *Mycobacterium*, la mayoría de ellas pertenecen a la flora saprofita del suelo, y sólo una minoría son patógenas para el hombre, causando tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, y *M. africanum*) y lepra (*M. leprae*). El *M. tuberculosis*, que corresponde a un patógeno exclusivamente humano, debió adaptarse a su único hospedero aún bajo las presiones selectivas de la evolución del hombre.

Es una bacteria Gram positiva con forma de cigarro que no posee flagelos, no forma esporas, no produce toxinas y no posee cápsula. Su ancho puede variar desde 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$  y su largo aproximado es de 4  $\mu\text{m}$ . Pertenece al grupo de micobacterias de crecimiento lento, ya que posee un tiempo de duplicación que varía de 15 a 20 h Debido a la composición de la pared celular, rica en lípidos complejos, ácido micólico y ceras se le asigna el nombre de bacteria ácido alcohol resistente y deben ser coloreadas con la tinción de Ziehl-Nielsen. Es un patógeno intracelular que coloniza a macrófagos, preferentemente del sistema pulmonar, donde usualmente esta condicionado a un estado de latencia hasta que se pierde el balance entre el sistema inmune del hospedador y la bacteria. Su tiempo de generación es de 24 h tanto en medios sintéticos como en animales infectados y durante su desarrollo *in vitro* puede observarse a simple vista la formación de colonias que poseen una superficie seca y arrugada.

Durante mucho tiempo las investigaciones con personas cercanas a pacientes con Tuberculosis se focalizaron en el diagnóstico de la enfermedad activa, encontrándose una gran transmisión de dicha infección a partir de los pacientes con examen directo de esputo positivo para bacilos ácido alcohol resistente, mostrando una prevalencia de Tuberculosis activa en los convivientes adultos de 1,3 a 1,5 % (7). En la actualidad se definen como contactos a aquellas personas que conviven o presentan una relación estrecha permanente con el paciente bacilífero detectado durante la fase sintomática de la enfermedad, o han compartido la misma habitación al menos una vez a la semana. También entran en esta

clasificación aquellos individuos que han permanecido en el lugar de residencia del enfermo por al menos 7 días consecutivos durante los tres meses previos al diagnóstico de tuberculosis del paciente. Este grupo es el segundo en importancia en la localización de casos, después de los sintomáticos respiratorios, y constituye además un grupo de alto riesgo en especial si son niños o jóvenes. A modo de ejemplo, se encuentra documentado que más de las 2/3 partes de los niños menores de 5 años enfermos de TB, fueron contagiados por un conviviente cercano (8-10).

En el momento del diagnóstico el paciente ya lleva varios meses infectando a sus contactos. Se estima que entre el 10 y 20 % de ellos están infectados y aproximadamente un 1 a 2 % mostrará evidencia de enfermedad. Por otra parte se considera que cada caso bacilífero produce entre 10 y 15 nuevas infecciones o reinfecciones, con un riesgo de desarrollo de enfermedad entre los infectados del 10 % en los 2 años posteriores a la infección, periodo durante el cual se producen el 80 % de los casos (10). Si los contactos se encuentran inmunodeprimidos existe un riesgo mucho mayor de aparición de la enfermedad y se estima en un 10% al año de la infección.

La pronta identificación, el estudio y el tratamiento, si fuera necesario, de las personas que tienen contacto con individuos infectados con *M. tuberculosis* y que están cursando la enfermedad activa ayudarían a cortar la cadena epidemiológica de esta patología.

Por otra parte, la existencia de trabajos donde se trata de relacionar la conversión del test de tuberculina cutáneo en personas que viven en estrecho contacto con individuos infectados con *M. tuberculosis* nos alerta sobre la importancia de conocer el perfil inmunológico de estos contactos que aún expuestos a la micobacteria logran una adecuada respuesta inmune y evitan así el desarrollo de la patología (8).

No puede dejar de mencionarse que como estrategia, la búsqueda activa de casos nuevos debería extenderse a comunidades enteras en riesgo, más que focalizarse en los casos de convivientes de personas enfermas individuales (11).

## **1.2. Características generales sobre la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis***

Una vez inhalado el bacilo, los macrófagos alveolares lo fagocitan y a menudo lo eliminan. Aquellos que pueden escapar a esta eliminación se multiplican y diseminan destruyendo a la célula que los fagocitó, mientras que los monocitos sanguíneos y otras células inflamatorias

son atraídas hacia el pulmón. Estos monocitos sanguíneos se diferencian en macrófagos (Mφs); una fracción de ellos podrá eventualmente destruir a la micobacteria, mientras que otra formará una simbiosis con el bacilo. En este estadio de la enfermedad, el tejido dañado es mínimo.

Tras 2 o 3 semanas de la inhalación de las micobacterias comienza a activarse la inmunidad mediada por células. Históricamente la inmunidad adaptativa ha sido dividida en inmunidad humoral, aquella que puede transferirse por la inoculación de anticuerpos de un donante inmunizado a un receptor, e inmunidad celular, la que puede adquirirse sólo cuando se transfieren células (linfocitos T) del donante inmunizado al receptor (12). Esta última es la que genera una protección eficaz durante la evolución de la Tuberculosis, donde los linfocitos T antígeno específico son reclutados, se activan, proliferan y dan comienzo a la fase efectora, conformando a nivel tisular una estructura denominada granuloma. Este proceso da lugar a la activación de los Mφs que ocupan el centro del granuloma con destrucción de la micobacteria intracelular. Una necrosis sólida central inhibe el crecimiento del patógeno extracelularmente y como resultado de estas acciones la infección se vuelve estacionaria, estadio que se conoce como latencia, esta situación puede durar meses, incluso años hasta que el control ejercido por el sistema inmune disminuye o falla y la infección puede reactivarse y/o diseminarse hacia otros sitios (13).

Las diferentes manifestaciones de esta patología reflejan el balance entre la virulencia del bacilo y los mecanismos de defensa del paciente, en los cuales la calidad de la respuesta inmune determinará su evolución (14).

### **1.2.1. Respuesta inmune innata contra *M. tuberculosis***

Hace 100 años Elias Metchnikov, resumió sus 25 años de experiencia estudiando la respuesta inmune frente a agentes infecciosos, focalizado en lo que él llamó respuesta natural, hoy conocida como innata, e identificó a las células fagocíticas como el constituyente central de dicha respuesta. A poco de producirse el descubrimiento de Metchnikov, se constató que la respuesta innata no sólo actúa como barrera contra microbios, sino que también determina la subsiguiente respuesta inmune adquirida (15). En nuestros días la respuesta inmune innata representa mucho más que la fagocitosis, comprende distintos tipos de células, que abarcan un amplio espectro de funciones y posee su propio sistema de receptores capaces de reconocer la presencia de patógenos (16).

El reconocimiento del *M. tuberculosis* o de los distintos productos micobacterianos se lleva a cabo por los receptores que expresan las células presentadoras de antígenos (CPA), entre ellas las fagocíticas mononucleares. Algunos receptores que pueden destacarse son: glicoproteínas tipo lectinas efectivas en el reconocimiento de estructuras con manosa, glucosa, N-acetilglucosamina y L-fucosa, entre otras; receptores “scavengers” o carroñeros; receptores para componentes del Sistema de Complemento, CD14. Los receptores transmembrana que incluyen la familia de los llamados Toll, o TLR.; los receptores intracelulares, citosólicos, representados por la familia RIG (RIG-1-like-receptors o RLR), que detectan en su interior, fundamentalmente virus; y otra familia de detectores llamados receptores NOD (NOD-like receptors, NLR), los cuales representan una larga familia de sensores intracelulares involucrados en la detección de señales provenientes de patógenos y también de situaciones de stress. Estas macromoléculas no sólo cumplen con su función específica de receptores del Sistema Inmune innato, sino que además activan los llamados inflamomas, complejos de estructuras proteicas inductores de procesos proteolíticos liderados por citocinas inflamatorias, hasta lograr la muerte celular por apoptosis (17).

Con respecto a los TLR, como ya se expresó, sus miembros son proteínas transmembrana con motivos conservados ricos en leucina en su dominio extracelular. El dominio intracelular es homólogo al dominio señalizador del receptor para la interleucina 1 (IL-1R) y una cinasa asociadas a IL-1R. El número de miembros de esta familia de receptores se ha incrementado considerablemente desde el descubrimiento de su participación en la inmunidad innata. Más aún los datos posteriores sugieren que estos receptores desempeñan un rol importante en la activación de las células inmunes por parte del *M. tuberculosis* a través de los TLR2 y TLR4. El heterodímero formado por el TLR tipo 1 y 2 reconoce lipoproteínas triaciladas derivadas de *M. tuberculosis* y la interacción con su ligando resulta en la activación de la transcripción del NF- $\kappa$ B para producir un aumento en la síntesis de citocinas inflamatorias como INF- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , entre otras (18). A pesar del gran incremento en cuanto a la información sobre la conformación y mecanismos de acción de estos receptores aún existen muchos interrogantes.

Con respecto a los receptores de tipo NOD, se sabe que reconocen péptidos muramilados y peptidoglicanos que pueden hallarse sobre la micobacteria. La activación de NOD 2 también media la respuesta inmune inflamatoria a través del NF- $\kappa$ B, sin embargo, en contraste con los TLRs, el receptor NOD 2 también puede activar al inflamoma (19),(20).

El procesamiento de los antígenos es esencial para que los linfocitos T puedan reconocer a aquellas células infectadas por microorganismos y este proceso celular está altamente regulado, culminando con la presentación antigénica en el contexto de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad: las de clase I expondrán péptidos microbianos para que sean reconocidos por los receptores específicos de los linfocitos CD4+ y los de clase dos por los linfocitos CD8+ (21).

Los macrófagos como fagocitos mononucleares y sus precursores, desempeñan un rol central en esta etapa de la respuesta contra micobacterias ya que son responsables de la interacción con las células de la respuesta inmune adaptativa (RI) y luego de interactuar con ellas se convierten en una de las células efectoras más importantes en la eliminación de estos patógenos intracelulares. Estas células cuentan con numerosos mecanismos especializados para la destrucción del bacilo, como ser la producción de reactivos tóxicos del nitrógeno y del oxígeno; la liberación de citocinas proinflamatorias como consecuencia del reconocimiento de patrones moleculares por parte de los receptores de tipo TOLL y NOD desencadenantes de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y el posterior incremento en la producción de los mencionados mediadores como así también la inducción de autofagia por parte del IFN- $\gamma$  y la vitamina D por nombrar sólo algunos (19). Una vez fagocitados, los patógenos inician el camino hacia la degradación, en un evento altamente regulado. En la primera etapa de la ingestión, el fagosoma se vuelve alcalino por un corto tiempo, antes de que comience la acidificación. El medio básico es óptimo para la actividad de las defensinas y de las proteínas básicas, mientras que el pH ácido lo es para las enzimas lisosomales. Estas enzimas son liberadas al fagosoma durante su maduración en forma de pulsos independientes, y su actividad es máxima en los estadios tardíos de este proceso (22). Como se mencionara, el *M. tuberculosis* es un patógeno de vida intracelular con la habilidad de persistir en el fagosoma temprano, arrojando su maduración e inhibiendo su fusión con el lisosoma, más aún el mencionado arresto no es completo y algunas bacterias pueden ser eliminadas o al menos evitar su replicación por medio de mecanismos antibacterianos los cuales incluyen las especies reactivas del Oxígeno (RIO) y especies reactivas del Nitrógeno (RIN) o la modulación del pH del fagosoma por parte de la proteína Nramp (23-25).

En la actualidad está ampliamente documentado que la totalidad de las actividades antimicobacterianas no se expresan constitutivamente, y que dependen entre otros factores de la correcta estimulación por parte de mediadores solubles llamados citocinas. La



elucidación de estos mecanismos facilitaría el conocimiento de los procesos por los cuales esta bacteria evade el microambiente hostil del fagolisosoma.

### **1.2.2. Activación de los Mφs**

Comparado con los sistemas murinos, es muy poco lo que se conoce acerca de la activación de macrófagos en humanos. Se ignoran las condiciones exactas para una activación óptima, sin embargo queda claro que el IFN- $\gamma$  como la presencia de ciertas citocinas pro-inflamatorias, esencialmente TNF- $\alpha$  juegan un papel fundamental en la adecuada resolución de esta enfermedad (14). Esta citocina actúa sinérgicamente con el INF- $\gamma$ , desplegando todos los mecanismos efectores de los Mφs, a la vez que desempeña una función esencial en la eliminación de las células infectadas: induce un proceso conocido como autofagia, donde la célula puede autodegradarse en forma controlada y además, por otro mecanismo, conduce al macrófago a una apoptosis mediada por óxido nítrico (NO) (26).

Otro mecanismo importante que se pone en marcha al activarse el macrófago es la síntesis de especies reactivas del nitrógeno por parte de la Oxido Nítrico sintasa inducible (iNOS) y del oxígeno por la enzima oxidasa dependiente de NADPH, ambas especies reactivas poseen potentes funciones microbicidas y pueden ser liberadas a los tejidos adyacentes causando junto a las enzimas lisosomales, destrucción del parénquima pulmonar (12,19).

A su vez los Mφs activados estimulan la síntesis de citocinas como IL-1, IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$  y quimiocinas, producen mediadores lipídicos de corta vida y también factores activadores de plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos, favorecedores del proceso inflamatorio.

### **1.2.3. Mecanismos efectores basados en intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno.**

Como se mencionó y a pesar de cierta controversia existente al respecto, se cree que la actividad antimicobacteriana de los macrófagos fundamentalmente se desarrolla a través de los RIO y los RIN. Los RIN desempeñan un papel fundamental en la defensa contra *M. tuberculosis* en macrófagos murinos, particularmente en aquellos estudios donde se utilizaron ratones *knockout* para el gen del IFN- $\gamma$ , además estudios empleando ratones sin el gen para la iNOS mostraron que los RIN eran esenciales para una actividad macrofágica que logre eliminar a la micobacteria, ya que esta enzima cataliza la reacción entre el oxígeno y el nitrógeno guanidínico de la L-arginina para producir NO. Por otro lado, los RIO son

necesarios pero insuficientes para destruir al *M. tuberculosis* (23). La síntesis de los RIO se inicia por la acción de la NADPH oxidasa, que es activada por el IFN- $\gamma$ , produciendo anión superóxido el cual es metabolizado por la superóxido dismutasa para generar peróxido de hidrógeno. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> es transformado en radicales de corta vida, que son poderosos oxidantes, generando daño en membranas, lípidos, proteínas y ADN. La toxicidad de este mecanismo de defensa puede aumentar por las interacciones entre los RIO y los RIN, dando lugar a la formación de peroxinitritos.

Se han detectado altos niveles de expresión de iNOS por inmunohistoquímica en macrófagos alveolares provenientes de individuos con tuberculosis pulmonar activa y conjuntamente con estas observaciones, se encontró un nivel de óxido nítrico exhalado incrementado en estos pacientes.

Mientras que las funciones efectoras relevantes de los RIN y de los RIO son ampliamente reconocidas, su contribución inmunorreguladora en la infección no lo es tanto. Se sabe que los reactivos del nitrógeno pueden alterar la producción de citocinas e inducir o prevenir la apoptosis de las células infectadas al controlar la actividad de las caspasas (27).

#### **1.2.4. Mediadores solubles: citocinas**

Existe una gran cantidad de células que al activarse son capaces de sintetizar y liberar una amplia variedad de pequeñas moléculas que pueden interactuar con otras células y regular en más o en menos su accionar, un gran número de ellas pertenecen al grupo de las citocinas.

Las citocinas son proteínas o péptidos, que pueden o no poseer moléculas de azúcar unidas a ellas. Conforman un gran grupo que incluyen a los interferones (IFNs), interleucinas (ILs), y varios factores estimulantes de colonia (del inglés *colony stimulating factors*, CFSs). También incluyen factores de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*, TNFs) y factores de crecimiento transformante (del inglés *transforming growth factors*, TGFs)(28).

La consecuencia principal de la interacción del *M. tuberculosis* con los TLRs de macrófagos y células dendríticas es la inducción de la secreción de citocinas y quimiocinas. Estas moléculas efectoras regulan la formación del granuloma y además influyen sobre el tipo de respuesta inmune adaptativa que se generará frente a la micobacteria. Entre las citocinas intervinientes se encuentran IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12, IL-18, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , entre otras (16,29,30). De lo expuesto se puede inferir que los mediadores liberados durante la

respuesta inmune contra el patógeno, influirían sobre el curso de la misma, hecho que se vería reflejado en la evolución clínica de la infección. Ya sea lográndose una contención de la misma, estado de latencia (TBL), o bien permitiendo el desarrollo de la enfermedad en sus distintas manifestaciones clínicas, principalmente pulmonares. Se acepta que las citocinas producidas por los linfocitos T colaboradores de tipo 1 (del inglés helper, Th1) como INF- $\gamma$  desempeñan un rol protector durante la infección, mientras que citocinas de tipo Th2 como la IL-4 y anti-inflamatorias y anti-proliferativas como IL-10 y TGF- $\beta$  favorecerían el desarrollo de la enfermedad (31).

Además de los mediadores mencionados, otros como IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, quimiocinas como IL-8 y factores estimulantes de colonias como el de granulocitos (G-CSF), intervienen en la defensa contra el *M. tuberculosis*.

#### **1.2.4.1. Interleucina-12, interleucina-15 e interleucina-18**

En el curso de una respuesta inmune efectiva contra el *M. tuberculosis*, la interacción de la CPA con la bacteria induce la síntesis de IL-12 e IL-18, tanto por parte de los macrófagos activados como de las células dendríticas, siendo la interleucina-12 el mediador principal en el condicionamiento de la subsecuente respuesta hacia un perfil Th1 (14). Sin embargo, tanto la IL-12 como la IL-18 favorecerían la activación de la inmunidad mediada por células, con aumento en la producción de IFN- $\gamma$  (32).

En el hombre se ha sugerido que el incremento de IL-12 es esencial para la generación de una respuesta inmune protectora, así como la expresión de su receptor en el sitio de infección (33,34)

Con respecto a IL-18, se observó que la producción de la citocina era menor en cultivos de células mononucleares de pacientes, estimuladas con *M. tuberculosis*, y que esta disminución estaba asociada a niveles reducidos de IFN- $\gamma$  en los mismos.

Otra citocina sintetizada principalmente por monocitos y macrófagos es la IL-15, que a su vez posee funciones biológicas redundantes con IL-2, mediador producido por los linfocitos T. Ambas citocinas inducen la proliferación y activación de las células citotóxicas naturales (NK), así como la expansión de células T, aunque en diferentes instancias; la liberación de IL-15 por las células presentadoras de antígenos es importante en la estimulación temprana de las células T favoreciendo la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2. Además es quimio atrayente de linfocitos T y potente inhibidor de la apoptosis (35). Con respecto al

receptor, ambas citocinas comparten las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , siendo la cadena  $\alpha$  la específica para cada una de ellas. La IL-15 estimula la proliferación de células T humanas de memoria CD4 y CD8 (CD45RO+) y CD8 (CD45RO) nativas, y no tiene efecto sobre las CD4 nativas (36). Su expresión se encuentra aumentada en el pulmón de los pacientes tuberculosos. El mismo efecto se puso de manifiesto en un modelo murino de TB primaria, sugiriendo que IL-15 intervendría en la patogenia de la TB activa (31).

#### **1.2.4.2. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

El IFN- $\gamma$  pertenece al grupo de interferones tipo II, es secretado por células inmunes: células T activadas, células citotóxicas naturales (NK) y macrófagos, en contraste con los interferones de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) los cuales son secretados por células infectadas por virus. Dentro de las principales actividades de este mediador podemos nombrar la activación de fagocitos mononucleares, la estimulación de la presentación antigénica y la regulación de distintas funciones celulares incluyendo proliferación, apoptosis y adhesión celular. Tal cantidad de funciones requieren de un programa de expresión génica sofisticado y complejo, asegurando que sus funciones inmunomoduladoras estén dirigidas solamente a los patógenos y no hacia células o tejidos del hospedador (37)

Con respecto a su origen, en una primera etapa, antes de que la respuesta inmune adaptativa se establezca completamente, las NK son las principales productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-12 e IL-18. Sin embargo los macrófagos pulmonares de ratones infectados podrían también producir esta citocina, al igual que las células T que expresan el receptor  $\gamma\delta$  así como las células T restringidas por la molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad, CD1. Durante el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, este mediador es sintetizado por células T CD4 y CD8 (14).

Como ya fue expresado previamente, el IFN- $\gamma$  es el activador por excelencia del macrófago, estimulando la síntesis de los RIO y RIN que se traduciría en un aumento de las funciones microbicidas de la célula y por otro lado una inducción del programa de muerte celular programada y autofagia de los macrófagos infectados (12,26)

#### **1.2.4.3. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  es una citocina que juega múltiples papeles en la respuesta inmune, interviniendo tanto en la resolución, vía de su sinergismo con el IFN- $\gamma$ , como en la exacerbación de esta

infección. El bacilo induce su secreción por parte de los macrófagos, células dendríticas y células T. Esta citocina influye en la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas y sus receptores, afectando la migración celular y la formación del granuloma. Experimentos con ratones *knockout* deficientes en el receptor I para TNF- $\alpha$  indican una patología más exacerbada, con una reacción granulomatogénica deficiente. Más aún, se ha observado que la neutralización de este mediador en aquellos animales que presentan tuberculosis en estado de latencia ha producido la reactivación de la misma y el desarrollo de la enfermedad. Estos hallazgos destacan que el TNF- $\alpha$  está especialmente involucrado en la formación del granuloma y la contención de la micobacteria. Con respecto a los seres humanos y al igual que lo observado en ratones de experimentación, cuando el TNF- $\alpha$  no está presente en concentraciones adecuadas, la respuesta granulomatosa es deficiente, formándose una estructura desorganizada con muy pocas células activadas. Lo que favorece la diseminación del bacilo con producción de focos de infección secundarios tanto en el pulmón, como así también en otros órganos (24).

#### **1.2.4.4. Interleucina-17, interleucina-23 e interleucina-27**

La familia de las interleucinas-17 está formada por mediadores proinflamatorios, siendo IL-17A la más estudiada. Además de esta isoforma se encuentran IL-17B, C, D y E, ésta última conocida como IL-25 (38).

La interleucina-17 A es secretada principalmente por una población de células T CD4+ que no posee los patrones típicos de secreción Th1 o Th2, ésta subpoblación celular se conoce como Th17 (39). Otras células no convencionales productoras de este mediador son los linfocitos T que expresan receptor del tipo  $\gamma\delta$  (40).

Como parte de sus funciones, la IL-17 recluta neutrófilos y actúa sobre los macrófagos favoreciendo su supervivencia, estimula la producción de citocinas proinflamatorias en una amplia variedad de células tanto inmunes como no inmunes. Estudios recientes señalan que este mediador podría también favorecer la producción de IL-2 por los linfocitos T CD4+ para producir IL-2, y de esta manera incrementar la proliferación tanto de los linfocitos T convencionales como de células T reguladoras (38).

La IL-23 es producida por células dendríticas, y macrófagos y depende de la activación por TLR-2. Sumado a ello, estas células pueden ser activadas por la IL-23 en forma directa, dando origen a la producción de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 (41).

Los trabajos de Giacomini y col. indican un aumento marcado y selectivo de este mediador por parte de monocitos infectados con *M. tuberculosis*, para, de esta manera, modular la subsecuente respuesta inflamatoria dependiente de células T, en función del balance entre las subpoblaciones Th1 además de las mencionadas Th17. Una de las funciones más importantes de la IL-23 es su habilidad para sostener las funciones de las células T  $\gamma\delta$  y la expansión de los clones de Th17, los cuales son componentes esenciales de una inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*, temprana y tardía respectivamente (42).

El rol de la IL-27 en el balance entre un estado patológico y una protección efectiva es muy interesante. La IL-27 induce la expresión del factor de transcripción Tbet de los linfocitos T CD4+, incrementando de esta manera la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las mencionadas células, hecho que se traduce en una protección efectiva, ya que como se mencionara, esta citocina es crucial en el control del *M. tuberculosis*, aunque las concentraciones elevadas de IFN- $\gamma$  pueden ser perjudiciales para la supervivencia de los linfocitos T CD4+ durante la infección micobacteriana, ya que puede alterar la susceptibilidad de estas células a las señales pro-apoptóticas (40,43).

La IL-27 induce además la producción de IL-10 por parte de los linfocitos T CD4+ y esto dependería del estado de activación de las células, ya que IL-27 actuaría primero induciendo Tbet y secretando IFN- $\gamma$  para luego aumentar IL-10 y así proteger a las células de los efectos perjudiciales del IFN- $\gamma$  (40).

#### **1.2.4.5. Interleucina-10 (IL-10)**

La IL-10, originalmente llamada “factor inhibidor de la síntesis de citocinas” es producida por numerosas células, incluyendo células T CD4+ y CD8+, monocitos y queratinocitos. Su rol como antiinflamatorio incluye la desactivación de las funciones de macrófagos a través de la regulación en menos de moléculas coestimuladoras (44). De hecho se considera a la IL-10 como una citocina inmunorreguladora que inhibe tanto la activación de los M $\phi$ s, como ya fuera descrito, y la respuesta inmune de tipo celular y la activación de las células dendríticas (45).

Es de esperar que durante la infección con *M. tuberculosis*, este mediador presente propiedades desactivadoras de la respuesta inmune, al interferir en la síntesis de IL-12 y así afectar la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de las células T. Se lo asocia con cuadros graves de Tuberculosis, sin embargo hay autores que sugieren que su presencia en fluidos pleurales de

pacientes con pleuritis tuberculosa tendría un rol preventivo a fin de evitar el daño tisular causado por una respuesta inmune exagerada (44).

En una publicación reciente Redford y col. proponen que la presencia de IL-10 se relacionaría con la habilidad del macrófago para evadir la respuesta inmune y como consecuencia mediar infecciones pulmonares prolongadas (46).

#### **1.2.4.6. Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

El TGF- $\beta$  es una citocina multifuncional que regula varios eventos en el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares. Se han encontrado receptores específicos para esta citocina sobre todas las células de mamíferos examinadas, pero el efecto que esta molécula ejerce sobre ellas varía dependiendo del tipo celular y las condiciones de crecimiento (47).

Se han descrito 5 isoformas de las cuales el TGF- $\beta$ 1 es la más estudiada (48,49). Su síntesis está finamente regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional, y la activación selectiva de su promotor por medio de distintos factores nucleares, en particular AP-1, es inducida en respuesta al estrés (50) y al mismo TGF- $\beta$ , aunque la autoinducción depende del estado de maduración de la célula (47,51).

El TGF- $\beta$  es secretado desde la célula como un complejo latente (LTGF- $\beta$ ) compuesto por una glicoproteína unida no covalentemente al dímero de TGF- $\beta$  biológicamente activo. La activación y liberación de esta citocina desde el complejo latente *in vivo* depende de una remoción enzimática, tal como se ha observado en macrófagos alveolares (47,52). *In vitro*, el TGF- $\beta$  es activado por un medio ácido (pH<2) y dado que el granuloma tuberculoso es rico en proteasas ácidas, podría ser particularmente favorable para la activación *in situ* del LTGF- $\beta$  (47).

Con respecto a los efectos inmunológicos de este mediador podemos citar la supresión de la respuesta de las células T; desactivación de macrófagos como así también su contribución a la inflamación, reparación y al daño tisular.

Esta citocina posee características únicas entre los mediadores endógenos, ya que es supresora de la inmunidad celular en múltiples niveles. El TGF- $\beta$  inhibe las funciones y la proliferación de linfocitos a concentraciones femtomolares y el tipo de célula o el estado de maduración de las células T es crítico para determinar la respuesta hacia esta citocina, ya que las células T de memoria maduras que estén activadas y encaminadas en el ciclo celular

son las más susceptibles a los efectos antiproliferativos. En contraste, las células T vírgenes son relativamente resistentes, e incluso esta citocina podría estimular distintos eventos de su maduración. Las células T CD4<sup>+</sup> son considerablemente más inhibidas por el TGF- $\beta$  que las T CD8<sup>+</sup> (47). El efecto predominante de esta molécula es la desregulación de la señal proliferativa mediada por IL-2 promoviendo el arresto y acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular, haciéndolas susceptibles a la apoptosis (53). Por otro lado, el TGF- $\beta$  está involucrado en: la desregulación de la expresión de HLA-DR (54), la disminución de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 por parte de los monocitos y en la inhibición de la síntesis de IFN- $\gamma$  por las células T activadas (52,55).

Las acciones de TGF- $\beta$  sobre macrófagos tisulares son generalmente supresoras y contribuyen a la resolución de una respuesta inflamatoria (52). La mencionada desactivación de éstas células ocurre tanto directa (inhibición en la producción de RIO y RIN), como indirectamente mediante su efecto sobre el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  (52,55).

Además de ejercer funciones inhibitoras sobre las poblaciones celulares ya mencionadas, el TGF- $\beta$  posee acciones quimiotácticas y anabólicas sobre los fibroblastos involucrados en la reparación tisular. Estimula la producción de componentes críticos de la matriz extracelular, tales como colágeno, fibronectina, y proteoglicanos, y por otro lado inhibe a enzimas proteolíticas las cuales destruyen el tejido conectivo recientemente formado, a la vez que desactiva la producción de peróxido de hidrógeno en macrófagos, perjudicial para los fibroblastos nacientes. El TGF- $\beta$ , es un mediador esencial para la formación del granuloma; sin embargo, una producción excesiva y sostenida de TGF- $\beta$  está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades asociadas a fibrosis y destrucción de tejidos, tales como fibrosis pulmonar y hepática (14,47).

Con respecto a su rol en tuberculosis, el *M. tuberculosis* induce la producción de TGF- $\beta$  por parte de monocitos y células dendríticas. En los pacientes con tuberculosis activa, estas células expresan constitutivamente TGF- $\beta$  y tienen una capacidad aumentada de producir dicha citocina cuando son estimulados *in vitro* con Ag micobacterianos (14,56). Además, los niveles de TGF- $\beta$  en plasma de pacientes con TB pulmonar son significativamente mayores que los presentes en convivientes sanos o tuberculosos tratados exitosamente (44). En correlación con ello, las CMP de pacientes con tuberculosis pulmonar severa, estimuladas



con *M. tuberculosis* sonificado, producen cantidades significativamente mayores de esta citocina respecto de las de los pacientes con TB moderada o leve, e individuos sanos (57).

Por otra parte, las evidencias provenientes tanto de humanos como de modelos animales indican que los pacientes o animales con tuberculosis pulmonar o pleural activa están suprimidos en su respuesta inmune mediada por células hacia Ag micobacterianos y que esta baja respuesta blastogénica de las células T, está relacionada con la severidad de la enfermedad. La supresión de TGF- $\beta$  con Ac anti-TGF- $\beta$  o por medio de sus inhibidores naturales, corrige la baja respuesta de las células T inducida por *M. tuberculosis* (58,59). Un estudio reciente en un modelo animal de TB pleural, mostró niveles aumentados de TNF- $\alpha$  cuando eran tratados con Anticuerpos anti-TGF- $\beta$  (58).

Además, los sobrenadantes de cultivos de monocitos de pacientes tuberculosos son capaces de suprimir la producción inducida por PPD de IFN- $\gamma$  e IL-2 por parte de células T de sujetos sanos. Esto indica que el TGF- $\beta$  producido por monocitos de pacientes tuberculosos se halla en su forma bioactiva, sugiriendo que los monocitos están equipados para activar TGF- $\beta$  (47).

Por otro lado como ya se mencionó la producción excesiva de esta citocina está asociada con la fibrosis y el daño tisular observados en esta patología (14,47).

#### **1.2.4.7. Otras interleucinas de relevancia**

Durante la infección micobacteriana también aumentan los niveles de otras citocinas como IL-4, su función es contradictoria ya que estimularía o inhibiría el crecimiento intracelular de la micobacteria, si el tratamiento con la misma se efectúa antes o después de la infección experimental. A su vez favorece el influjo de monocitos *in vivo* y la formación de células gigantes multinucleadas *in vitro*, hechos que contribuirían a la formación y estabilización del granuloma (60). Sin embargo no puede dejar de mencionarse el efecto inhibitorio que ejerce sobre la síntesis de IFN- $\gamma$ , y la importante síntesis de esta citocina en los pacientes con TB activa. La IL-4d, una de las isoformas existentes como resultado del splicing alternativo del gen de la IL-4 muestra funciones antagónicas a IL-4, su presencia y se correlacionaría con una mayor protección de los efectos nocivos de esta patología (61).

La IL-6, es una citocina multifuncional y pleiotrópica que además de favorecer el reclutamiento leucocitario y de promover el proceso inflamatorio, induciría actividades antimicobacterianas; Sin embargo, altos niveles y sostenidos en el tiempo de IL-6 podrían

tener efectos inmunosupresores, tanto sobre los Mφs infectados como sobre otras CPAs, al inhibir la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y también afectar la activación de células T (62,63).

### 1.2.5. Células T en la respuesta inmune antituberculosa

La tuberculosis es un clásico ejemplo de una patología en la cual la respuesta protectora está sostenida mayoritariamente por la inmunidad mediada por células.

Dentro de la población de células T se pueden distinguir distintos fenotipos

- Linfocitos T CD4+ que reconocen péptidos antigénicos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
- Linfocitos T CD8+ que reconocen péptidos antigénicos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
- Linfocitos T  $\gamma\delta$  capaces de reconocer ligandos antigénicos inusuales, en especial fosfoligandos y de forma totalmente independiente de moléculas de presentación especializadas
- Linfocitos T restringidos por moléculas CD1 que reconocen glicolípidos, estos últimos muy abundantes en la pared de la micobacteria.

Los fenotipos celulares arriba mencionados varían en su capacidad de activación de acuerdo al estadio de la infección, esencialmente en su habilidad para ingresar a los sitios de infección activa como: granulomas, nódulos linfáticos, etc.

La función efectora principal de los linfocitos T CD4+ es la producción de citocinas para activar a distintas poblaciones celulares, entre ellas los Mφs. Estos linfocitos, llamados también colaboradores se subdividen en subpoblaciones, según el tipo de citocina secretada. A modo de ejemplo, el IFN- $\gamma$  es secretado por la población Th1 mientras que IL-4, IL-5, IL-13 lo son por las células Th2. Datos recientes señalan que la subpoblación Th17, la cual estaría con el estado de latencia en la infección humana, también se hallaría involucrada en la cronicidad de esta patología (64).

Existen numerosos estudios relacionados con el patrón de citocinas que secretan las células T y su efecto sobre el curso de distintas patologías (65).

Debido a la localización intrafagosomal de la micobacteria, es esencial la participación de la célula CD8+ en la destrucción tanto del Mφ infectado como del patógeno, en este caso la muerte bacteriana se llevaría a cabo sólo a través de la liberación de perforinas y granzimas.

Las células CD8+, además son responsables (aunque en menor medida que los CD4+), de la secreción de IFN- $\gamma$ .

Como se comentó anteriormente los linfocitos CD4+ y CD8+ representan la mayor parte de la población de linfocitos T, pero a su vez existen poblaciones menores que participarían en la destrucción de las micobacterias, tales como: linfocitos T CD4- CD8-, T  $\gamma\delta$  y NK (66).

Al igual que los linfocitos T CD4+, las células T  $\gamma\delta$  participarían en la contención de la infección micobacteriana, como lo sugiere su presencia en el sitio de la lesión pulmonar. Asimismo se ha demostrado que los individuos sensibilizados con antígenos micobacterianos presentan un aumento en la activación de estas células respecto de los no sensibilizados (67).

La actividad lítica de los linfocitos T CD4+ y los CD8+ con receptor  $\alpha\beta$  disminuye gradualmente a medida que aumenta la severidad de la enfermedad tuberculosa, mientras que la de las células T  $\gamma\delta$  se incrementa, eliminando células infectadas con el Mtb a través del mecanismo Fas-FasL y de la ruta de la perforina/granzima (68).

Por otra parte, las células T  $\gamma\delta$  producen IL-17 durante la infección temprana, la cual promueve el flujo de células hacia los sitios de infección. Esta secreción de IL-17 puede ser producida en respuesta a la IL-23 secretada por células dendríticas infectadas con el *M. tuberculosis* (69).

Por último, estas células también se comportan como CPA. Al igual que las células dendríticas, pueden procesar y presentar Ag, y proveer las señales coestimuladoras necesarias para inducir la proliferación de los LT  $\alpha\beta$  (70).

La célula T menos común en la respuesta antituberculosa corresponde a los linfocitos T restringidos por moléculas de CD1.

En el humano estas células también se conocen como doble negativas porque no expresan CD4 ni CD8. La molécula de CD1 es una molécula no clásica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad asociada a  $\beta 2$  microglobulina que puede ser inducida por citocinas y antígenos lipídicos polares como ácido micólico o fosfatidil-inositol-manósidos presentes en la pared micobacteriana. Estas células secretan IFN- $\gamma$  y son citotóxicas para los macrófagos infectados (67). De lo expresado se desprende que en la infección por *M. tuberculosis* las células T  $\gamma\delta$  y las T CD1 operarían de nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (21).

### 1.2.6. El rol de la apoptosis

El estudio de la muerte celular programada o apoptosis data de principios del siglo pasado, cuando los científicos estaban maravillados con la morfología de las células muriendo (71).

La apoptosis es un tipo de muerte celular fisiológica, regulada a través de un programa genético, que se da como respuesta a un reloj interno o a estímulos externos. A este proceso hay que diferenciarlo de la necrosis, que ocurre como resultado de una injuria celular y no está controlada genéticamente (72).

Numerosos estudios han demostrado que el proceso de apoptosis representa una forma de suicidio celular, en el cual las células predestinadas a morir inician su propia muerte a través de la activación de un programa codificado internamente que se ha conservado invariable a lo largo de la evolución (73).

La regulación del balance entre proliferación y muerte celular es esencial para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares.

En el contexto de una respuesta inmune los mecanismos de apoptosis desempeñan papeles fundamentales en eventos claves como, la selección de linfocitos durante su maduración, inducción de una respuesta citotóxica efectora y mantenimiento de la homeostasis a nivel periférico luego de haberse llevado a cabo la respuesta inmune específica (74).

Este tipo de muerte celular es llevado cabo por la activación de cisteín-proteasas endógenas, llamadas caspasas, que rompen enlaces peptídicos en proteínas después del aspartato (Asp) y, que se expresan como precursores inactivos (zimógenos) que sólo se vuelven activos luego de un clivaje proteolítico.

A su vez las caspasas se clasifican en Iniciadoras (caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 y -13), con prodominios que contienen motivos estructurales tales como dominios DED o dominios de reclutamiento de caspasas (CARD, del Inglés *caspase recruitment domain*), y permiten la unión de sus activadores específicos. (73,75),(76) y caspasas efectoras (caspasa-3, -6, -7 y -14) que presentan prodominios pequeños. Las primeras pueden activarse a sí mismas (autocatálisis) como también a las caspasas efectoras. Puesto que la mayoría de estas proteasas tienen la habilidad de catalizar la activación de otros miembros de la familia, la resultante es la amplificación de la cascada proteolítica.

Los blancos de estas enzimas son dos grupos importantes de proteínas: proteínas reguladoras, y proteínas estructurales y de mantenimiento. La proteólisis de las proteínas reguladoras refuerza la activación apoptótica, mientras que el clivaje de las proteínas del

segundo grupo resulta en la desintegración celular. Se han identificado sustratos de las caspasas que incluyen proteínas involucradas en la reparación del ADN, en el control del ciclo celular y en el mantenimiento de la integridad estructural de la célula (75).

Como resultado de la activación de las caspasas, se altera la integridad del citoesqueleto y se produce una condensación importante tanto del núcleo como del citoplasma con disminución del tamaño celular. La membrana plasmática comienza a formar ampollas, lo cual lleva a la pérdida de la asimetría de los lípidos que la componen; por ejemplo, la fosfatidilserina (PS), que habitualmente se encuentra distribuida en la cara interna de la membrana y es translocada hacia la cara externa.

También se producen cambios característicos dentro del núcleo, el que se vuelve picnótico. La cromatina se dirige hacia la periferia dando la imagen de un halo creciente. Dado que se activan endonucleasas que clivan el ADN genómico en fragmentos oligonucleosómicos múltiples de 180-200 pares de bases, éstos pueden evidenciarse por electroforesis en gel de agarosa como el típico patrón de bandas en forma de escalera. La cuantificación de los eventos hipodiploides por citometría de flujo es otra manera de identificar este proceso.

Asimismo hay deterioro de la función mitocondrial, con liberación del citocromo c desde el espacio intermembrana al citosol y pérdida del potencial de membrana (73,74,77-79)

A medida que el fenómeno progresa la célula se fracciona en pequeños cuerpos apoptóticos formados por fragmentos citoplasmáticos y nucleares recubiertos de membrana, los cuales son rápidamente reconocidos y fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear. De esta manera, se produce un silenciamiento del evento de muerte impidiendo el desarrollo del proceso inflamatorio.

#### **1.2.6.1. Señalización y regulación del proceso apoptótico**

La muerte celular programada puede ser estimulada o inhibida por diferentes señales o moléculas, las citocinas, proteínas pertenecientes al ciclo celular como por ejemplo P53 o las mismas caspasas antes descritas. Cada uno de estos reguladores desempeña un rol específico dentro de la cascada apoptótica y es así como el balance entre factores pro y anti apoptóticos condiciona el resultado final de este proceso.

Dentro de los factores pro-apoptóticos podemos mencionar al TNF- $\alpha$ , citocina liberada durante la respuesta inflamatoria, su acción se inicia mediante la unión del ligando con el receptor, el cual puede ser TNF-R1, TNF-R2 y CD95 (Fas) entre otros. Estos receptores

poseen una región estructuralmente homóloga en su dominio intracelular llamada dominio de muerte (DD, del Inglés *death domain*). Luego de la unión a sus correspondientes ligandos, estos receptores forman complejos homotriméricos y reclutan proteínas adaptadoras por medio de interacciones homofílicas entre los dominios DD. En el caso del receptor para TNF (TNFR) la proteína adaptadora es TRADD (del Inglés *TNF-associated death domain protein*), mientras que Fas interactúa con FADD (del Inglés *Fas-associated death domain protein*). A su vez, en el caso del receptor TNFR, la vía de señalización se encuentra ligada a los eventos desencadenados por Fas a través de la interacción de TRADD con FADD. Esta última tiene una secuencia específica llamada dominio efector de la muerte (DED, del Inglés *death effector domain*) que interacciona de manera homofílica con dominios DED localizados en enzimas apoptóticas, tales como la caspasa-8, resultando en la iniciación de la cascada apoptótica (75,79,80).

La activación de la caspasa-8 tiene diferentes efectos según el tipo celular; en determinadas células resulta en la activación directa de otras caspasas (por ejemplo, la caspasa-3), mientras que en otras conduce a la activación de la vía de muerte mitocondrial, dependiente de caspasa-9. Como ejemplo de este accionar, podemos mencionar la inducción de apoptosis en células epiteliales pulmonares a través de la activación del TNF-R1 por su ligando específico TNF- $\alpha$ .

Al mencionar los factores pro-apoptóticos no podemos dejar de lado al ligando de Fas (FasL), molécula biológicamente activa que también pertenece a la familia de TNF, es expresado por células T activadas, neutrófilos y monocitos en respuesta a estímulos fisiológicos (79).

Además de los mencionados, también se da otro mecanismo apoptótico vía de señales extracelulares como resultado de la activación de linfocitos citotóxicos, por la liberación del contenido de gránulos compuestos por perforina, involucrada en la formación de poros, y granzimas. Como ejemplo la granzima B, es una serina-proteasa que escinde uniones peptídicas luego de Asp. La perforina se ensambla en membranas de la célula blanco y permite la entrada de granzima B. Una vez adentro, ésta activa a las caspasas-3 y -8 requeridas para la muerte celular. También es capaz de inducir la apoptosis por activación de la vía mitocondrial.

Los factores hasta aquí descritos provienen todos del exterior celular pero existen señales intracelulares capaces de desencadenar el proceso de apoptosis (estímulos de estrés y disturbios metabólicos) a través de la vía de señalización mitocondrial. Como ejemplos se

encuentran la muerte celular causada por drogas, toxinas, calor, radiación, hipoxia e infecciones virales y bacterianas (75).

Estas señales inducen la liberación de proteínas como el citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria, el cual activa a la proteína adaptadora Apaf-1 (del Inglés, *apoptotic protease activating factor-1*), la cual a su vez recluta a la caspasa-9 para formar el apoptosoma, que activa a la caspasa 3 e inicia la cascada proteolítica de muerte.

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es un evento crítico en esta ruta, y es mediada por proteínas de la familia Bcl-2. Un subgrupo de esta familia que incluye a las moléculas Bax y Bak se activa y actúa promoviendo la permeabilización de la membrana. Los efectos proapoptóticos de estas proteínas son antagonizados por el subgrupo antiapoptótico de la familia que incluye a Bcl-2 y Bcl-xL, entre otras (79).

#### **1.2.6.2. Apoptosis en el contexto del Sistema Inmune**

A fin de controlar el curso de una respuesta inmune existen situaciones que pueden desencadenar la apoptosis de linfocitos T. Si bien estos datos se han obtenido de experimentos realizados con células T, es probable que los principios generales de estas vías sean aplicables a todos los linfocitos (81).

##### **1.2.6.2.1. Muerte Celular Pasiva.**

Mediante este mecanismo las células T que fueron expandidas por un estímulo antigénico son eliminadas en ausencia de ese estímulo. La muerte pasiva de las células T, por privación de citocinas o factores de crecimiento, permite eliminar células T que se encuentran en exceso y ocurre en condiciones en las que los niveles de IL-2 y de Ag son bajos, tal como se evidencia en el desenlace de una respuesta inmune. La apoptosis pasiva cursa a través de la vía de señalización mitocondrial, requiere la síntesis de nuevas proteínas, y la inhibición de Bcl-2 y de moléculas relacionadas (81).

##### **1.2.6.2.2. Muerte Celular Inducida por Activación (MCIA).**

A través de este mecanismo las células linfoides activadas en forma sostenida y repetida inician una muerte activa donde se destruyen a sí mismas (suicidio) o entre sí (fratricidio). En este caso, la apoptosis de las células T involucra la secreción activa de IL-2, de acuerdo con los niveles de Ag en el microambiente inmune local. La muerte activa de las células T inducida por el Ag limita la respuesta inmune en condiciones de altos niveles de IL-2 y Ag.

Paradójicamente, IL-2 iniciadora de la progresión en el ciclo celular de las células T puede conducir a estas células a la apoptosis. En una respuesta temprana, cuando la concentración de IL-2 es baja, el efecto proliferativo es dominante; pero cuando la citocina se acumula y se manifiestan otros estímulos, la IL-2 puede actuar favoreciendo la finalización de la respuesta para preservar la homeostasis en la población de linfocitos T. Las vías de inducción de la MCIa más conocidas son las dadas por la interacción de FasL y TNF- $\alpha$  con sus respectivos receptores (81,82).

Otro factor regulador de la muerte de linfocitos activados es el IFN- $\gamma$ , al cual se le atribuye un papel crítico en la muerte de los LTCD4+. A pesar que el IFN- $\gamma$  producido por linfocitos Th1 y células NK es importante para la defensa contra numerosos patógenos, estudios recientes demuestran que esta citocina puede inducir genes, factores regulatorios y moléculas que a su vez inducen la apoptosis de linfocitos. Entre las moléculas de la apoptosis inducida por IFN- $\gamma$  se encuentran Fas y FasL (83,83,84).

En los años recientes se han registrado una serie de trabajos los cuales apuntan a la apoptosis de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, dependiente tanto de factores bacterianos como de aquellos pertenecientes a las células fagocíticas.

Distintos autores han demostrado la presencia de apoptosis en granulomas; la misma tiene lugar en granulomas productivos con o sin caseum, pero este proceso no ocurre en granulomas regresivos. La formación de caseum esta fuertemente asociada al proceso apoptótico y tanto los macrófagos CD68+ como las células T CD3+, CD45RO sobrellevan la muerte celular programada en esta instancia (85).

Se han realizado numerosos estudios relativos al papel de la apoptosis en la patogénesis de la tuberculosis, con resultados contradictorios, ya que tanto en humanos como en ratones se ha detectado la apoptosis de linfocitos T en presencia de antígenos micobacterianos (83,83,86,86,87), también se ha observado que el bacilo inhibiría la apoptosis de las células infectadas a través de distintos mecanismos (88,89). Sin embargo la presencia de caseum se encuentra asociada tanto a la apoptosis de linfocitos T como de M $\phi$ s (85).

Por lo expresado, permanece poco claro si la muerte celular inducida por bacterias intracelulares es un medio para eliminar una primera defensa del huésped o si es una manera que posee el huésped de desequilibrar el hábitat del patógeno.



### 1.2.6.3. Apoptosis inducida por Glucocorticoides.

Desde hace tiempo se sabe que los GC regulan al SI a través de la inducción de la apoptosis de células del linaje linfoide. Este tipo de modulación ocurre tanto en timocitos, como en LTCD4+ y LTCD8+ maduros (90,91). La apoptosis de los timocitos inducida por GC se utiliza con frecuencia como un modelo de estudio, ya que muestra la ruta de muerte celular mediada por la vía mitocondrial.

Por otro lado, estudios *in vitro* analizando la acción de los GC sobre la supervivencia de líneas celulares derivadas de tumores, revelaron una dependencia marcada entre la sensibilidad a la apoptosis inducida por la hormona y la fase del ciclo celular en la cual se encontraban las células. Así, éstas se volvían sensibles a la apoptosis inducida por GC cuando se producía un arresto del ciclo celular en fase G0/G1, mientras que eran resistentes al tratamiento cuando se encontraban en fase G2/M (92-94). Este comportamiento también se observó con CMP murinas y humanas activadas por el mitógeno Concanavalina A (ConA) (95).

## 1.3. Interacciones Neuro-Inmuno-Endócrinas

El campo interdisciplinario de la neuro-inmuno-endocrinología ha crecido explosivamente durante los últimos 20 años, confirmando que el sistema inmune no es enteramente autónomo y que la mayoría de sus funciones están sujetas a algún grado de control por parte del sistema nervioso central (SNC)(96-98).

En nuestros días podemos afirmar que el sistema neuroendócrino y el Inmune hablan un lenguaje bioquímico común y se comunican por medio de un circuito bidireccional. El descubrimiento de neuropéptidos o de receptores para neurotransmisores en leucocitos y de receptores para citocinas en células nerviosas y neuroendócrinas permitieron comenzar a explicar observaciones realizadas en el campo de la psiconeuroinmunología (99).

Además distintos autores han comprobado que existe una regulación recíproca entre ambos sistemas, ya que una respuesta neuroendócrina podría ser inducida por productos de la activación del SI (100). Como se mencionó, la regulación neuroendócrina de los distintos pasos de las respuestas inflamatoria e inmune requieren de un activo intercambio de señales entre las células del SI y los mecanismos bajo el control del cerebro. Este intercambio de información es esencialmente relevante en condiciones patológicas donde distintas funciones orgánicas están alteradas y es de esperarse que el SI opere eficientemente.

Existe un gran número de moléculas en el cerebro (hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores, citocinas) que interactúan con linfocitos, macrófagos, células epiteliales y células dendríticas, a través de receptores específicos; por otro lado los linfocitos T y B, monocitos/macrófagos, células NK, y granulocitos poseen receptores para epinefrina, dopamina, acetilcolina, prostaglandinas, somatostatina, prolactina, hormona de crecimiento, corticosterona, testosterona, factor liberador de corticotrofina, y adenocorticotrofina, entre otros. Es así como la interacción entre factores neuroendócrinos y las células antes mencionadas pueden alterar la actividad de las mismas, a través de una variedad de segundos mensajeros como cAMP y cGMP (100).

Dentro de las vías de comunicación entre el SNC y el SI podemos mencionar la vía noradrenérgica, la dopaminérgica, la peptidérgica, la colinérgica y el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA); siendo ésta última una de las más estudiadas.

### **1.3.1. El eje HPA**

Los componentes más importantes del eje HPA son: el núcleo paraventricular del hipotálamo, la glándula pituitaria anterior, localizada en la base del cerebro, y las glándulas suprarrenales.

El núcleo paraventricular del hipotálamo es responsable de la integración y regulación de una variedad de funciones neuroendócrinas y autonómica. Se demostró en ratas con el núcleo paraventricular lesionado la supresión inducida por shock en la proliferación de linfocitos de sangre periférica y la inhibición parcial en la elevación de corticosterona plasmática, asignándole un rol directo sobre la función de linfocitos durante el estrés (100).

El núcleo paraventricular secreta la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la cual estimula, en la hipófisis, la liberación al torrente sanguíneo de la hormona adenocorticotrofina (ACTH). La ACTH actúa sobre las glándulas suprarrenales estimulando la expresión y posterior liberación de glucocorticoides, aldosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), 17  $\beta$ -estradiol y progesterona entre otras hormonas.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente las citocinas pueden actuar sobre células del SNC; por ejemplo, los trabajos de Besedovsky y col. fueron los primeros en proveer evidencia sólida sobre el efecto de la IL-1 en la producción de GC a través de la estimulación del eje HPA (101-103). Otras citocinas que pueden influir sobre el eje son: IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Además de su origen periférico las citocinas también pueden ser sintetizadas en el

cerebro por astrocitos, microglías, células del endotelio vascular de la meninge y probablemente neuronas, al igual que sus receptores. Las citocinas proinflamatorias del cerebro son capaces de modular las actividades del sistema nervioso simpático así como las del eje HPA.

### **1.3.2. Los GC y su función inmunológica**

Como se ha planteado previamente, la activación del eje HPA resulta en el aumento de GC. Este compuesto pertenece al grupo de hormonas esteroideas y a través de la interacción con su receptor citoplasmático regula la transcripción de un gran número genes en distintos tipos celulares (104).

En el hombre el GC circulante más importante es el Cortisol que en condiciones normales desempeña un papel regulador esencial en el metabolismo de la glucosa y la conservación de energía. Bajo condiciones de estrés, esta molécula presenta múltiples efectos adaptativos tanto a nivel cardiovascular como inmunológico y frente a estas situaciones favorecería la liberación de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 e IL-6.

Las concentraciones farmacológicas de GC ejercen efectos inmunosupresores, mientras que las concentraciones fisiológicas podrían ejercer efectos inmunomoduladores, inmunoestimulantes, o inmunosupresores.

#### **1.3.2.1. Modo de acción de los GC**

Esta hormona se une a receptores intracelulares que existen acomplexados a proteínas de estrés térmico (hsp) de 90 kDa y otras proteínas de menor peso molecular. El complejo GC-receptor se disocia de las proteínas hsp90, y se produce la dimerización entre dos complejos. Este dímero puede luego interactuar con elementos de respuesta a GC que están involucrados en la regulación de la expresión de numerosos genes, incluyendo aquellos implicados en la regulación de la inflamación y la inmunidad (105).

Sin embargo, este mecanismo tan simple se ve complicado por otros factores, ya que además de interactuar con sitios específicos de respuesta a GC (GREs), el complejo receptor-hormona puede modificar las funciones de factores de transcripción como AP-1, NFκB y JAK-STAT, siendo estos últimos muy importantes en la respuesta inmune(105-107).

La represión de la expresión de aquellos genes que dependen del NFκB es un componente significativo de la inmunosupresión observada ante el Gc; en linfocitos y monocitos esto

puede deberse en parte por la regulación en más del inhibidor del factor de transcripción NFκB ; el IκB.

Dado que la vía de acción de los GC interacciona con otras vías y factores de transcripción no es sorprendente que los efectos de esta hormona puedan ser profundamente modificados, o aún revertidos por agonistas que activan estas otras vías (108).

### 1.3.2.2. Receptores de GC

El “*splicing*” alternativo del transcripto primario del receptor para GC humano (hGR) produce dos isoformas: hGR $\alpha$  y hGR $\beta$ . La isoforma  $\alpha$  es la activa, mientras que la isoforma  $\beta$  puede inhibir la activación de ciertos genes inducidos por la isoforma  $\alpha$ , por ello se le reconoce el rol de modulador fisiológico.

Esta situación se complica por la existencia de un segundo tipo de receptor de GC endógeno. Esta hormona puede unirse a un receptor de tipo I, usualmente conocido como receptor de mineralocorticoide MR.

En individuos normales existe un ritmo diurno en la producción de Cortisol circulante. En humanos el nivel tiene un máximo en la mañana y luego declina a través del día. Debido a que el Cortisol presenta una afinidad 10 veces mayor por el MR que por el GR, este ritmo se traduce en la ocupación del GR y MR durante la mañana y solo del MR durante la tarde-noche. Los linfocitos T expresan solo GR por lo tanto alternan entre un estado de modulación debida al Cortisol y un estado de no modulación en cada ciclo de 24 horas.

Hay evidencia que este ciclo fisiológico es suficiente para causar una variación cíclica en la función de los linfocitos humanos. Por ejemplo, la liberación de IFN- $\gamma$  en respuesta al toxoide tetánico o PPD, y su respuesta proliferativa, ambos muestran una correlación inversa con los niveles plasmáticos de Cortisol (109).

Si el ritmo diurno del Cortisol es un reloj importante que afecta las células T y la función macrofágica, estos cambios deberían tener efectos profundos sobre el sistema inmune. Se han documentado anormalidades del ritmo en numerosas situaciones donde hay cambios en la función del sistema inmune: depresión severa, estrés, e infecciones crónicas. El ritmo diurno de Cortisol se pierde durante el estrés agudo como así también durante infecciones crónicas (109).

### **1.3.2.3. Regulación del metabolismo del Cortisol en la periferia**

La concentración local de Cortisol en cualquier célula o tejido no depende únicamente de la concentración que llega a ese tejido. En la mayoría de los mismos existe una regulación de las concentraciones locales para cubrir sus necesidades particulares.

Claramente, las diferencias en el número de receptores, o afinidad, o en las vías de señalización pueden alterar la sensibilidad local de células individuales como se discutió anteriormente, pero la habilidad de catabolizar el Cortisol es otro factor muy importante a tener en cuenta.

La enzima que localmente ajusta la concentración del Cortisol por interconversión reversible del Cortisol activo o cortisona inactiva, ha sido el blanco de atención de los endocrinólogos, nefrólogos y fisiólogos interesados en la regulación de los niveles del GC. En los tubos colectores de los riñones la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (11 $\beta$ HSD2) convierte el Cortisol en Cortisona inactiva, y se interrumpe la unión del GC con el MR. Esto permite que las funciones desencadenadas a partir del receptor de mineralocorticoide sean casi exclusivamente por aldosterona, aunque esta hormona se encuentre presente en niveles más bajos.

En individuos normales la 11 $\beta$ HSD de tipo 1, una oxidoreductasa reversible, está presente esencialmente en todos los tejidos, convirtiendo Cortisona nuevamente en Cortisol (110).

### **1.3.2.4. Función inmunológica de los GCs**

La potente acción de los GCs como inhibidores de diversas respuestas inflamatorias ha garantizado su extendido uso como agente terapéutico. Este efecto antiinflamatorio e inmunosupresor se basa en los diversos mecanismos moleculares mencionados anteriormente.

También se ha reportado la inhibición de la síntesis de citocinas y mediadores pro-inflamatorios a través de retroalimentación negativa (110). Una hiperactividad del eje HPA y la consecuente liberación de GC en ausencia de inflamación, como ocurre en el síndrome de Cushing, causa inmunosupresión e incrementa la susceptibilidad de estas personas hacia infecciones. Dolores físicos, traumas emocionales y restricciones calóricas pueden activar el eje y causar también inmunosupresión.

Por otro lado una disminución en sus niveles puede ser causa de patologías, como ocurre en pacientes con enfermedad de Addison que requieren suplementos de GC durante el curso de infecciones e inflamación para prevenir el efecto tóxico de las citocinas (110).

Dentro de las numerosas funciones inmunomoduladoras de los GCs se ha observado que sesga el balance de la respuesta inmune hacia la inmunidad humoral, ya que en cultivos de linfocitos humanos estimulados con IL-4 favorecería la producción de inmunoglobulinas, así como la proliferación de linfocitos B.

Es un regulador negativo de la síntesis de distintas citocinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-16, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , etc., y a su vez un inhibidor del sistema fagocítico mononuclear. A nivel de la respuesta inmune celular disminuye la proliferación de los linfocitos T secretores de IL-2 e IFN- $\gamma$ , favoreciendo el perfil de citocinas Th2 (111-114).

#### **1.3.2.5. Efectos del GC sobre la función de las células T**

El efecto global de niveles fisiológicos altos de GC, como los inducidos por el estrés, es dirigir la respuesta inmune hacia un perfil de secreción de citocinas del tipo Th2, esto significa que células T secreten IL-4, IL-5 e IL-13 y que disminuyan la secreción de IFN- $\gamma$ . Un ejemplo es la demostración que el GC más IL-4 incrementan sinérgicamente la producción de IgE en cultivos de CMP aunque no se conoce si estos efectos son consecuencia de una acción directa sobre los linfocitos T o sobre células accesorias como macrófagos y células dendríticas. También el GC inhibiría la producción de IL-12 por parte de los macrófagos pero aumentaría la de IL-10 (115).

#### **1.3.3. Otro regulador de importancia: la dehidroepiandrosterona (DHEA).**

La dehidroepiandrosterona es un andrógeno sintetizado a partir de colesterol que a través de varias reacciones enzimáticas es ingresado a la mitocondria y transformado en la mencionada hormona, principalmente en la zona *reticulata* de la glándula suprarrenal. Existen numerosos factores endógenos que pueden influir en su síntesis, siendo los más comunes la CRH, la ACTH, factores de crecimiento y citocinas.

La DHEA es intermediario en la biosíntesis de hormonas como testosterona y estradiol.

Circula en sangre principalmente como éster conjugado, bajo la forma de sulfato o prohormona y como hormona activa sólo se la puede encontrar en tejidos que expresen sulfatasa, enzima distribuida heterogéneamente en los órganos linfoides (116,117).

Los niveles de DHEA en el suero tienen un ritmo circadiano y disminuyen a lo largo de la vida del individuo (118). Su secreción se produce de una forma pulsátil, incrementando tanto en frecuencia como en amplitud durante la noche (116,119).

La dexametasona decrece la secreción adrenal de DHEA y Cortisol, sin embargo pudo observarse una disociación en la liberación de las mismas. Esta disociación también se hizo evidente en pacientes con síndrome de Cushing, y falla coronaria crónica.

La mayor proporción de DHEA plasmática se la encuentra sulfatada y circula como DHEA-S. La secreción de esta última también se da a nivel adrenal en respuesta a la ACTH. Sin embargo esta forma muestra variaciones diurnas muy limitadas, especialmente en adultos jóvenes. La falta de variación en sus concentraciones diurnas se debe a que se secreta en gran cantidad en plasma, posee una vida media muy larga y menor *clearance* que la DHEA (117).

Las vías de metabolización de esta hormona difieren con respecto al sexo y a su vez se modifican conforme avanza la vida del individuo, siendo los niveles séricos tanto de DHEA como de DHEA-S mayores en hombres y los niveles del sulfato de DHEA pueden también modificarse por condiciones medioambientales o raza (116).

#### 1.3.3.1. Mecanismos de acción

Esta hormona posee mecanismos de acción directos e indirectos, estos últimos se generarían a partir de sus metabolitos, por ejemplos testosterona y estradiol. Su accionar directo se genera a través de receptores de membrana o nucleares, siendo la búsqueda de un receptor nuclear específico de especial interés en la actualidad, entre los candidatos se incluyen: los receptores androstano  $\beta$ ; pregnano X y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (116).

#### 1.3.3.2. Efectos sistémicos de la dehidroepiandrosterona (DHEA)

El papel que desempeña esta hormona como precursora de numerosos metabolitos ha hecho que se la conozca como “hormona madre”, cuyos efectos sistémicos, además del rol inmunomodulador, que se mencionará en el siguiente apartado, se detallan en la siguiente tabla:

Sistema	Efecto
Endocrino	Precursora de hormonas sexuales en ambos géneros.
Metabólico	Control lipídico por disminución de colesterol y triglicéridos, glucemia e insulina

Cerebral	Esteroide neuroactivo con función sobre el crecimiento neuronal por aumento del flujo y aumento de la producción de IGF1. Tiene efecto neuroprotector.
Cardiovascular	Prevención de enfermedad cardíaca reduciendo el riesgo aterogénico.
Esquelético	Aumento de la densidad ósea
Músculo	Incremento de la glucógenolisis y de la beta oxidación de los ácidos grasos

La suplementación con DHEA y sus análogos sintéticos ha sido investigada en las últimas décadas como una terapia de rejuvenecimiento general y en particular del sistema inmune. Se han reportado beneficios pre-clínicos que incluyen protección en diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y en esclerosis múltiple. También existen reportes donde se adjudica a esta hormona el hecho de prevenir la obesidad y disminuir los niveles de colesterol séricos (120).

### 1.3.3.3. Rol inmunomodulador de la DHEA

Estudios en animales sugieren que la DHEA incrementa la función inmune y de esta forma protege a ratones de infecciones virales, bacterianas y parasitarias (117). Experimentos en ratones infectados con Mtb muestran que la DHEA y su metabolito androstenediol (AED) tienen un verdadero efecto antigluco corticoide, tanto en la actividad macrofágica (121) como en la proliferación linfocitaria (122). Al respecto, otros autores observaron luego de infectar ratones Balb/c con Mtb que durante el desarrollo de la TB pulmonar el patrón de citocinas Th1 se modificó hacia Th2, con marcada hiperplasia de las glándulas adrenales. Cuando conjuntamente se les administró corticosterona y DHEA o AED en concentraciones adecuadas y en una etapa tardía de la enfermedad, se observó el reestablecimiento del patrón de citocinas tipo Th1, una importante respuesta blastogénica ante Ag de Mtb y un aumento en la producción de TNF- $\alpha$ , hechos que no se manifestaron cuando se administraron aisladamente (123).

En humanos también favorecería un perfil de citocinas Th1 al actuar como activador transcripcional de los genes para la IL-2 en células T CD4+ (122,124). En relación a lo mencionado, los niveles plasmáticos de DHEA-S en pacientes HIV+ se correlacionaron positivamente con aquellos de IFN- $\gamma$  y negativamente con los de IL-4 (28).



Martinez-Taboada y col. observaron que bajos niveles de DHEA se asociaban con cambios específicos en el repertorio celular inmune, con una disminución en linfocitos T no activados y un aumento en células NK y células T activadas (125).

Más aún, en patologías severas se asociaron bajos niveles de DHEA-S con un resultado desfavorable en la resolución de las mismas (116).

Si bien los niveles de DHEA y DHEA-S disminuyen con la edad, las concentraciones de Cortisol permanecen bastante constantes. De esta manera, se producen incrementos de la relación Cortisol/DHEA con la edad, asociados a la disminución de la inmunidad celular. Como se sabe, con el pasar de los años disminuyen los niveles de citocinas que caracterizan al perfil Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ), mientras que aumentan la expresión de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-6, IL-10). Al respecto, se constató que el tratamiento de ratones viejos con DHEA-S disminuía la expresión de IL-10 (117,126).

El descenso en las concentraciones plasmáticas de esta hormona no sólo se correlaciona con la edad, sino que también se observa durante infecciones severas, patologías autoinmunes como la artritis reumatoidea, y en otras enfermedades caracterizadas por un corrimiento de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (109). Estudios realizados en pacientes con tuberculosis pusieron en evidencia un marcado descenso en los niveles plasmáticos de DHEA asociado a la severidad de la TB pulmonar. Si bien las concentraciones de Cortisol se encontraban aumentadas, las evidencias sugirieron que el curso de la respuesta inmune antituberculosa dependería de la relación entre los niveles plasmáticos de ambas hormonas: Cortisol/DHEA (127,128).

## Hipótesis de trabajo

---

Al analizar lo expresado previamente podemos afirmar que una compleja red de interacciones subyacen en la fisiopatogénesis de esta entidad nosológica, más aún si se tiene en cuenta que la TB pulmonar es una enfermedad que puede ocasionar desde algunas lesiones infiltrativas en los lóbulos superiores del pulmón hasta un cuadro de intensa inflamación con destrucción del parénquima, necrosis caseosa y formación de cavernas.

En esta red de interacciones, uno de los actores principales es el eje HPA, que es capaz de regular la respuesta inmune frente a diferentes agentes infecciosos. Si bien una de las funciones de los GC es proteger al huésped de los efectos deletéreos de las citocinas pro-inflamatorias (101), sus efectos inmunofarmacológicos van más allá de estas acciones supresoras desempeñándose también como agentes inmunomoduladores (129). En una primera etapa, los GC optimizarían el curso de respuestas biológicas agudas, sin embargo en caso de prolongarse su accionar repercutirían desfavorablemente sobre el huésped. Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* señalan que los GC inhiben la síntesis de citocinas que promueven la inmunidad celular (Th1) y la respuesta inflamatoria que acompaña a la misma, favoreciendo la actividad Th2 (130,131).

En contraste con los GC, la DHEA facilita el patrón Th1 y la presencia de altas o bajas concentraciones de DHEA en el tejido linfático del ratón (un modelo donde su producción es casi nula) se correlacionan con respuestas, Th1 o Th2, respectivamente (112). En trabajos previos de nuestro grupo, se pudo constatar la reducción provocada por el Cortisol, tanto en la blastogénesis como en la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y el efecto inhibitorio de la DHEA sobre la síntesis de TGF- $\beta$  a partir de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes con tuberculosis pulmonar (TB), estimuladas específicamente. Sin embargo en aquellos cultivos donde se combinaron ambas hormonas, la DHEA no logró revertir el efecto inhibitorio del Cortisol (132). Además las CMP de los pacientes con enfermedad leve producían citocinas predominantemente de tipo Th1 ante la estimulación específica, mientras que los casos más avanzados mostraban un patrón mixto Th1/Th2 con elevada síntesis de factor TGF- $\beta$  (57,133). Con respecto a la IL-10, un mediador reconocido por su accionar inmunomodulador, los TB mostraron niveles aumentados y el Cortisol inhibió su producción tanto en células de Pacientes como en las de los Controles Sanos; pero DHEA logró disminuir

aun más su síntesis en los cultivos de células provenientes de Pacientes con TB avanzada (134). Además otros laboratorios corroboraron tal desbalance en las respuestas Th1/Th2 durante la enfermedad activa y en progresión (135), como así también un deterioro de la actividad lítica de las células CD4+ y CD8+ (136). Este corrimiento en el perfil de respuesta (Th1 → Th2) con la progresión de la enfermedad es uno de los aspectos centrales en la inmunopatología de la misma, si bien también se identifica la presencia de otros patrones como Th17 y Treg.

Los mecanismos por los cuales los GC ejercen propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias no están completamente elucidados, se conoce que afectan el desarrollo y la función de las células T a través de la inducción de apoptosis de los timocitos inmaduros mientras que a nivel de células T maduras suprimirían la producción de citocinas. Si bien se pensó que las células T periféricas eran resistentes a la apoptosis inducida por esteroides, trabajos posteriores desestimaron esta presunción (137). Los GC presentan dos efectos diferentes sobre la vulnerabilidad de las células T antígeno-específicas humanas, inducen su apoptosis por un mecanismo independiente de CD95 pero dependiente de caspasas, y también son capaces de proteger a las células T de la apoptosis mediada por CD95, la que a su vez también es dependiente de caspasas (138). Por otra parte se conoce que la presencia de células apoptóticas modula la producción de citocinas por células inmunocompetentes. Al respecto, Voll y col. han demostrado que la presencia de células apoptóticas aumenta la secreción de IL-10 y disminuye la secreción de TNF- $\alpha$  por parte de los monocitos (139).

Como fenómeno regulatorio, la apoptosis de los linfocitos T maduros preserva la homeostasis periférica y el estado de tolerancia en oposición a los profundos cambios en el número y tipo de células T que genera la variada estimulación antigénica. El modo por el cual se dispara la muerte celular programada puede ser a través de un hecho pasivo (déficit de citocinas) o bien activo, también conocida como muerte celular inducida por activación. La misma está destinada a limitar respuestas a estímulos antigénicos continuos o repetidos.

Como fue reportado en la bibliografía, además de lo expuesto, una elevación sostenida de GC puede llevar a la apoptosis de linfocitos, para preservar la homeostasis periférica. Debe destacarse que en nuestros estudios los pacientes TB presentaron concentraciones elevadas de Cortisol plasmático con un significativo descenso en los niveles de DHEA inversamente asociados a la severidad de esta patología, estos hechos en conjunto, nos llevan a

preguntarnos si este proceso de muerte celular programada es responsable de la menor proliferación y síntesis de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  antes mencionados.

Por otro lado, y a fin de conocer si los mediadores de la respuesta inmune específica se encontraban involucrados en la inhibición de la producción adrenal de DHEA, observada en pacientes, los sobrenadantes de cultivo de CPM de pacientes TB y controles sanos, estimuladas o no con *M. tuberculosis (Mtb)*, fueron adicionados a células adrenales humanas. Es así como se demostró que estos sobrenadantes inhibían la síntesis de DHEA, y que esta inhibición era aún mayor si ellos procedían de CPM de TB estimuladas con la micobacteria sonicada (140).

Las citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e IL-6 son mediadores producidos durante esta infección con potenciales efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune específica (63) y los dos últimos con reconocida influencia sobre la síntesis de esteroides (141,142), hechos que nos sugieren que algunos de estos medidores podrían estar implicados en la inhibición de la síntesis de DHEA adrenal.

Otra cuestión relevante para elucidar es si las anormalidades neuroendócrinas son concomitantes al desarrollo de la TB o preceden a la instalación del cuadro clínico. La respuesta a una pregunta de esta naturaleza requiere de un estudio longitudinal muy poco factible desde el punto de vista de la investigación clínica por cuanto el individuo generalmente concurre a la consulta cuando es sintomático. Para superar esta limitación propia de la investigación en humanos existe una opción válida como es el estudio en convivientes de enfermos abiertos. La alta contagiosidad de un paciente bacilífero hace que los contactos de primer grado posean una elevada probabilidad de desarrollar la infección tuberculosa. En la mayor parte de los contagiados el proceso persiste sin ocasionar daño tisular (sub-clínica), constituyendo una situación lo suficientemente indicativa del montaje de una respuesta defensiva eficaz. En función de ello se pensó que el estudio de las interrelaciones inmuno-endócrinas en los convivientes sanos puede ser muy ilustrativo de lo que ocurre personas que por lograr una correcta sintonía de la respuesta neuroinmunoendócrina permanecen libres de enfermedad, esto es el 95% de los infectados.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo general:

Profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos inherentes a la interacción inmunoendócrina en pacientes con TB de distinta severidad y sujetos sanos expuestos (convivientes) o no a la micobacteria.

### 2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Conocer si las modificaciones observadas en la respuesta inmune específica de las CMP frente a *Mtb*, por el agregado de Cortisol y/o DHEA, se encontrarían asociadas a un patrón diferencial en el proceso de muerte celular programada.
- ✓ Analizar el efecto del Cortisol y/o DHEA sobre la respuesta blastogénica y la síntesis de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  por parte de CMP, estimuladas *in vitro* con *Mtb*, provenientes de pacientes y de sujetos inmunoprottegidos (convivientes íntimos de pacientes bacilíferos).
- ✓ Investigar que mediador(es) secretados por las células periféricas mononucleares (estimuladas o no con *Mtb*) estarían implicados en la inhibición de la síntesis de DHEA por parte de la línea celular adrenal humana NCI-H295-R.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1. Grupos de estudio

Los pacientes fueron seleccionados, por médicos especialistas, de entre los enfermos que concurrían al servicio de Neumonología del Hospital “Intendente Carrasco” de esta ciudad.

El diagnóstico de Tuberculosis se realizó en base a los criterios clínicos, radiológicos y a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo.

De acuerdo a la extensión de la lesión radiológica los individuos diagnosticados con TB se clasificaron en 3 tipos:

- Leves, pacientes con un único lóbulo involucrado sin cavidades visibles.
- Moderados, pacientes que presentaban compromiso unilateral de 2 o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, no excedían un diámetro total de 4 cm.
- Severos, enfermedad bilateral con afectación masiva y cavidades múltiples.

Muestra de Convivientes: Se trabajó a partir de un caso índice (enfermo con diagnóstico de TB y esputo positivo). A partir de ello se invitó a los convivientes de primer grado a efectuarse un examen clínico y radiológico. Aquellos sin sintomatología alguna, RX de tórax normal y sin trastornos endócrinos fueron incluidos en el estudio.

La población Control, denominada en adelante Controles Sanos, fue conformada por voluntarios sanos similares en sexo y edad, HIV negativos, que no registraron contacto con pacientes TB, ni presentaban enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos.

Se excluyeron del estudio aquellos sujetos que habían iniciado tratamiento antituberculoso, o que presentaban patologías con compromiso de la glándula suprarrenal, tampoco se incluyeron mujeres embarazadas o menores de 18 años, ni personas que presentaban patologías que comprometían el eje HPA o que estuviesen medicados con corticosteroides, inmunosupresores o inmunomoduladores.

El presente estudio fue conducido de acuerdo a las normas de la buena práctica clínica y fue aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Todos los participantes prestaron su consentimiento por escrito, previa información.

### 3.2. Muestras

Se realizó una única extracción por venopuntura de 40 ml de sangre, utilizando como anticoagulante EDTA (GT lab Rosario, Argentina), en una proporción de 100 µl cada 100 ml de sangre. Debido al ritmo circadiano de las hormonas esteroideas adrenales, todas las extracciones se realizaron a primera hora de la mañana (7:30-8:30 h), y la sangre anticoagulada se conservó a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 2 h hasta su utilización.

Tanto las muestras provenientes de los pacientes como la de los controles y convivientes se procesaron en forma simultánea.

Se separó 1 ml de la sangre extraída y se analizaron los valores de hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos totales y fórmula leucocitaria completa en un analizador automático.

### 3.3. Separación de células mononucleares

La sangre anticoagulada se centrifugó a 8°C durante 15 minutos a 2.000 rpm.

Luego se recogió la capa de glóbulos blancos ubicada en la interfase entre los eritrocitos y el plasma y se la resuspendió en igual volumen de RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) adicionado con antibióticos: 100µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria- ATB).

A su vez, el plasma se aisló y centrifugó a 6.000 rpm para separar las plaquetas, luego se agregó Trasylol (Bayer, Alemania), en una proporción de 100 U/ml de plasma, se fraccionó y conservó a -20 °C hasta su utilización.

En tubos conteniendo 1 parte de Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA ( $\delta=1.077\text{g/ml}$ ) se agregaron 3 partes de la dilución de la suspensión celular y se centrifugó durante 30 minutos a 1800 rpm.

El aislamiento de las células periféricas mononucleares se realizó teniendo en cuenta la diferencia de densidades que existe entre los elementos de la sangre. Los eritrocitos y los granulocitos poseen una densidad mayor que 1,077 g/ml y por lo tanto se ubicaron por debajo de la capa del gradiente de esa densidad, mientras que los monocitos, los linfocitos las células dendríticas y las plaquetas, al ser menos densos, flotaron por encima.

Es así como se retiraron las células mononucleares, colocándolas en un tubo de 50 ml al que se le agregó igual volumen de RPMI 1640 adicionado con ATB y 5% de suero humano AB

(SAB-PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) al que previamente se lo inactivó en baño de agua a 56°C, durante 30 minutos, con agitación constante (En adelante RPMI).

Esta suspensión celular se centrifugó durante 15 minutos a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 2 ml de RPMI, y nuevamente se centrifugó 15 minutos a 1200 rpm.

Este último paso se repitió hasta completar el tercer lavado. Por último las células mononucleares se resuspendieron en 2 ml de RPMI, asegurando una buena dispersión por agitación.

### **3.4. Evaluación de viabilidad celular**

Para evaluar la viabilidad celular se utilizó una solución de Azul Tripán, constituida por 4 partes de Azul Tripán al 0,5% P/V y una parte de Cloruro de Sodio al 4,25% P/V.

Se tomó una parte de esta solución colorante y se mezcló con igual volumen de la suspensión celular procediendo al recuento de las células en cámara de Neubauer.

Se calculó el porcentaje de células viables como: número de células vivas (no coloreadas) sobre el número total de células identificadas x 100.

Solo se utilizaron aquellas suspensiones celulares que presentaban una viabilidad mayor al 95 %.

### **3.5. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo**

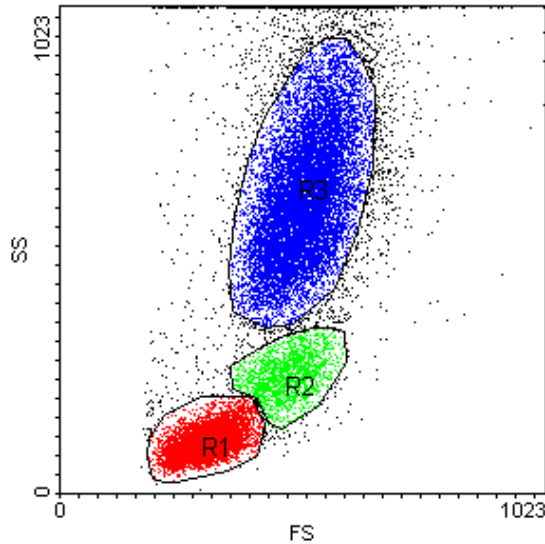
En el estudio se utilizó un citómetro de marca Coulter Epics-XL (Coulter Corp. Miami, FL, USA) y para la inmunotipificación de las poblaciones celulares los anticuerpos monoclonales (isotipo IgG2a de ratón) (Caltag Lab GmbH, Hamburg, Alemania) utilizados fueron:

- Ig-FITC (control de isotipo)
- Ig-PE (control de isotipo)
- CD4-FITC/CD8-PE/CD3-Cy
- CD45-FITC/CD14-PE
- CD3-FITC/CD19-PE

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias se realizó a partir de sangre periférica anticoagulada con EDTA (GT lab, Rosario, Arg). A 50 µl de ésta se le agregaron, según las especificaciones del fabricante, los anticuerpos monoclonales correspondientes a cada determinación, el mismo procedimiento se siguió para los controles de isotipo, y se incubó



por 15 minutos en oscuridad. Luego se procedió a lisar los glóbulos rojos con Inmunoprep Coulter (Coulter Corp. Miami, FL, USA) y a la lectura en el citómetro de flujo de 10.000 eventos en cada tubo.



---

*Figura 3:* Gráfico de luz dispersada frontalmente (FS), una medida del tamaño celular, vs. luz dispersada lateralmente (SS), proporcional a la granularidad de la célula y su complejidad. R1: linfocitos, R2: monocitos y R3: granulocitos.

---

Los resultados fueron analizados con el programa WinMD1 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, Ca, USA) de la siguiente manera: en un gráfico de FS vs. SS (del Inglés Forward Scatter y Side Scatter respectivamente; ver leyenda de Figura 3) se seleccionaron las poblaciones correspondientes a la región de linfocitos (Figura 3, R1). En esta población se analizó la expresión en la membrana de moléculas CD3 y CD4, o de CD3 y CD8, como así también CD3 y CD19. Por otro lado se seleccionaron las regiones R1, R2 y R3 en forma conjunta y se analizó la expresión en la membrana de moléculas de CD45 y CD14. En cada uno de los gráficos obtenidos de las subpoblaciones celulares se procedió a evaluar porcentualmente los eventos correspondientes a células doble positivas (Figura 4).

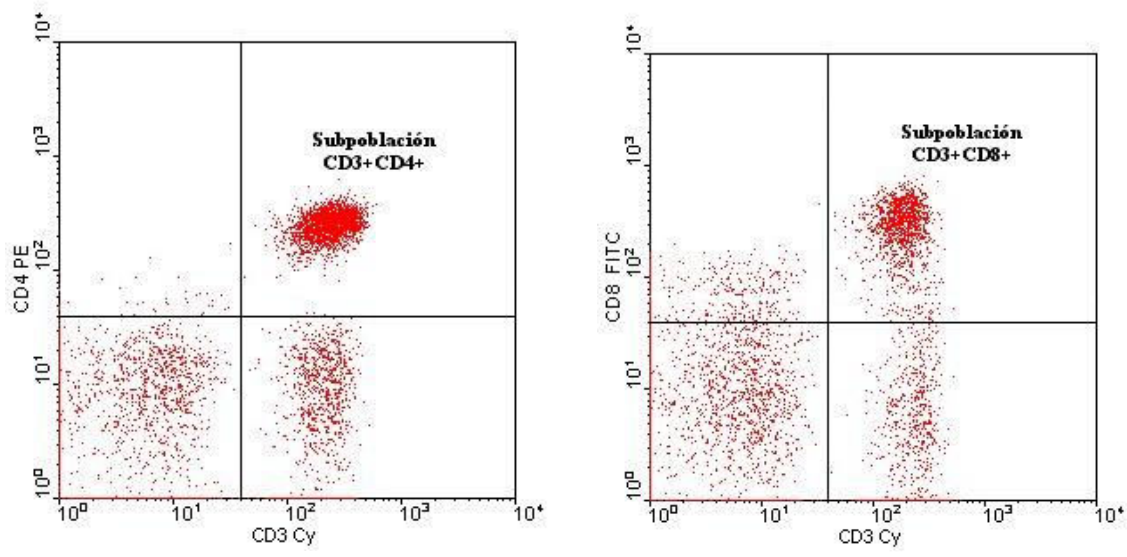


Figura 4: Dot-plot (diagrama de puntos de dos parámetros) en los que se muestran: Absisa: células marcadas con anti-CD3 (CD3-Cy), y Ordenada: células marcadas con anti-CD4 (CD4-PE) (izquierda) o células marcadas con anti-CD8 (CD8-FITC) (derecha). Como ejemplo se detallan en el los gráficos tanto la subpoblación CD3+CD4+ como la CD3+CD8+.

### 3.6. Estudios de linfoproliferación

Para evaluar la blastogénesis, se cultivaron las células por cuadruplicado en microplacas de fondo plano de 96 pocillos (Corning Costar, NY, USA), donde a cada cultivo se le adicionó 100  $\mu$ l de la suspensión celular ( $2 \times 10^5$  cél/pocillo) y 50  $\mu$ l de *Mtb* sonicado (Tso, 8  $\mu$ g/ml, donado por el Prof J. Stanford, Department of Medical Microbiology, Windeyer Institute of Medical Sciences,) o Concanavalina A -ConA- (2,5  $\mu$ g/ml).

Las placas, conteniendo un volumen final de 200  $\mu$ l/pocillo, se incubaron durante 5 días a 37°C, en atmósfera de aire humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Dieciocho horas previas a la finalización del cultivo se agregó 1  $\mu$ C de 3H-timidina en cada pocillo, las células se cosecharon en papel de fibra de vidrio y posteriormente se procedió a la medición de la radioactividad incorporada en contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Raskbeta). Los resultados se expresaron como el promedio de las cuentas por minuto (cpm) para cada condición experimental.

### 3.7. Estudio de los efectos *in vitro* del Cortisol y DHEA.

Para la cuantificación de las citocinas se realizaron, en placas de 24 pocillos (Corning Costar, NY, USA) ( $2 \times 10^6$  cél/ml/pocillo), cultivos con el agregado de GC y DHEA, ambos esteroides solos y combinados, además de los respectivos controles.

Los cultivos realizados fueron los siguientes:

- a) Basal (sólo células)
- b) células + Tso
- c) células + Tso + DHEA
- d) células + Tso + Cortisol
- e) células + Tso + DHEA + Cortisol
- f) células + DHEA
- g) células + Cortisol

La concentración adicionada de Cortisol fue  $10^{-6}$  M, y las de DHEA:  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M  $10^{-9}$  M, que corresponden al rango de concentraciones séricas probables de hallar en individuos con esta patología.

Los sobrenadantes se recolectaron a las 24, 36 y 96 h de cultivo y luego del agregado de 100 U/ml de Trasylol (Bayer, Alemania), se fraccionaron y conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.8. Cuantificación de mediadores**

Los niveles de citocinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de las CMP estimuladas con Tso o no y adicionadas con las distintas concentraciones de hormonas como se describe en el ítem precedente, se cuantificaron por enzimoimmunoanálisis comerciales (INF- $\gamma$ - ELISA, OptEIA Set Pharmingen, USA; TGF- $\beta$  – Emax ImmunoAssay System, Promega, Madison, USA), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Las muestras se estudiaron por duplicado y los resultados se expresaron como el promedio de las dos lecturas de absorbancia a 450 nm. Las citocinas se cuantificaron en referencia a curvas estándar.

Los límites sensibilidad fueron los siguientes:

INF- $\gamma$  4,7 pg/ml

TGF- $\beta$  15,6 pg/ml

### **3.9. Medición de las hormonas plasmáticas**

A partir del plasma separado como se describe en el ítem 2.3, se cuantificaron los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S por enzimoimmunoensayos de competición comerciales (ELISA, DRG Systems, Marburg, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los límites de sensibilidad fueron los siguientes:

Cortisol 2,5 ng/ml

DHEA 0,1 ng/ml

DHEA-S 0,044 µg/ml.

### 3.10. Cuantificación de la apoptosis de CMP por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC/ Ioduro de propidio

La fosfatidilserina (PS) normalmente se encuentra ubicada en la cara interna de la membrana plasmática. La unión específica del conjugado Anexina V-FITC a la PS se observa en un estadio temprano de la apoptosis cuando la PS se transloca hacia la cara externa de la membrana, como así también en estadios tardíos del fenómeno cuando las células ya presentan necrosis y ocurre la permeabilización de la membrana, lo cual permite la entrada del conjugado. Dado que otras causas además de la apoptosis pueden resultar en la necrosis de las células, es importante poder diferenciar estos dos fenómenos. Para ello, se utiliza la tinción conjunta con el fluoróforo Ioduro de Propidio (IP), el cual ingresa a la célula y se une al ADN al permeabilizarse la membrana. De esta forma, tal como se observa en la Figura 5, mediante este método de doble tinción con Anexina V-FITC/Ioduro de Propidio se pueden distinguir las poblaciones apoptóticas de las necróticas.

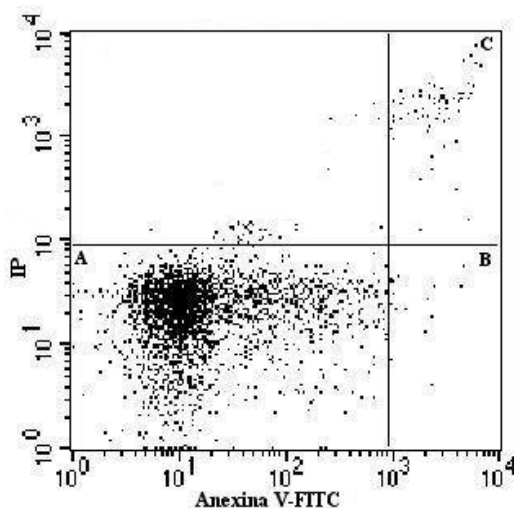


Figura 5: Dot-plot (diagrama de puntos de dos parámetros) en los que se muestra el análisis de la apoptosis de CMP en cultivos de 24 h por marcación con Anexina-V/Ioduro de propidio. (A) Células no apoptóticas: Anexina V-FITC negativas e IP negativas. (B) Células en apoptosis temprana: Anexina V-FITC positivas e IP negativas. (C) Células en apoptosis tardía o necróticas: Anexina V-FITC positivas e IP positivas.

Aplicando estos conceptos, las CMP de los cultivos de 24 h se lavaron con 1 ml de Solución Fisiológica fría centrifugando a 4°C durante 15 minutos a 1.200 rpm. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 µl de una solución tampón (*Binding Buffer*) fría. Seguidamente las células se marcaron con 2,5 µl de Anexina V-FITC (MedSystems

Diagnostics GmbH, Viena, Austria) y 5  $\mu$ l de IP (MedSystems Diagnostics GmbH, Viena, Austria), y se incubaron 10 min. en oscuridad a 4°C. Pasado este tiempo, se procedió a la lectura de al menos 10.000 eventos en un citómetro de flujo Coulter Epics-XL. El porcentaje de células apoptóticas tempranas se obtuvo utilizando el programa WinMDI 2,8 (Scripps Research Institute, La Jolla, Ca, USA).

### 3.11. Medición de subpoblaciones hipodiploides por citometría de flujo mediante la marcación con IP

Este método pone en evidencia la fragmentación del ADN que se observa durante las etapas finales de la apoptosis mediante la cuantificación de los eventos hipodiploides.

Las CMP de los cultivos de 96 h se lavaron dos veces con 2 ml de PBS frío, centrifugando a 4°C durante 15 minutos a 1.200 rpm. Luego se las fijó en 1 ml de etanol 70 % V/V, y se las incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con 2 ml de PBS frío. Las células se resuspendieron en 1 ml de Buffer K y luego de 3 h de incubación a 4°C, se procedió a la lectura de al menos 10.000 eventos en el citómetro de flujo Coulter Epics-XL. El porcentaje de células hipodiploides fue determinado mediante la selección y cuantificación de eventos hipodiploides en histogramas (Figura 6) generados por el programa WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, Ca, USA).

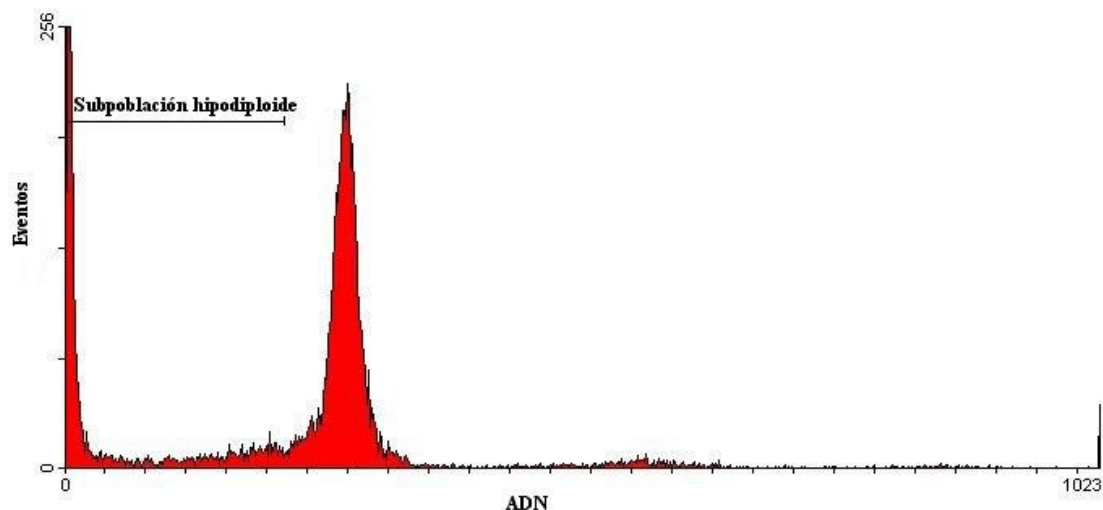


Figura 6: Análisis de la muerte celular *in vitro* luego de 96 h de tratamiento por tinción con Ioduro de Propidio. En el histograma se señala la subpoblación hipodiploide; su cuantificación estima la apoptosis tardía.

### **3.12. Sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de Pacientes y Controles sanos para los experimentos con la línea adrenal**

Con el fin de obtener sobrenadantes de CMP de pacientes y Controles estimuladas o no con Tso para adicionar a los cultivos de la línea adrenal que más adelante se describen, se sembraron las CMP en policubetas de 24 pocillos (Corning Costar, NY, USA) en una concentración de  $10 \times 10^6$  cél/pocillo, en un volumen final de 1 ml en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) adicionado con antibióticos: 100µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria- Atb) y 5% de SABi (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria); (En adelante RPMI).

Los sobrenadantes de cultivo (SN) se levantaron a las 24, 36 y 96 h, luego de la adición de Trasylol (Bayer, Alemania) se centrifugaron, fraccionaron y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

En el momento inmediato al desafío con la línea adrenal se confeccionaron con igual volumen de cada SN, pooles basales (SN Basal) y estimulados (SN Tso) representativos de Pacientes severos y de Controles Sanos correspondientes a los tres tiempos analizados.

### **3.13. Cultivos de la línea celular adrenal NCI-H295-R**

La línea celular NCI-H295-R (gentilmente donada por la Dra. M. Ehrhart-Bornstein, Düsseldorf, Alemania) es una adaptación adherente de la línea original NCI-H295, obtenida a partir de un adenocarcinoma adrenal de una mujer de raza negra. Ambas líneas conservan la capacidad de respuesta a estímulos fisiológicos con la producción de esteroides adrenales.

La línea adherente se desarrolla en medio DMEM / F12 conteniendo concentraciones estándar de L-glutamina y Hepes 15 mM (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) y los siguientes elementos en las concentraciones que se detallan (En adelante DMEM):

- $\text{NaHCO}_3$  (1,2 g/l) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Insulina (379,47 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Hidrocortisona (3,625 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Estradiol (2,724 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Transferrina (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Selenito (5 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

- Penicilina (100 U/ml) Estreptomicina (100 µg/ml) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria)
- SFB (2%) (NATOCOR, Córdoba, Argentina) Inactivado por calor

La recuperación de células se realizó partir de un vial preservado en nitrógeno líquido con  $10^7$  cél/ml/vial. El mismo se descongeló y el contenido se transfirió a un tubo de 14 ml estéril, se adicionaron aproximadamente 10 ml de PBS y se centrifugó a 1.100 rpm en centrifuga a 18 °C; se resuspendió el pellet en 10 ml de medio de cultivo DMEM con aditivos y 10% de SFBi (DMEM). Luego se sembró una botella o 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, BD Biosciences, Argentina) con la suspensión celular la cual se colocó en incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las células se cultivaron hasta subconfluencia. Cuando la densidad celular fue de 20-25x10<sup>6</sup> cél/ml, se retiró el medio de cultivo y se lavó la superficie celular con un volumen pequeño de PBS estéril a 37 °C. Posteriormente se agregaron 8 a 10 ml de Acutasa (PAA Laboratories GMBH, Linz, Austria) y se retornó la botella a la estufa de cultivo durante 10 minutos o hasta observar el desprendimiento de las células al microscopio.

Para la cuantificación se colocó 1ml de la suspensión en un tubo y se adicionó igual volumen de Acumax para dispersar las células (PAA Laboratories GMBH, Linz, Austria). A partir de esta suspensión se realizó la cuantificación utilizando Azul Tripán para identificar las células muertas.

Todos los experimentos se realizaron a partir de viales congelados que correspondían al mismo número de repique de la línea.

Para realizar los experimentos, las células se sembraron en una concentración de 70.000 cél/cm<sup>2</sup> en placas fondo plano, de 24 pozos, área de crecimiento 2 cm<sup>2</sup> (Corning Costar, NY, USA) volumen final por pocillos 400 µl, el cual se cambió en su totalidad cada 2 o 3 días. Al llegar al 70 % de confluencia (aproximadamente 4-5 días) se retiró el medio de cultivo y se procedió a enfrentarlas a los tratamientos que más abajo se detallan. Además, se utilizó como control positivo de estimulación al activador directo de la enzima adenilato ciclasa, Forskolin (Tocris Biotrend, Köln, Alemania).

A continuación se describen los distintos cultivos celulares realizados:

#### Cultivos Controles

1. DMEM 400 µl
2. Forskolin  $2 \times 10^{-5}$  M en DMEM 400 µl
3. DMEM 200 µl + RPMI 200 µl

4. DMEM 100  $\mu\text{l}$  + Forskolin  $2 \times 10^{-5}\text{M}$  en DMEM 100  $\mu\text{l}$  + RPMI 200  $\mu\text{l}$
5. Tso en RPMI 200  $\mu\text{l}$  + DMEM 200  $\mu\text{l}$
6. Tso en RPMI 200  $\mu\text{l}$  + Forskolin  $2 \times 10^{-5}\text{M}$  en DMEM 200  $\mu\text{l}$

#### Cultivos tratados con Pooles de sobrenadantes de cultivos de CMP de Controles Sanos y Pacientes con TB.

7. SN Basal de CMP de Controles Sanos 200  $\mu\text{l}$  + DMEM 200  $\mu\text{l}$
8. SN Basal de CMP de Controles Sanos 200  $\mu\text{l}$  + Forskolin  $2 \times 10^{-5}\text{M}$  en DMEM 100  $\mu\text{l}$  + DMEM 100  $\mu\text{l}$
9. SN Tso de CMP de Controles Sanos 200  $\mu\text{l}$  + DMEM 200  $\mu\text{l}$
10. SN Tso de CMP de Controles Sanos 200  $\mu\text{l}$  + Forskolin  $2 \times 10^{-5}\text{M}$  en DMEM 100  $\mu\text{l}$  + DMEM 100  $\mu\text{l}$

Los cultivos 7 a 10 se repiten pero con la adición de SN de CMP de Pacientes Severos.

Los cultivos se incubaron durante 48 h, luego se recolectaron los medios condicionados, a los cuales se les agregó 100 U/ml de Trasylol (Bayer, Alemania), se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm a 4°C, se fraccionaron y congelaron a -20°C hasta su utilización. En ellos se determinaron las concentraciones de Cortisol, DHEA y DHEA-S (ELISA, DRG Systems, Alemania), como se describió en el ítem 3.9.

#### **3.14. Evaluación de la viabilidad de las células adrenales**

La viabilidad celular fue estimada mediante el ensayo de las sales de Metil Tetrazolium (MTT). Este método corresponde a un ensayo no radiactivo, colorimétrico y cuantitativo que se basa en la biorreducción de las sales de MTT (incolores y solubles) a cristales de formazán (insolubles y coloreados). El proceso es llevado a cabo por acción de la Succinato Deshidrogenasa mitocondrial, cuya actividad depende de la integridad de la membrana de la mencionada organela.

Dada las características del ensayo, a diferencia de lo expresado en el ítem anterior, los cultivos se realizaron por cuadruplicado en policubetas de 96 pocillos (Corning Costar, NY, USA). A fin de poner a punto la técnica se evaluaron distintas dosis de siembra ( $2,24 \times 10^3$  cél/pocillo;  $5,6 \times 10^3$  cél/pocillo;  $11,2 \times 10^3$  cél/pocillo;  $22,4 \times 10^3$  cél/pocillo y  $44,8 \times 10^3$  cél/pocillo) y diferentes tiempos de incubación con el MTT (30 min, 1, 2 y 4 h).

Luego de la siembra, cada 48 h se realizó un cambio total del medio de cultivo. Cuando la concentración en estudio de  $22,4 \times 10^3$  (que correspondía a 70.000 cél/cm<sup>2</sup> en placa de 24 pocillos) alcanzó el 70% de confluencia nuevamente se cambió el medio de cultivo pero en



este caso el volumen final fue de 150  $\mu\text{l}$ . A las 24 h se les agregó a la mitad de los cultivos 50  $\mu\text{l}$  de DMEM o 50  $\mu\text{l}$  de Fk  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  en DMEM.

Luego de 48 h de incubación, se retiraron los medios de cultivo y se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de MTT (0,5 mg/ml de MCC). Transcurridos los tiempos de incubación detallados, se observó al microscopio la formación de cristales de formazán en el interior celular.

Se retiraron los sobrenadantes y los cristales se disolvieron en 200  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfoxido, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos e inmediatamente se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda correspondiente a 545 nm en un lector de microplaca Beckman Coulter DTX 880. Por medio de la cantidad del producto reducido se estimó en forma proporcional la cantidad de células vivas en el cultivo.

### **3.15. Análisis de la proliferación celular de la línea NCI-H295R.**

La línea adrenal humana se sembró en placas de 96 pocillos en una densidad de 22.400 cél/pocillos para un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  de DMEM. Los cultivos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de aire con 5% de  $\text{CO}_2$ . Cada 48 h se realizó un cambio total del medio de cultivo. A partir de las 24 h de cultivo y diariamente hasta que las células alcanzaron el 70 % de confluencia, a grupos de 6 pocillos se les adicionó  $^3\text{[H]}$ timidina (0,5  $\mu\text{Ci}$ /pocillo). En esta etapa del crecimiento de la línea, a los cultivos que no recibieron  $^3\text{[H]}$ timidina se les cambió el medio sobrenadante de la siguiente manera: a la mitad de estos cultivos se les adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de DMEM y a los restantes 100  $\mu\text{l}$  de DMEM + 100  $\mu\text{l}$  RPMI 1640.

Luego de 24 h, y considerando el medio de cultivo adicionado, la mitad de los cultivos fueron tratados con 50  $\mu\text{l}$  de Forskolin  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  en DMEM y los restantes solo con 50  $\mu\text{l}$  de DMEM.

Luego de 8 h se procedió a la cosecha sobre papel de fibra de vidrio. La incorporación de  $^3\text{[H]}$ timidina al ADN se midió como cuentas por minuto (cpm) en contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Raskbeta). A partir del material radiactivo incorporado se estimó la proliferación celular.

### **3.16. Cultivos de la línea celular adrenal NCI-H295-R y tratamiento con anti-TGF- $\beta$ .**

A fin de evaluar el(los) componente(s) inhibitorio(s) de la síntesis de DHEA por parte de la línea adrenal, en una primera etapa se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-TGF- $\beta$  (Santa Cruz Biothechnology, CA, USA).

Para evaluar el efecto del agregado de TGF-β1 sobre la producción de DHEA se mantuvieron las condiciones iniciales de cultivos expresadas en el ítem 3.13 y se ensayaron los siguientes tratamientos:

1. DMEM 400 μl
2. Forskolin  $2 \times 10^{-5}$  M en DMEM 400 μl
3. DMEM 200 μl + RPMI 200 μl
4. DMEM 100 μl + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$  M en DMEM 100 μl + RPMI 200 μl
5. DMEM 200 μl + TGF-β1 en RPMI 200 μl
6. DMEM 100 μl + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$  M en DMEM 100 μl + TGF-β1 en RPMI 200 μl
7. DMEM 180 μl + TGF-β1 en RPMI 200 μl + Anticuerpo anti TGF-β1 en RPMI 20 μl
8. DMEM 80 μl + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$  M en DMEM 100 μl + TGF-β1 en RPMI 200 μl + Anticuerpo anti-TGF-β1 en RPMI 20 μl.

La dosis de TGF-β1 recombinante (Sigma Aldrich, USA) que se utilizó fue de 6.100 pg/ml, la cual se correspondía con el valor promedio de esta citocina en el plasma de los pacientes con TB severa.

Con el fin de hallar la dosis óptima de anticuerpo monoclonal anti-TGF-β1 (Santa Cruz Biothecnology, CA, USA) que pudiera bloquear la concentración de TGF-β1 mencionada, se ensayaron las relaciones entre concentraciones detalladas en la tabla 2.

Anti-TGF-β/ TGF-β
300/1
100/1
25/1
10/1
1/1

*Tabla 2: Relaciones anti-TGF-β/TGF-β.*  
La relación 1/1 corresponde a 6100pg/ml de anti-TGF-β/6100pg/ml de TGF-β.

### 3.17. Tratamiento de la línea NCI-H295R con pools de SN de cultivo de CMP estimuladas con Tso y adicionados con anti-TGF-β

La siembra de la línea adrenal fue realizada con 140.000 cél/pocillo en placas de 24 pocillos, en un volumen final de 400 μl de DMEM (con aditivos). Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de aire con 5% de dióxido de carbono y cada 48 h se realizó un cambio total del medio de cultivo. Cuando éstos alcanzaron el 70 % de confluencia se retiró el medio

sobrenadante y se procedió a enfrentar a las células a los tratamientos que se describen a continuación:

1. DMEM 400  $\mu$ l
2. DMEM 300  $\mu$ l + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$ M en DMEM 100  $\mu$ l
3. DMEM 200  $\mu$ l + RPMI 200  $\mu$ l
4. DMEM 100  $\mu$ l + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$ M en DMEM 100  $\mu$ l + RPMI 200  $\mu$ l
5. DMEM 200  $\mu$ l + SN Basal 200  $\mu$ l
6. DMEM 100  $\mu$ l + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$ M en DMEM 100  $\mu$ l + SN Basal 200 $\mu$ l
7. DMEM 200  $\mu$ l + SN Tso 200 $\mu$ l
8. DMEM 100  $\mu$ l + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$ M en DMEM 100  $\mu$ l + SN Tso 200 $\mu$ l
9. DMEM 100  $\mu$ l + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$ M en DMEM 100  $\mu$ l + SN Basal 200 $\mu$ l + anti-TGF- $\beta$
10. DMEM 100  $\mu$ l + Forskolin  $2 \times 10^{-5}$ M en DMEM 100  $\mu$ l + SN Tso 200 $\mu$ l + anti-TGF- $\beta$

Todos los SN adicionados en este estudio se obtuvieron a las 24, 36 y 96 h de cultivo (ver ítem 3.12). Los SN Tso y SN Basal correspondieron a *pools* de SN provenientes de cultivos de CMP de Controles, o Pacientes con TB Severa, estimulados o no, con Mtb sonicado, respectivamente.

Una vez agregado el SN correspondiente, 24 h más tarde a la mitad de los cultivos se les adicionó Forskolin y 24 h luego del agregado de Fk se procedió a la recolección de los medios condicionados para la determinación de los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S según lo descrito en el ítem 3.9.

### 3.18. Análisis estadístico

Para realizar las comparaciones entre grupos se utilizaron pruebas no paramétricas, tales como el análisis de la variancia de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney (variables cuantitativas); chi cuadrado y prueba de la probabilidad exacta de Fisher (variables cualitativas). Las comparaciones entre dos tratamientos efectuados a células pertenecientes a un mismo grupo de sujetos (ej: TB Severa) se realizó en base a la prueba de pares ordenados de Wilcoxon.

Las muestras se consideraron distintas cuando presentaban un nivel de significado  $< 0.05$ .

Los resultados se expresaron como medianas y rango intercuartílico o como promedio  $\pm$  error estándar cuando se requirió para la mejor visualización de los gráficos.

## 4. Resultados

### 4.1. CAPITULO 1

#### Evaluación de la apoptosis de CMP de Pacientes con TB y Controles, estimuladas con Mtb y co-cultivadas con distintas concentraciones de Cortisol y/o DHEA.

##### 4.1.1. Descripción general de la muestra poblacional en estudio.

La muestra poblacional estudiada estuvo compuesta de 40 individuos que fueron clasificados en 16 Controles, 9 Pacientes con TB pulmonar leve, 11 Pacientes con TB pulmonar moderada, y 5 Pacientes con TB pulmonar severa. Ninguno de los grupos presentó diferencias significativas en cuanto a la edad (Tabla 3)

	Grupos			
	Controles	TB-Leves	TB-Moderados	TB-Severos
<b>Edad (Promedio ±DE años)</b>	35,88±13,84	29,76±14,46	41,18±18,51	41,60±11,66
<b>Sexo M/F</b>	11/5	5/4	7/5	4/1

Tabla 3: Descripción general de la muestra poblacional estudiada. DE: desvío estandar

Con respecto al hemograma y fórmula como puede observarse en las tablas 4 y 5, si bien los valores de glóbulos blancos totales y de neutrófilos estuvieron dentro de las medias poblacionales, se evidenció un aumento significativo en el grupo de Pacientes con TB con respecto al de los Controles para el caso de glóbulos blancos totales y que no llegó a presentar significado estadístico para los neutrófilos. Al analizar la proporción de estas células respecto al total de blancos (porcentaje), los Pacientes tuberculosos presentaron valores significativamente superiores a aquellos de Controles.

En cuanto a los linfocitos se evidenció un valor muy inferior al normal (25-35 %, referencia Laboratorio Central-Hospital Provincial del Centenario) en los Pacientes, observándose una disminución significativa con respecto a los Controles; ésta diferencia no se manifestó al considerar los valores totales de éstas células.

Con respecto a Glóbulos rojos y Hemoglobina como así también al resto de la formula los grupos estudiados no presentaron diferencias, en cambio el número de plaquetas provenientes de pacientes estuvo significativamente aumentado con respecto al grupo

Control, hecho de esperarse con una patología pulmonar infecciosa como es la Tuberculosis.

	Controles n=13	TB n=22	p
<b>Glóbulos Rojos</b> [10 <sup>6</sup> cél/μl]	4,8 (4,3-5,1)	4,7 (4,5-5,0)	ns
<b>Hemoglobina [g/dl]</b>	14,4 (12,6-14,7)	13,3 (12,1-14,0)	ns
<b>Blancos totales</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	7,0 (6,0-8,2)	8,8 (6,7-10,9)	0,01
<b>Neutrófilos [10<sup>3</sup>cél/μl]</b>	4,4 (4,0-5,2)	5,7 (4,2-7,9)	ns
<b>Eosinófilos [10<sup>3</sup>cél/μl]</b>	0,1 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,4)	ns
<b>Basófilos [10<sup>3</sup>cél/μl]</b>	0,04 (0,02-0,04)	0,04 (0,02-0,05)	ns
<b>Linfocitos [10<sup>3</sup>cél/μl]</b>	1,8 (1,5-2,3)	1,6 (1,1-2,0)	ns
<b>Monocitos [10<sup>3</sup>cél/μl]</b>	0,4 (0,4-0,6)	0,5 (0,4-0,6)	ns
<b>Plaquetas [10<sup>3</sup>cél/μl]</b>	250,0 (208,0-294,0)	394,0 (281,0-528,0)	0,002

Tabla 4: Elementos figurados de la sangre correspondiente a Pacientes con TB y Controles

	Controles n=13	TB n=22	p
<b>Neutrófilos [%]</b>	61,9 (59,4-71,8)	71,5 (65,5 -75,5)	0,05
<b>Eosinófilos [%]</b>	1,9 (1,7-3,5)	3,0 (1,7-4,1)	ns
<b>Basófilos [%]</b>	0,5 (0,3-0,6)	0,5 (0,4-0,5)	ns
<b>Linfocitos [%]</b>	27,0 (19,0-29,0)	18,6 (14,4-26,7)	0,01
<b>Monocitos [%]</b>	6,8 (4,0-8,8)	6,1 (4,8-7,7)	ns

Tabla 5: Elementos figurados de la sangre correspondiente a Pacientes con TB y Controles (porcentajes)

Al analizar estas variables en los pacientes según la severidad de la TB pulmonar, (tablas 6 y 7), se observó un claro aumento de neutrófilos y una marcada disminución de los linfocitos en aquellos individuos cuyo compromiso pulmonar fue mayor (severos), en ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas. Asimismo este grupo de pacientes mostró valores plaquetarios significativamente aumentados respecto de los demás grupos.

	Controles	TB			p
	n=13	Leves n=8	Moderados n=9	Severos n=5	
<b>Glóbulos Rojos</b> [10 <sup>6</sup> cél/μl]	4,8 (4,3-5,1)	4,9 (4,7-5,0)	4,5 (4,3-4,8)	4,6 (4,2-5,1)	ns
<b>Hemoglobina</b> [g/dl]	14,4 (12,6-14,7)	13,6 (13,1-14,1)	12,7 (11,7-14,0)	12,2 (12,0-13,1)	ns
<b>Blancos totales</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	7,0 * (6,0-8,2)	7,2 (6,7-8,4)	9,0 (6,9-10,9)	10,4 (9,3-11,4)	0,01
<b>Neutrófilos</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	4,4 * (4,0-5,2)	5,2 (4,2-6,0)	4,4 (4,1-7,0)	8,7 (6,7-13,0)	0,02
<b>Eosinófilos</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	0,1 (0,1-0,3)	0,3 (0,1-0,4)	0,2 (0,2-0,4)	0,04 (0,01-0,24)	ns
<b>Basófilos</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	0,04 (0,02-0,04)	0,04 (0,04-0,04)	0,05 (0,03-0,06)	0,3 (0,3-0,5)	ns
<b>Linfocitos</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	1,8 (1,5-2,3)	1,6 (1,5-2,1)	1,8 (1,1-2,0)	1,1 (1,1-1,1)	ns
<b>Monocitos</b> [10 <sup>3</sup> cél/μl]	0,43 (0,38-0,58)	0,46 (0,34-0,7)	0,54 (0,47-0,70)	0,52 (0,21-0,70)	ns
<b>Plaquetas</b>	250,0 *# (208,0-294,0)	316,5 (251,5-348,5)	449,0 (270,5-477,5)	569,5 (528,0-606,0)	0,01

Tabla 6: Elementos figurados de la sangre correspondientes a pacientes con TB separados por severidad y Controles. (valores totales).

\*Diferente de severos p<0,01; # Diferentes de moderados p<0,05.

	Controles	TB			p
		Leves n=8	Moderados n=9	Severos n=5	
<b>Neutrófilos [%]</b>	61,9* (59,4-71,8)	67,0* (61,4-73,6)	67,1* (65,9-73,0)	86,0 (79,5-88,7)	0,01
<b>Eosinófilos [%]</b>	1,9 (1,7-3,5)	3,8 (1,9-5,6)	3,4 (2,7-4,1)	0,2 (0,1-2,2)	ns
<b>Basófilos [%]</b>	0,5 (0,3-0,6)	0,5 (0,4-0,5)	0,5 (0,4-0,6)	0,3 (0,0-0,6)	ns
<b>Linfocitos [%]</b>	27,0* (19,0-29,0)	24,0* (17,3-28,0)	20,0* (17,7-21,7)	10,1 (6,7-11,0)	0,002
<b>Monocitos [%]</b>	6,8 (4,0-8,8)	6,0 (5,4-7,4)	7,1 (5,7-8,2)	4,1 (2,8-6,0)	ns

Tabla 7: Elementos figurados de la sangre correspondientes a pacientes con TB separados por severidad y Controles. (Porcentajes).

\*Diferente de severos p<0,01.

Con respecto al análisis de las subpoblaciones de células T determinadas por citometría de flujo, (tabla 8), el porcentaje de células CD3+ no difirió entre Pacientes y Controles, pero sí se observó una leve disminución en la subpoblación CD3+CD4+ en las muestras de sangre provenientes del grupo TB, sin modificaciones significativas en el porcentaje de células CD3+CD8+. De acuerdo a esto, el cociente CD3+CD4+/CD3+CD8+ mostró una tendencia a disminuir en los pacientes con respecto al grupo Control.

Al realizar el mismo análisis considerando el grado de compromiso pulmonar, no se vieron diferencias entre los grupos de estudio (resultados no presentados).

	Controles n=15	TB n=24	p
<b>CD3+ [%]</b>	74,00 (65,27 -78,95)	71,82 (65,04-73,91)	ns
<b>CD3+CD4+ [%]</b>	43,37 (39,64-48,10)	35,42 (24,70-41,66)	0,05
<b>CD3+CD8+ [%]</b>	17,67 (16,51-21,51)	24,06 (17,82-37,00)	ns
<b>CD4+/CD8+</b>	2,24 (1,89-3,00)	1,64 (0,81-2,32)	0.05

Tabla 8: Subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de Pacientes con TB y Controles Sanos.

#### 4.1.2. Capacidad blastogénica de las CMP de Sujetos Sanos y Pacientes con TB pulmonar frente a Mtb sonicado.

Como puede observarse en la Figura 7 tanto las CMP de Pacientes como de Controles mostraron la capacidad de proliferar *in vitro* cuando se estimularon con el antígeno específico. Sin embargo sólo las CMP procedentes de pacientes con TB pulmonar severa presentaron menor blastogénesis al compararse con cultivos del grupo Control. Esta inhibición en la linfoproliferación específica también se observó con respecto a las células provenientes de sujetos con TB pulmonar leve y moderada.

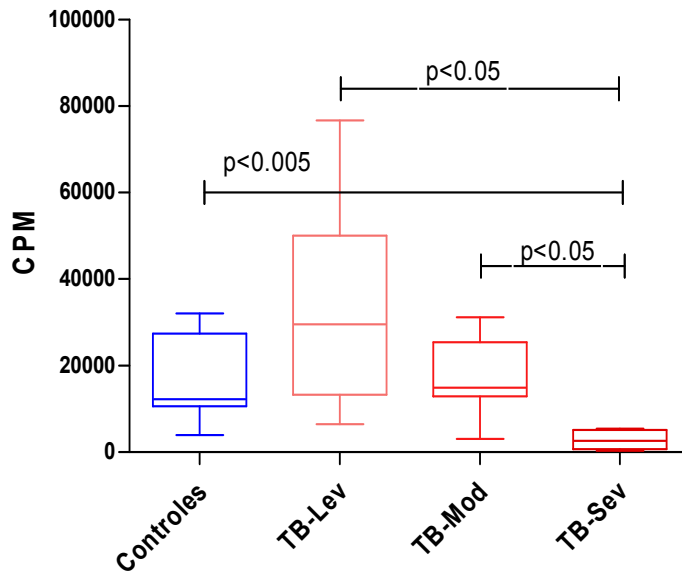


Figura 7: Linfoproliferación de CMP estimuladas con Mtb muerto por calor y sonicado provenientes de Sujetos Sanos (Controles) y Pacientes con TB pulmonar separados de acuerdo al grado de afectación pulmonar (TB-Lev: Pacientes con TB Leve; TB-Mod: Pacientes con TB moderada y TB-Sev: Pacientes con TB Severa). cpm: cuentas por minuto.

Cpm de cultivos sin estimular Mediana (rango): Control 682,90 (400,4-981,7); TB-Lev 940,4 (604,3-1574,0); TB-Mod 638,0 (431,2-1197,0); TB-Sev 408,94 (258,9-665,2).

Como habíamos observado en estudios previos, el Cortisol era capaz de disminuir significativamente la linfoproliferación y esta disminución se encontraba aún más marcada en pacientes con tuberculosis pulmonar, mientras que la DHEA no modificaba dicha proliferación celular (143). En función de ello, se planteó que esa disminución podría estar asociada a un aumento en la muerte celular programada o apoptosis. Para evaluar esta



hipótesis se decidió estudiar el efecto que producían ambas hormonas en el proceso de apoptosis de CMP proveniente tanto de Pacientes con TB como de Controles. Una vez seleccionados los voluntarios, se procedió a evaluar la apoptosis de las mencionadas células por medio de dos métodos de citometría de flujo, cuyos resultados se detallan a continuación.

#### **4.1.3. Efecto del Cortisol y Dehidroepiandrosterona sobre la apoptosis temprana de CMP de Controles y Pacientes con TB.**

En una primera etapa, para la evaluación de apoptosis temprana se utilizó la técnica de marcación con Anexina V en combinación con Ioduro de Propidio (Para más detalle sobre la técnica ver Materiales y Métodos ítem 3.10).

En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de CMP apoptóticas a las 24 h de cultivo, de Pacientes y Controles, estimuladas o no con Mtb sonificado (Tso) y co-cultivadas con Cortisol  $10^{-6}$  M y DHEA  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M. Como puede observarse, la proporción de células apoptóticas fue significativamente superior en la mayoría de los cultivos provenientes de muestras obtenidas de Pacientes. Este efecto se manifestó aun en los cultivos que no recibieron estímulo (basales).

La adición del antígeno no modificó el porcentaje de apoptosis entre las CMP de los Controles, observándose un ligero incremento ( $p < 0,05$ ) en aquellas células provenientes de Pacientes. El co-cultivo con Cortisol  $10^{-6}$  M aumentó la proporción de apoptosis, siendo este efecto más evidente en los cultivos de células provenientes de sujetos sanos, estimulados ( $p < 0,001$ ) o no con Tso ( $p < 0,0001$ ). Las distintas concentraciones de DHEA utilizadas no modificaron los porcentajes de apoptosis obtenidos tanto en los cultivos basales como en aquellos expuestos al Mtb.

Estímulo	Hormona		Grupo		p
	Cortisol	DHEA	Controles n=15	TB n=21	
-	-	-	19,00 (16,90-25,1)	24,20 (20,33-30,00)	0,05
Tso	-	-	19,40 (17,00-26,60)	28,00* 20,10-29,80	0,05
Tso	10 <sup>-6</sup> M	-	26,60 § (18,30-35,10)	29,60 (25,30-34,30)	ns
Tso	-	10 <sup>-7</sup> M	20,30 (17,00-29,79)	26,80 (21,50-29,80)	0,05
		10 <sup>-8</sup> M	19,10 (16,90-25,60)	27,20 (21,60-30,50)	0,01
		10 <sup>-9</sup> M	18,40 (16,30-29,70)	28,20 (19,80-31,70)	0,03
-	10 <sup>-6</sup> M	-	24,00¶ (18,30-31,00)	26,75* (20,88-32,95)	ns
-	10 <sup>-7</sup> M	-	21,10¶ (16,7-30,10)	22,65 (19,38-31,43)	ns
-	-	10 <sup>-7</sup> M	21,10 (15,20-27,20)	23,65 (15,83-29,28)	ns

Tabla 9: Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de 24 h de CMP provenientes de Pacientes y Controles estimulados *in vitro* con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y adicionados con Cortisol o distintas concentraciones de DHEA.

Los datos se expresan como mediana (rango intercuartil). Comparaciones dentro de Grupos: Diferente de cultivo sin estimular \* p<0,05; ¶ p<0,0001. Diferente de cultivo estimulado con Tso § p<0,05; ¶ p<0,001. TB, tuberculosis.

En la Tabla 10 se muestran los resultados correspondientes al efecto de la adición del Cortisol 10<sup>-6</sup> M y su combinación con las distintas concentraciones de DHEA, sobre la inducción de apoptosis en los cultivos específicamente estimulados. Como puede observarse, la DHEA no modificó la proporción de células apoptóticas de cultivos basales ni revirtió el efecto proapoptótico del Cortisol observado en las CMP incubadas provenientes de Controles.

Estímulo	Hormona		Grupo		p
	Cortisol	DHEA	Controles n=15	TB n=21	
Tso	-	-	19,40 (17,00-26,60)	28,00 20,10-29,80	0,05
Tso	10 <sup>-6</sup> M	-	26,60 § (18,30-35,10)	29,60 (25,30-34,30)	ns
Tso	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	21,00 (20,30-31,70)	28,45 (23,30-33,30)	0,05
		10 <sup>-8</sup> M	21,30 (20,20-28,60)	27,80 (22,80-34,10)	0,01
		10 <sup>-9</sup> M	24,40 (19,30-30,00)	30,30 (22,50-35,40)	0,03

*Tabla 10:* Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de 24 h de CMP provenientes de Pacientes y Controles estimulados *in vitro* con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y adicionados con Cortisol o distintas concentraciones de DHEA.

Los datos se expresan como mediana (rango intercuartil). §Diferente de cultivo estimulado con Tso p<0,05. TB, tuberculosis.

Como se mencionó anteriormente, el porcentaje de apoptosis en los cultivos de CMP del grupo TB fue superior al observado en aquellos de Sujetos Sanos, siendo este efecto más evidente en los pacientes con TB leve y moderada, para todos los tratamientos a los cuales fueron expuestas las CMP. El efecto proapoptótico del Cortisol sobre los cultivos estimulados de células mononucleares provenientes de Controles también se observó en CMP de Pacientes, más aun, en los grupos TB-Leve y TB-Severo; Tabla 11 y 12.

Estímulo	Hormona		Grupos				p
	Cortisol	DHEA	Controles n=15	TB			
				Leves n=8	Moderados n=10	Severos n=4	
-	-	-	19,0 (16,9-25,1)	31,2** (21,3-43,4)	25,3* (22,4-29,6)	21,2 (13,2-40,0)	0,05
Tso	-	-	19,4 (17,0-26,6)	30,0* (19,5-40,6)	28,5** (24,8-29,8)	23,4 (14,3-43,8)	0,05
Tso	10 <sup>-6</sup> M	-	26,6§ (18,3-35,1)	34,2# (25,7-43,8)	29,1 (25,8-34,3)	31,1 (21,8-46,9)	ns
Tso	-	10 <sup>-7</sup> M	20,3 (17,0-29,7)	26,2 (19,2-40,6)	28,5* (25,1-29,8)	28,8 (19,1-43,5)	ns
		10 <sup>-8</sup> M	19,10 (16,9-25,6)	27,90* (21,1-34,9)	29,8** (25,6-30,6)	26,2 (17,3-44,7)	0,05
		10 <sup>-9</sup> M	18,4 (16,3-29,7)	28,2 (19,1-42,3)	30,1** (27,8-31,7)	29,6 (19,5-43,2)	0,05
-	10 <sup>-6</sup> M	-	24,0¶ (18,3-31,0)	37,2* (23,6-43,6)	26,6 (23,0-32,2)	26,90 (17,1-44,1)	ns
-	10 <sup>-7</sup> M	-	21,1 (16,7-30,1)	28,2 (20,1-39,5)	22,7 (20,9-25,2)	21,1 (11,10-31,30)	ns
-	-	10 <sup>-7</sup> M	21,1 (15,2-27,2)	33,1* (16,0-42,6)	24,2 (17,8-29,0)	22,25 (14,4-36,5)	ns

Tabla 11: Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de 24 h de CMP provenientes de Pacientes separados por severidad y Controles, estimuladas *in vitro* con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y adicionados con Cortisol o distintas concentraciones de DHEA.

Los datos se expresan como mediana (rango intercuartil). Comparaciones entre Grupos: Diferente de Control \* p<0,05; \*\*p<0,01; Comparaciones dentro de Grupos: Diferente de cultivo sin estimular ¶ p<0,0001; Diferente de cultivo estimulado con Tso # p<0,05; § p<0,001. TB: tuberculosis.

Estímulo	Hormona		Controles n=15	TB			p
	Cortisol	DHEA		Leves n=8	Moderados n=10	Severos n=4	
Tso	-	-	19,4 (17,0-26,6)	30,0* (19,5-40,6)	28,5** (24,8-29,8)	23,4 (14,3-43,8)	0,05
Tso	10 <sup>-6</sup> M	-	26,6§ (18,3-35,1)	34,2# (25,7-43,8)	29,1 (25,8-34,3)	31,1 (21,8-46,9)	ns
Tso	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	21,0 (20,3-31,7)	32,6* (23,4-44,1)	28,4* (26,6-33,2)	28,2 (18,7-48,5)	ns
		10 <sup>-8</sup> M	21,3 (20,2-28,6)	30,8 (21,7-42,4)	29,9* (26,4-34,7)	28,25 (18,2-46,3)	ns
		10 <sup>-9</sup> M	24,4 (19,3-30,0)	33,3* (22,3-43,1)	31,5* (30,3-35,3)	29,8 (19,0-46,0)	0,05

Tabla 12: Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de 24 h de CMP provenientes de Pacientes separados por severidad y Controles, estimulados *in vitro* con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y adicionados con Cortisol y distintas concentraciones de DHEA.

Los datos se expresan como mediana (rango intercuartil). Comparaciones entre Grupos: Diferente de Control \* p<0,05; \*\*p<0,01; Comparaciones dentro de Grupos: Diferente de cultivo sin estimular ¶ p<0,0001; Diferente de cultivo estimulado con Tso # p<0,05; § p<0,001

TB: tuberculosis.

#### **4.1.4. Efecto del Cortisol y Dehidroepiandrosterona sobre la apoptosis tardía de CMP de Controles y Pacientes con TB.**

El porcentaje de CMP hipodiploides a los 4 días de cultivo, luego de ser estimuladas específicamente y adicionadas con Cortisol y/o DHEA, se muestran en la tabla 13 y 14. Los resultados obtenidos a través del análisis de la proporción de células que exponen Fosfatidil Serina en la cara externa de la membrana plasmática, evaluada mediante la unión de Anexina V como manifestación de procesos apoptóticos tempranos, se vieron ratificados mediante la incorporación de IP al ADN celular y cuantificación de la subpoblación hipodiploide. Es así que el porcentaje de células hipodiploides se manifestó siempre superior en los cultivos celulares provenientes de Pacientes con respecto a aquellos de los Controles, independientemente del tratamiento hormonal al que fueron sometidos.

La estimulación con Mtb sonicado no incrementó la apoptosis de las CMP a los 4 días de cultivo, salvo para el caso de CMP estimuladas con Tso, provenientes de Pacientes y co-cultivadas con Gc  $10^{-6}$  M y DHEA  $10^{-7}$  M, (tabla 14). Tampoco se observaron diferencias al analizar este parámetro en CMP provenientes de Pacientes y de acuerdo a la severidad de la TB pulmonar (resultados no presentados).

Estímulo	Hormona		Grupo		p
	Cortisol	DHEA	Controles n=15	TB n=21	
-	-	-	34,3 (19,4-52,1)	38,1 (28,2-47,3)	ns
Tso	-	-	29,1 (23,9-49,0)	42,6 (27,9-48,4)	ns
Tso	10 <sup>-6</sup> M	-	27,8 (20,3-43,2)	36,6 (29,7-45,3)	ns
Tso	-	10 <sup>-7</sup> M	29,5 (23,0-49,3)	38,3 (28,3-54,2)	ns
		10 <sup>-8</sup> M	31,2 (26,1-50,9)	47,8 (32,1-55,1)	ns
		10 <sup>-9</sup> M	30,7 (22,4-38,2)	43,6 (29,8-55,6)	ns
-	10 <sup>-6</sup> M	-	32,5 (24,0-42,7)	30,7 (25,6-33,8)	ns
-	10 <sup>-7</sup> M	-	29,8 (24,0-48,5)	35,2 (26,6-43,0)	ns
-	-	10 <sup>-7</sup> M	29,0 (23,9-46,5)	37,0 (28,9-51,8)	ns

Tabla 13: Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de 4 días de CMP provenientes de Pacientes y Controles estimulados *in vitro* con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y adicionados con Cortisol o distintas concentraciones de DHEA. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartil).

Estímulo	Hormona		Grupo		p
	Cortisol	DHEA	Controles n=15	TB n=21	
Tso	-	-	29,1 (23,9-49,0)	42,6 (27,9-48,4)	ns
Tso	10 <sup>-6</sup> M	-	27,8 (20,3-43,2)	36,6 (29,7-45,3)	ns
Tso	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	27,3 (23,8-42,3)	39,0 (32,2-53,2)	0,03
		10 <sup>-8</sup> M	28,0 (22,1-43,6)	39,3 (21,2-49,1)	ns
		10 <sup>-9</sup> M	26,2 (23,9-42,6)	35,9 (30,4-44,4)	ns

Tabla 14: Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de 4 días de CMP provenientes de pacientes y Controles estimulados *in vitro* con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y adicionados con Cortisol y distintas concentraciones de DHEA. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartil).

## Capítulo 2

### 4.2. Análisis de los niveles plasmáticos de Cortisol, DHEA y DHEA-S, y su relación con la producción de IFN- $\gamma$ en cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes de primer grado.

Por las características de la TB humana, donde se hace imposible definir el tiempo transcurrido entre el contacto con la micobacteria y la manifestación de la patología fue necesario (para elucidar las modificaciones producidas en el tiempo respecto de la respuesta inmune antituberculosa), estudiar individuos con exposición conocida, esto es, los convivientes íntimos de pacientes bacilíferos sin signos y síntomas de enfermedad (sujetos inmunoprottegidos). Dado que un porcentaje de ellos desarrollan TB sub-clínica o auto controlada, decidimos ampliar los estudios realizados en pacientes con respecto a los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S como así también evaluar las concentraciones de IFN- $\gamma$  una citocina del patrón Th1 relevante en esta patología.

#### 4.2.1. Descripción de la Población estudiada

Conjuntamente con los Controles y los Pacientes con TB pulmonar, se estudiaron 20 Convivientes de éstos últimos cuyas edades y distribución por sexo se muestran en la siguiente tabla:

	Grupos				
	Controles	TB			Convivientes
		Leves	Moderados	Severos	
<b>Edad (Promedio <math>\pm</math>DE años)</b>	37,08 $\pm$ 12,57	35,56 $\pm$ 16,76	38,93 $\pm$ 17,93	38,93 $\pm$ 17,93	47,45 $\pm$ 14,44
<b>Sexo M/F</b>	12/6	9/4	11/4	6/2	6/14

Tabla 15: Descripción general de la muestra poblacional estudiada. DE: desvío estandar

A partir de la extracción sanguínea se analizaron las características del hemograma y fórmula, cuyos valores absolutos y porcentajes se muestran a continuación, tablas 16 y 17 respectivamente.

Como podemos observar no se presentaron diferencias significativas en cuanto a los glóbulos rojos, hemoglobina o glóbulos blancos totales, en cambio las plaquetas

estuvieron significativamente aumentadas en los pacientes con respecto a los Controles o Convivientes, Tabla 16

	Convivientes n=20	TB n=28	Controles n=14	p
<b>Glóbulos Rojos 10<sup>6</sup> cél/mm<sup>3</sup></b>	4,5 (4,2-5,0)	4,7 (4,5-5,0)	4,8 (4,3-5,1)	ns
<b>Hemoglobina g/dl</b>	13,2 (12,5-14,5)	13,3 (12,1-14,0)	14,4 (12,6-14,7)	ns
<b>Blancos totales 10<sup>3</sup> cél/mm<sup>3</sup></b>	6,73 (5,6-9,2)	8,8 (6,7-10,9)	7,0 (6,0-8,2)	ns
<b>Plaquetas</b>	248,5 (190,0-290,0)	394,0 (281,0-528,0)	250,0 (208,0-294,0)	0,05

Tabla 16: Elementos figurados de la sangre correspondientes a pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes. (Valores totales)

Al analizar la proporción de neutrófilos respecto al total de glóbulos blancos (porcentaje), los pacientes tuberculosos presentaron, en su mayoría valores superiores a los considerados normales (45-65 %, referencia Laboratorio Central-Hospital Provincial del Centenario) y con diferencias significativas con respecto a Controles y Convivientes. Por otra parte, este último grupo presentó los mayores valores de basófilos.

En cuanto a los linfocitos se evidenció un valor inferior al normal (25-35 %, referencia Laboratorio Central-Hospital Provincial del Centenario) en los pacientes, observándose una disminución significativa con respecto a los Controles y a Convivientes.

	Convivientes n=20	TB n=28	Controles n=14	p
<b>Neutrófilos[%]</b>	53,8 (48,5-60,8)	71,5 (65,5 -75,5)	61,9 (59,4-71,8)	0,01
<b>Basófilos [%]</b>	0,6 (0,5-0,9)	0,5 (0,4-0,5)	0,5 (0,3-0,6)	0,03
<b>Eosinófilos [%]</b>	3,3 (2,0-5,2)	3,0 (1,7-4,1)	1,9 (1,7-3,5)	ns
<b>Linfocitos [%]</b>	32,5 (29,7-39,2)	18,6 (14,4-26,7)	27,0 (19,0-29,0)	0,01
<b>Monocitos [%]</b>	4,9 (4,1-7,5)	6,1 (4,8-7,7)	6,8 (4,0-8,8)	ns

Tabla 17: Elementos figurados de la sangre correspondientes a pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes. (Porcentajes)



Si clasificamos a los Pacientes de acuerdo a la severidad de su afección pulmonar podemos mencionar que en los individuos con TB Severa se observaron los mayores valores de glóbulos blancos totales, mientras que las plaquetas estuvieron aumentadas tanto en pacientes Severos como en Moderados.

	Convivientes n=20	TB			Controles n=14	p
		Leves n=10	Moderados n=12	Severos n=6		
<b>Glóbulos Rojos</b> 10 <sup>6</sup> cél/mm <sup>3</sup>	4,5 (4,2-5,0)	4,8 (4,7-5,0)	4,6 (4,4-5,2)	4,6 (4,3-5,0)	4,8 (4,3-5,1)	ns
<b>Hemoglobina</b> g/dl	13,2 (12,5-14,5)	13,5 (12,2-14,3)	13,5 (11,7-14,8)	12,4 (11,8-13,3)	14,4 (12,6-14,7)	ns
<b>Blancos totales</b> 10 <sup>3</sup> cél/mm <sup>3</sup>	6,73 (5,6-9,2)	7,2 (6,7-8,4)	9,0 (6,9-10,9)	10,4 (9,3-11,4)	7,0 (6,0-8,2)	0,001
<b>Plaquetas</b>	248 (190-290)	324 (249-384)	431 (293-481)	373 (318-549)	250 (208-294)	0,001

Tabla 16: Elementos figurados de la sangre correspondientes a pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes. (Valores totales)

En la tabla 17 se detallan las poblaciones celulares de acuerdo a la severidad de los pacientes, fueron los individuos con TB severa los que presentaron mayores valores de neutrófilos y menores de linfocitos y basófilos con respecto al resto de los grupos.

	Convivientes	TB			Controles n=14	P
		Leves n=10	Moderados n=12	Severos n=6		
<b>Neutrófilos</b> [%]	53,8 (48,5-60,8)	66,8 (60,0-72,8)	71,3 (66,0-74,6)	73,9 (70,0-79,5)	61,9 (59,4-71,8)	0,001
<b>Basófilos</b> [%]	0,6 (0,5-0,9)	0,5 (0,4-0,6)	0,5 (0,4-0,6)	0,3 (0,3-0,5)	0,5 (0,3-0,6)	0,005
<b>Eosinófilos</b> [%]	3,3 (2,0-5,2)	2,9 (2,5-5,5)	2,2 (1,1-3,5)	2,95 (1,1-4,5)	6,8 (4,0-8,8)	ns
<b>Linfocitos</b> [%]	32,5 (29,7-39,2)	21,3 (17,2-28,8)	18,2 (16,9-20,0)	14,8 (11,6-17,3)	0,5 (0,3-0,6)	0,001
<b>Monocitos</b> [%]	4,9 (4,1-7,5)	5,9 (5,2-7,1)	7,4 (6,1-8,6)	6,8 (4,4-8,6)	1,9 (1,7-3,5)	ns

Tabla 17: Elementos figurados de la sangre correspondientes a pacientes con TB pulmonar, separados por severidad, Controles y Convivientes. (Porcentajes)

#### **4.2.2. Cuantificación plasmática de DHEA, DHEA-S y Cortisol**

Con el objetivo de realizar un perfil endócrino, particularmente relacionado con el eje HPA, tanto en los grupos de Pacientes y Controles como así también de los Convivientes se determinaron las concentraciones plasmáticas de Cortisol, DHEA y DHEA-S.

Los resultados de las mencionadas determinaciones se muestran en la tabla 18, como puede observarse, los niveles medios de Cortisol de aquellos pacientes con TB-Severa fueron significativamente superiores a los hallados tanto en Controles como en Convivientes. Asimismo dentro del grupo de Pacientes aquellos con TB-Leve presentaron las concentraciones plasmáticas más bajas, siendo estadísticamente significativas al compararlas con los TB-Severos.

Mientras que las concentraciones de DHEA-S no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos; los niveles de DHEA en el plasma de los pacientes fueron menores que los de los Controles. Por otro lado los Convivientes presentaron una reducción de aproximadamente el 50% en los valores de esta hormona al compararlos con los Controles y además estas concentraciones no difirieron de las halladas en los distintos grupos de pacientes.

La mayor relación Cortisol/DHEA se observó en los Pacientes al compararla tanto con la de los Controles, como con la de los Convivientes, y a su vez, este último grupo presentó una relación mayor a la de Controles. Al evaluar la relación DHEA-S/DHEA sólo pudo observarse un aumento de la misma en los Pacientes severos que fue cercana al significado estadístico, con respecto al resto de los grupos.

Hormonas	Grupos				
	Controles n=14	Convivientes n=20	TB		
			Leves n=13	Moderados n=14	Severos n=7
Cortisol (ng/ml)	119,2±12,8	111,3±10,4	104,0±12,1	145,1±12,8*	219±62**
DHEA (ng/ml)	11,60±2,70 †	5,84±0,99	4,46±0,73	4,18±0,70	3,89±1,00
DHEA-S (µg/ml)	1,33±0,26	1,05±0,17	0,65±0,18	0,97±0,30	1,19±0,16
Relación Cortisol/DHEA	19,28±5,73†	29,13±6,04#	29,99±10,14	47,10±8,00	72,70±16,25
Relación DHEA-S/DHEA	173,4±27,1	245,1±45,9	174,9±39,6	293,2±49,5	395,1±77,0 §

Tabla 18: Niveles plasmáticos de Cortisol, DHEA y DHEA-S y Relaciones Cortisol/DHEA; DHEA-S/DHEA en Controles, Convivientes y Pacientes discriminados por severidad. Los datos se representan como media ± error estándar.

\* Diferente de Convivientes,  $p < 0,04$ ; \*\* Diferente de los restantes grupos,  $p < 0,01$ ; †  $p < 0,02$ ; §  $p = 0,05$ ; # Diferente de Controles y de Pacientes moderados y severos  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3. Respuesta Proliferativa antígeno-específica de CMP provenientes de Pacientes con TB pulmonar, Convivientes y Controles.

Una vez analizado el perfil endócrino de Pacientes, Convivientes y Controles, se decidió investigar la capacidad linfoproliferativa de las CMP de estos individuos, la misma se evaluó frente al antígeno específico (Tso) y frente a un mitógeno como es la Concanavalina A (Con A).

En la tabla 19 se expresan los resultados como Índice de Estimulación (Linfoproliferación frente a Tso/Linfoproliferación basal) y como índice Con A (Linfoproliferación frente a Con A/ linfoproliferación basal)

Grupos	Índice de Estimulación	Índice ConA
<b>Controles</b> n=13	18,8 (11,9-40,9)	66,5 (20,3-119,3)
<b>Convivientes</b> n=19	28,6 (14,1-65,2)	64,4 (51,5-142,5)
<b>TB-Leves</b> n=13	21,7 (11,9-38,6)	43,0 (23,7-71,1)
<b>TB-Moderados</b> n=13	19,2 (14,0-30,2)	56,6 (9,8-80,4)
<b>TB-Severos</b> n=8	7,26 * (3,4-11,2)	15,1 ** (10,9-39,08)

*Tabla 19:* Respuesta linfoproliferativa de CMP de Pacientes con TB pulmonar, Controles y Convivientes frente al antígeno específico (Tso) y frente a Con A. Los datos correspondientes al índice de estimulación se calcularon como la relación de las cuentas por minuto (cpm) de los cultivos estimulados con Tso/cpm de cultivos sin estimular y los correspondientes al índice Con A como cpm cultivos estimulados con Con A/cpm cultivos sin estimular. Los mismos se representan como mediana (rango intercuartil)

\* Diferente de los grupos restantes.  $n < 0.02$ ; \*\*  $n < 0.04$

Con respecto a los cultivos estimulados con Tso se pudo observar que los Pacientes con TB severa presentaron una respuesta linfoproliferativa significativamente menor que el resto de los grupos estudiados. Por otro lado las células provenientes de los Convivientes mostraron mayores valores de proliferación antígeno-específica que los Controles aunque la diferencia no llegó a ser significativa.

Si observamos la respuesta frente al mitógeno (Con A) también pudo corroborarse una menor respuesta en el grupo de los Pacientes Severos.

#### **4.2.4. Cuantificación de los niveles de IFN- $\gamma$ en cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar, Convivientes y Controles, estimuladas con Tso y adicionadas con Cortisol y/o DHEA**

Como se muestra en la Tabla 20, la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las CMP estimuladas con Tso y provenientes de Convivientes fue significativamente superior que la de las CMP del resto de los grupos estudiados. El tratamiento con Cortisol indujo una reducción en la síntesis de esta citocina en todos los grupos al comparar con aquellos cultivos estimulados y sin hormonas, a su vez si comparamos entre grupos las células de Convivientes y Pacientes Leves mostraron una producción aumentada de IFN- $\gamma$  con respecto a la del

resto. Al cocultivar las células estimuladas y adicionadas con Cortisol, con las distintas dosis de DHEA se mantuvo la reducción observada en los cultivos estimulados y con Cortisol.

Estimulo	Hormonas		Grupos				p	
	Cortisol	DHEA	Controles n=18	TB				Convivientes n=13
				Leves ¶ n=13	Moderados ¶ n=15	Severos ¶ n=8		
-	-	-	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-9)	4 (4-28)	8 (4-25)	ns
Tso	-	-	782 (416-1227)	1775 (616-2779)	1202 (656-2764)	807 (287-957)	2670 # (1313-6206)	0,001
	10 <sup>-6</sup> M	-	264§ (97-483)	671 § (238-1020)	234 § (57-812)	63 † (10-331)	630‡ (146-1743)	0,05
	-	10 <sup>-7</sup> M	804 (311-1115)	1453 (388-3039)	1111* (448-1677)	722 (268-941)	1966* (896-5716)	0,025
		10 <sup>-8</sup> M	654** (250-1061)	1760 (502-3450)	893* (496-1878)	648 (192-924)	3439 (1404-5303)	0,005
		10 <sup>-9</sup> M	718 (338-1295)	1794 (598-3632)	1070* (585-1912)	623 (136-956)	3978 (1687-5950)	0,001
	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	238§ (69-452)	589 (281-1006)	209§ (79-427)	34† (9-303)	588** (215-2715)	0,01
		10 <sup>-8</sup> M	226§ (82-502)	559 (316-1073)	145§ (72-524)	48† (9-251)	525‡ (206-2200)	0,01
		10 <sup>-9</sup> M	199§ (82-523)	915 (306-1156)	354§ (97-599)	45† (9-290)	467‡ (94-3475)	0,05

Tabla 20: Niveles de IFN-γ (pg/ml), en cultivos de CMP estimuladas con Tso durante 4 días, de pacientes con TB, Convivientes y Controles y adicionadas con Cortisol y/o Dehidroepiandrosterona

Comparación dentro de grupo en referencia al cultivo estimulado sin hormonas: \* p<0,02; \*\* p<0,01; † p<0,005; ‡ p<0,002; § p<0,01. Comparación entre grupos: diferente de Moderados #p<0,05

## CAPITULO 3

---

### **4.3. Efectos de la adición de sobrenadantes de cultivos de CMP de Pacientes con TB pulmonar y Controles sobre la producción de esteroides por la línea celular NCI-H295R.**

En estudios previos observamos modificaciones en la producción de DHEA cuando a la línea adrenal humana NCI-H295R se le adicionaban sobrenadantes de cultivos de CMP provenientes de Controles o Pacientes con TB. Aquellos sobrenadantes provenientes de células de Pacientes que habían sido estimuladas con Tso inhibieron significativamente la producción basal de DHEA; este efecto fue aún mas evidente en condiciones de estimulación con Fk al compararlo con aquellos cultivos tratados con SN provenientes de Controles Sanos (128). Ante lo expuesto se consideró de interés investigar que mediadores secretados por las células periféricas mononucleares (CMP) estarían implicados en la inhibición de la síntesis de DHEA por parte de la línea celular adrenal humana NCI-H295R.

Para cumplimentar este objetivo, fue necesario establecer cuáles eran las condiciones adecuadas para el desarrollo de la línea adrenal a fin de realizar los experimentos previstos y que se detallan en Materiales y Métodos, ítems 3.16 y 3.17.

La línea celular, que se encontraba criopreservada en nitrógeno líquido, se expandió *in vitro* y una vez estabilizado su crecimiento se constató que en las condiciones de trabajo elegidas no se viera modificada la viabilidad celular, que los cultivos exhibieran en los tiempos seleccionados para los experimentos un patrón exponencial de crecimiento y que además la línea conservara la capacidad esteroideogénica tanto en condiciones basales o de estimulación con Fk.

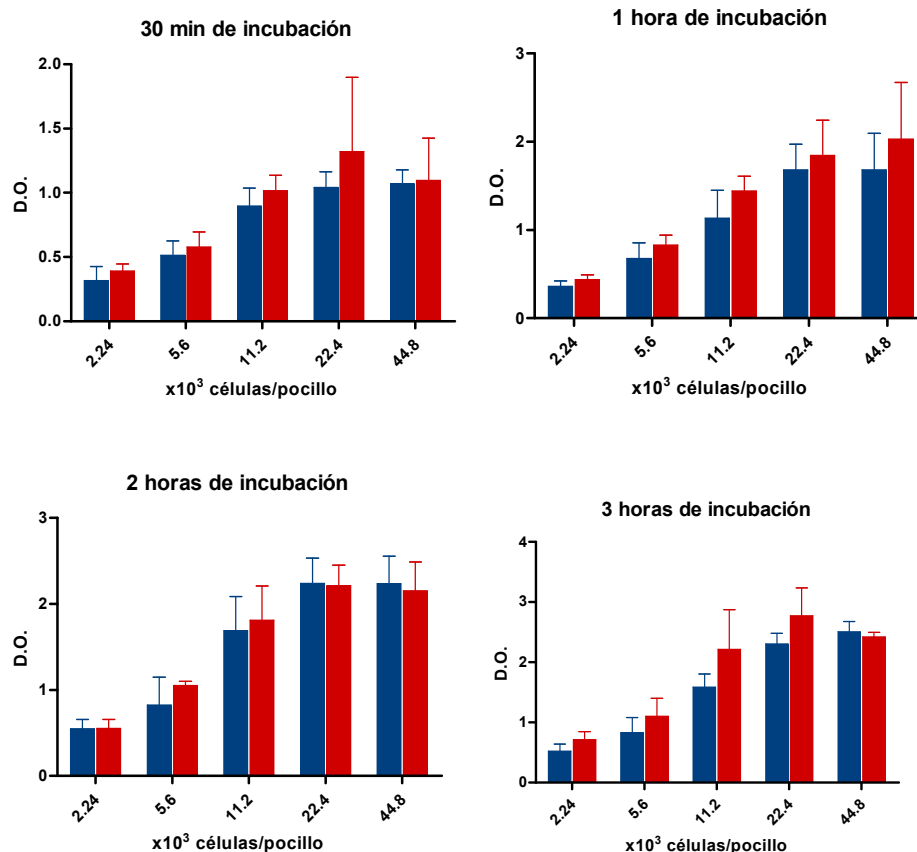
#### **4.3.1. Comportamiento de la línea NCI-H295R en las condiciones experimentales propuestas.**

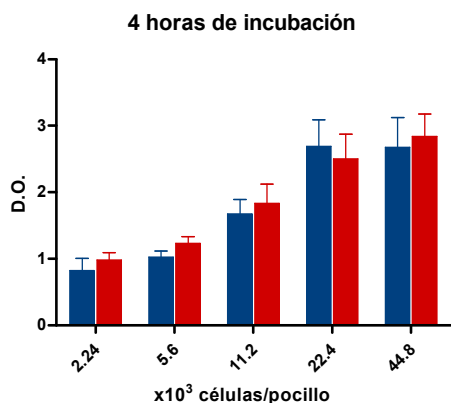
##### **4.3.1.1. Análisis de la viabilidad celular de cultivos de la línea NCI-H295R**

La viabilidad celular fue estimada por medio del ensayo de sales de Metil Tetrazolium (MTT). A fin de conocer si las condiciones de trabajo modificaban la viabilidad de las células en cultivo, se estimó la misma a las 48 h de alcanzado el 70% de subconfluencia, en condiciones basales y de estimulación con Fk. Para cada dosis de siembra y tratamiento se

trabajó con cuatro cultivos independientes de la línea y se realizaron dos vueltas experimentales.

En los ensayos se consideraron dos variables: concentración de células sembradas y tiempo de incubación con MTT, por las características del ensayo, el mismo debió realizarse en policubetas de 96 pocillos. Se utilizaron distintas dosis de siembra, las cuales incluían 22.400 cél/pocillo que se correspondía a la definida como óptima en ensayos previos en placa de 24 pocillos (70.000 cél/cm<sup>2</sup>) y además se incubaron las células a 5 tiempos distintos (Ver ítem 3.14 Materiales y Métodos). Como puede observarse en la figura 8, a medida que aumenta la dosis de siembra mayor es la DO, estabilizándose para las dosis de 22.400 cél/pocillo. Este efecto se observó para todos los tiempos de incubación con MTT estudiados, Además pudo constatar que la viabilidad celular no se vio afectada por el tratamiento con Fk.





*FIGURA 8:* Viabilidad celular en cultivos de la línea NCI-H295R luego de distintos tiempos de incubación con MTT. Los resultados se muestran como promedios  $\pm$  DE de las densidades ópticas (DO) para distintas dosis de siembra, bajo condiciones basales (barras azules) y de estimulación con Fk (barras rojas). Se muestra una de 2 vueltas experimentales (n=4 para cada vuelta)

#### 4.3.1.2. Proliferación de la línea adrenal humana NCI-H295R en diferentes medios de cultivos

Al analizar la curva de crecimiento de la línea celular NCI-H295R, para la siembra de 22.400 cél/pocillos en placa de 96 pocillos se pudo constatar que las células comenzaron a proliferar luego de una semana de cultivo, cuando las mismas alcanzaron el 70% de confluencia (considerado como variable  $t = 0$ ), cuando las células alcanzaron un porcentaje de confluencia del 70 % determinado con microscopio de luz invertida. Dado que en ensayos posteriores las células adrenales se tratarían con los sobrenadantes provenientes de los cultivos de CMP de Pacientes y Controles cultivados en Medio RPMI 1640, suplementado con Atb y SABi (en adelante: RPMI) (ver Materiales y Métodos ítem 3.12) A partir de ese momento, y luego de realizar cambio de medio, a la mitad de los cultivos se les adicionó 50 % de medio RPMI y 50% de medio DMEM/F12 + aditivos (ver Materiales y Métodos ítem 3.13) (En adelante: DMEM) (barras azules), y a la otra mitad sólo DMEM (barras verdes); 24 h más tarde a la mitad de cada uno de los distintos cultivos se los trató con Fk (barras llenas), figura 9.

Como puede observarse, luego del agregado de Fk, en los cultivos de 48 h se evidenció una disminución de la proliferación celular independiente del medio de cultivo utilizado; sin embargo a las 72 h estas diferencias ya no fueron notorias y el desarrollo celular fue mayor cuando se utilizó RPMI. A las 96 h las células crecieron mejor en DMEM.



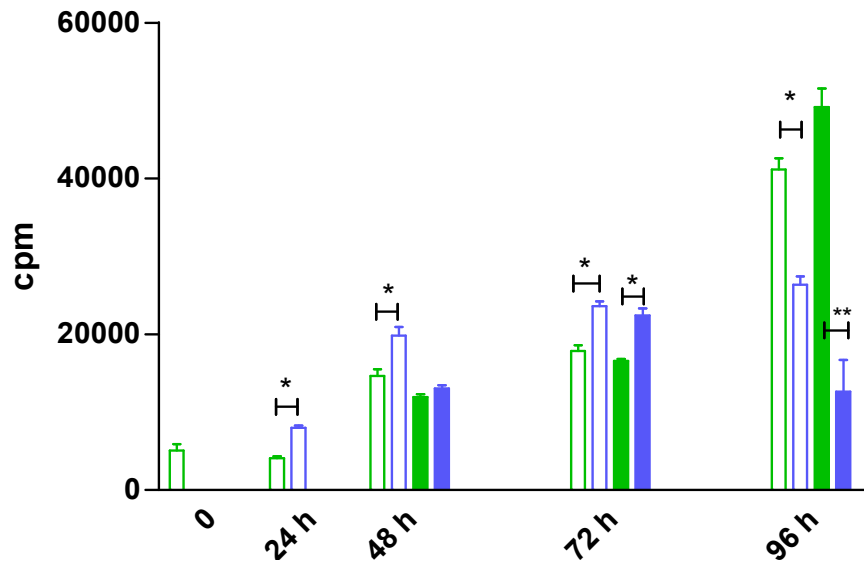


FIGURA 9: Proliferación de la línea celular NCI-H295R, evaluada como incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. Los resultados se muestran como promedios ± EE de las cuentas por minuto (cpm) para cada día de cultivo, t=0 corresponde al 70 % de confluencia para una siembra de 22.400 cél/pocillo en placa de 96 pocillos, bajo condiciones basales (barras vacías) y de estimulación con Fk (barras llenas) y para aquellas células cultivadas en DMEM/F12+aditivos (verde) y 50 % RPMI 1640 + aditivos + 50 % DMEM/F12+aditivos (azul).

\* p<0,05; \*\* p<0,01

Estos resultados confirmaron que durante 72 h luego de alcanzado el 70% de confluencia la línea se desarrollaba bien, aún con el agregado de 50% de medio RPMI.

#### 4.3.1.3. Cuantificación de los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en cultivos de la línea adrenal NCI-H295R

Para la determinación de los niveles de las hormonas adrenales, a las 48 h de alcanzado el 70% de confluencia, se sembraron 70.000 cél/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos. Con respecto al primero de los esteroides estudiados, figura 10, se pudo observar que la producción basal de Cortisol por las células adrenales, fue superior cuando las éstas se cultivaron en 50 % de RPMI, esta diferencia también se observó al adicionar Fk, donde además se comprobó que este activador aumentaba significativamente la producción de Cortisol con respecto a los cultivos que no recibieron el activador Fk.

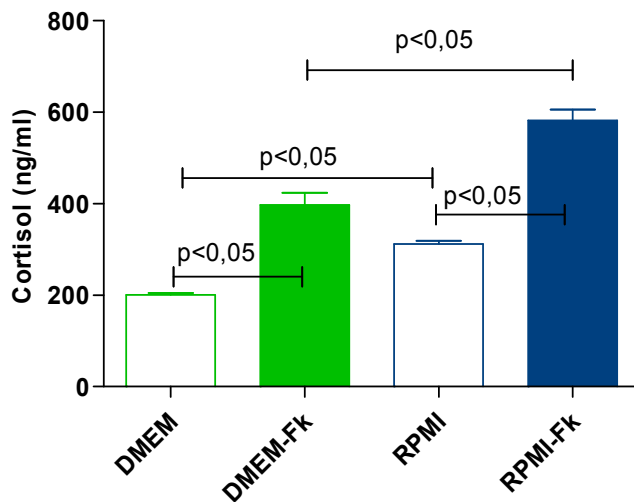
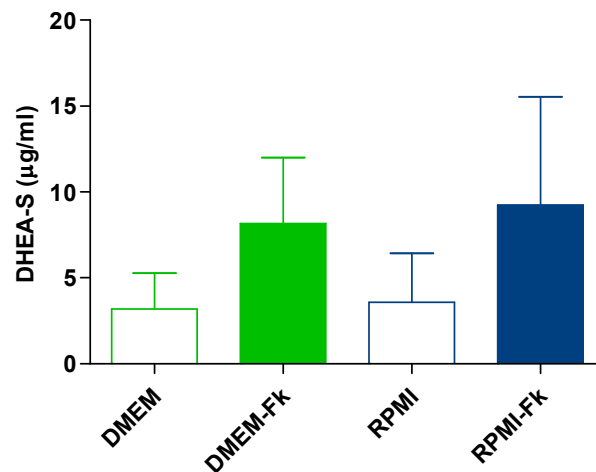
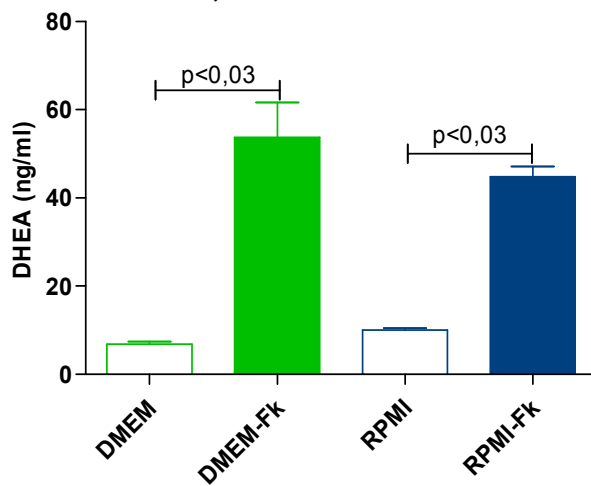


Figura 10: Niveles de Cortisol (ng/ml), DHEA (ng/ml) y DHEA-S ( $\mu\text{g/ml}$ ) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R en DMEM o en 50% RPMI con y sin Fk. Los datos se representan como media y error estándar. Concentración de siembra: 70.000  $\text{cél/cm}^2/200\mu\text{l}$ ; n=4. La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.13)



Las concentraciones de DHEA se vieron aumentadas significativamente como producto de la acción de Fk, sin diferencias en los niveles de esta hormona cuando las células fueron cultivadas en DMEM o 50% RPMI. Una tendencia similar se observó al evaluar los niveles de DHEA-S.

Toda línea celular puede modificar su comportamiento y es indispensable confirmar que mantenga todas las características de la línea originaria, más aún cuando se introduce a otro laboratorio como ocurrió con la línea adrenal NCI-H295R donada al Instituto de Inmunología por la Dra Bornstein. De los resultados expuestos se desprende que esta línea, para la dosis de siembra considerada como óptima: 70.000  $\text{cél/cm}^2/200\mu\text{l}$  llegó al 70% de confluencia en plena fase exponencial de desarrollo y es en esta etapa donde se llevaron a cabo los experimentos que se detallan más abajo (ítem 4.3.2 y 4.3.3). Además

se observó que en las primeras 72 h, luego de alcanzar el 70% de confluencia el crecimiento en el medio con RPMI fue superior al de DMEM, efecto que se invirtió a las 96 h. Esto podría atribuirse a que las células en medio con RPMI alcanzaron antes la confluencia y por su número agotaron los nutrientes del medio de cultivo.

A las 48 h de alcanzar el 70% de confluencia los cultivos tratados con Fk mostraron menor proliferación, lo que se relacionaría con una mayor diferenciación celular, aunque no puede descartarse un aumento de células en apoptosis. Sin embargo la viabilidad celular, analizada por la prueba de MTT, no se modificó por el tratamiento con Fk en los cultivos que crecían en DMEM (Figura 8).

Dado que la línea adrenal se preservó en nitrógeno líquido, luego de expandirla, evaluar su crecimiento y analizar su viabilidad, fue necesario constatar si mantenía la capacidad de síntesis de las hormonas en estudio, así como la estimulación de la esteroidogénesis por el agregado de Fk. Como lo muestran las Figuras precedentes, para las condiciones de trabajo propuestas la línea produce cantidades cuantificables de Cortisol, DHEA y DHEA-S, las que se incrementaron significativamente por el tratamiento con Fk.

En función de los ensayos realizados se consideró que las condiciones de trabajo con la línea eran las óptimas para comenzar a demostrar los objetivos propuestos.

#### **4.3.2. Análisis de la modificación en la producción de esteroides adrenales por sobrenadantes de cultivo de células mononucleares periféricas de Pacientes con tuberculosis pulmonar y Controles.**

En una primera etapa se investigó como los productos de la respuesta inmune específica contra el Mtb modulaban la esteroidogénesis adrenal, centrando la atención en la producción de Cortisol, DHEA y DHEA-S. Para ello se realizaron cultivos de CMP de Pacientes y Controles que fueron estimuladas, durante 24, 36 h y 4 días, con Mtb muerto por calor y sonicado (Tso) y cuyo sobrenadante fue recolectado y almacenado como se detalla en Materiales y Métodos (ítem 3.12). También se realizaron cultivos sin estimular con la micobacteria y se procedió de manera similar.

Los sobrenadantes (SN) correspondientes a los distintos tiempos de cultivo y tratamientos se agruparon conformando *pools*, cada uno de ellos constituido por un mismo volumen

de SN individual. Cada *pool* de SN proveniente de cultivos sin estimular se denominó SN Basal y aquel proveniente de cultivos estimulados, SN Tso.

#### 4.3.2.1. Niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S, en sobrenadantes de la línea adrenal humana NCI-H295R adicionada con SN de CPM de Pacientes y Controles cultivadas durante 36 h.

Como se muestra en la figura 11 A, los niveles de DHEA aumentaron en los medios condicionados provenientes del tratamiento de la línea NCI-H295R con SN basal, tanto en los que fueron estimulados, como así también en los no estimulados con Fk. En cambio un efecto inverso se observó con la adición de SN Tso donde las concentraciones de DHEA disminuyeron significativamente con respecto a los cultivos controles de línea, con y sin la adición de Fk (misma gráfica).

Cuando los cultivos se trataron con SN provenientes de CMP de Pacientes, (Figura 11 B), a diferencia de lo observado en la figura 11 A y para el caso de los cultivos estimulados con Fk, no sólo se constató una inhibición en la producción de DHEA en aquellos cultivos tratados con SN Tso, sino también en los que recibieron SN Basal.

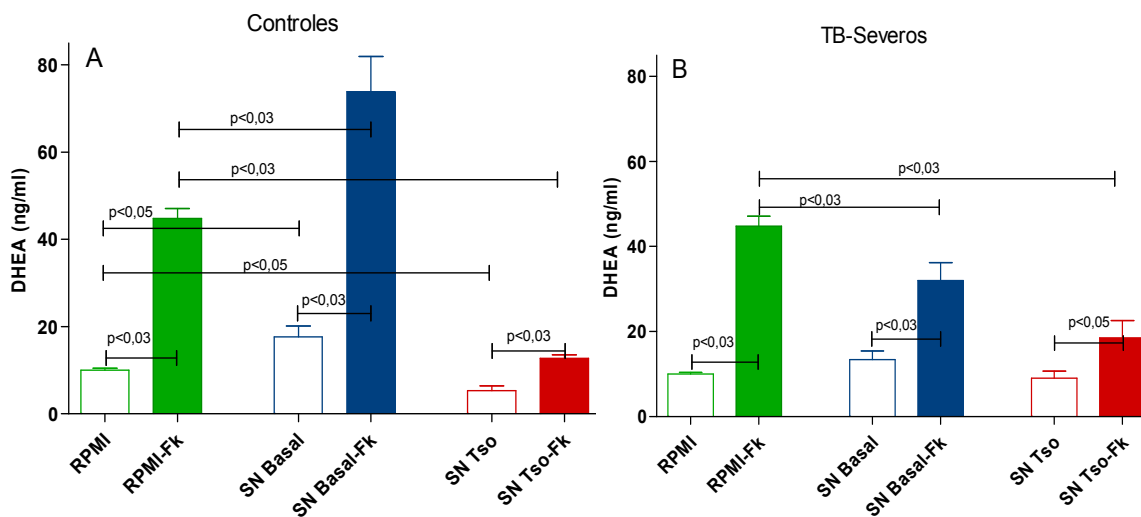


Figura 11: Niveles de DHEA(ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% RPMI (Control de la línea) o SN de CMP provenientes de Controles (A), y pacientes severos (B) cultivados durante 36 h, adicionados o no con Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente). Los datos se representan como media y error estándar. Concentración de siembra: 70.000 cél/cm<sup>2</sup>/200µl; n=4. La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SABI (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

Al evaluar las concentraciones de DHEA-S en los cultivos adicionados con SN provenientes de CMP de Controles, pudo observarse un comportamiento similar al descrito para los niveles de DHEA (figura 12 A); en cambio, al adicionar SN de CMP de Pacientes con TB Severa, solo los SN Tso lograron inhibir la producción de DHEA-S, mostrándose significativa para el caso de los cultivos no tratados con Fk.

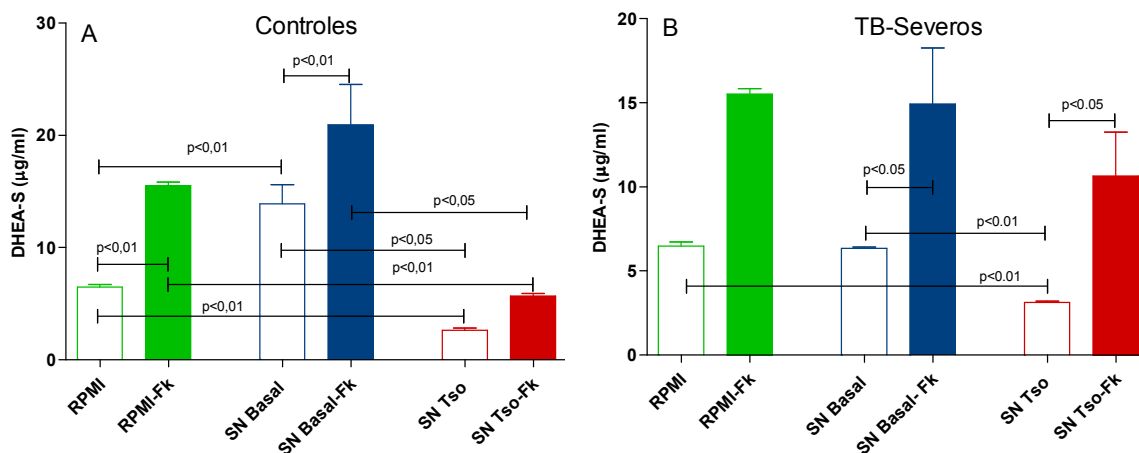


Figura 12: Niveles de DHEA-S ( $\mu\text{g/ml}$ ) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% RPMI (Control de la línea) o SN de CMP provenientes de Controles (A), y Pacientes Severos (B) cultivados durante 36 h, adicionados o no con Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente). Los datos se representan como media y error estándar. Concentración de siembra:  $70.000 \text{ cél/cm}^2/200\mu\text{l}$ ;  $n=4$ . La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

Con respecto a la producción de Cortisol, (figura 13) se observaron aumentos en los niveles del esteroide adrenal en los medios condicionados de la línea, tanto con la adición de SN Basal como de SN Tso. El mismo efecto fue evidenciado para SN provenientes de cultivos de CMP de individuos sanos (figura13 A) así como de pacientes con TB Severa (figura 13 B). Aunque en el primero de los casos (figura13-A), la producción de Cortisol fue significativamente superior en los cultivos tratados con SN Basal-Fk con respecto a SN Tso-Fk.

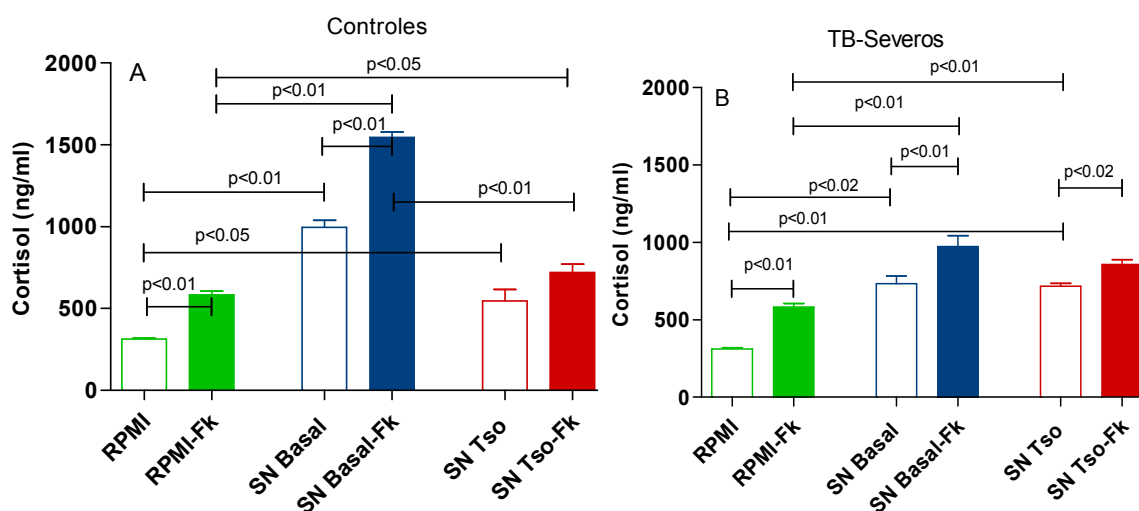


Figura 13: Niveles de Cortisol (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% de RPMI (Control de la Línea) o SN de CMP provenientes de Sujetos Sanos(A) y Pacientes severos (B), adicionados o no con Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente) y cultivadas durante 36 h. Los datos se representan como media y error estándar. Concentración de siembra: 70.000 cél/cm<sup>2</sup>/200μl; n=4. La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + ATB + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

Posteriormente se procedió a investigar la acción de los SN de CMP de Pacientes y Controles cultivadas con y sin estimulación antigénica (SN Tso y SN Basal respectivamente) durante 24 h y 4 días.

#### 4.3.2.2. Niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S, en Sobrenadantes de la línea adrenal humana NCI-H295R adicionada con SN de CPM de Pacientes y Controles, cultivadas durante 24 h.

A continuación se muestran los valores correspondientes a la producción de las tres hormonas esteroideas estudiadas, cuando a la línea se le adicionó SN de CMP de Pacientes y Controles cultivadas durante 24 h.

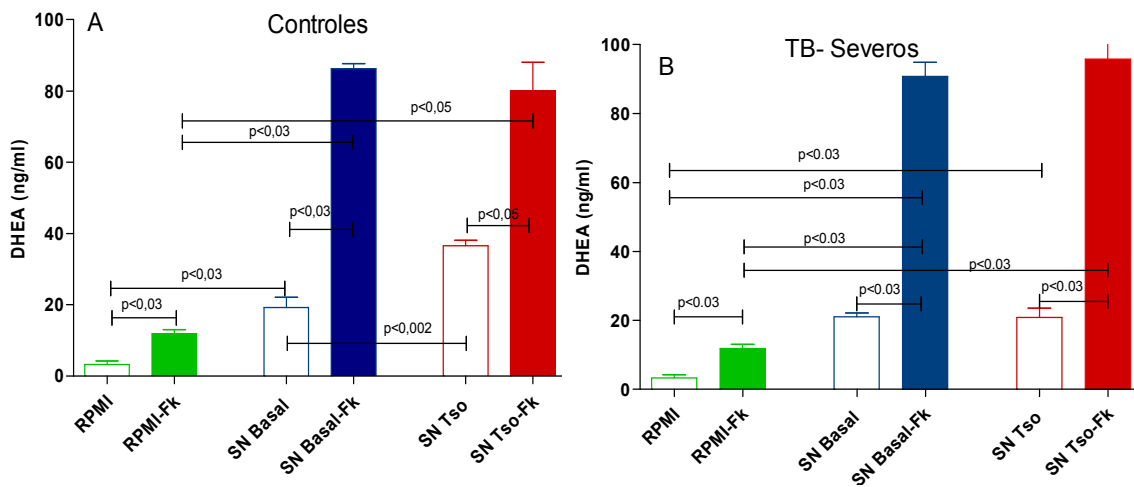


Figura 14: Niveles de Dhea (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% RPMI (Control de la línea) o SN de CMP provenientes de Sujetos Sanos (A) y Pacientes (B), adicionados o no con Tso y cultivadas durante 24 h (SN Basal y SN Tso respectivamente). Los datos se representan como media y error estándar. n=4. Concentración de siembra: 70.000 cél/cm<sup>2</sup>/200μl; La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

Al evaluar los niveles de DHEA producidos por la línea luego de adicionar SN de CMP de Pacientes y Controles cultivadas durante 24 h, observamos en todos los casos un aumento significativo en la producción de este esteroide, siendo ésta mayor en los cultivos tratados con Fk. Aunque no se observaron diferencias atribuibles a la procedencia de los SN, excepto en aquellos cultivos que no recibieron Fk, y que fueron tratados con SN de CMP de Controles, donde solo la adición de SN Tso indujo un aumento en los niveles de DHEA con respecto a los cultivos tratados con SN Basal. Este efecto no pudo ser observado al utilizar SN de CMP de Pacientes.

Con respecto a la producción de DHEA-S su comportamiento fue similar al descrito para DHEA

Al analizar la producción de Cortisol por la línea adrenal al adicionar SN de CMP de Controles (figura 15 A) y Pacientes con TB severa (figura 15 B), cultivadas durante 24 h, pudo observarse que en ambos casos, el agregado de SN, independientemente si provenía de células estimuladas o no con Tso, aumentó significativamente los niveles de este esteroide. Como era de esperarse, el agregado de Fk indujo una mayor producción de Cortisol.

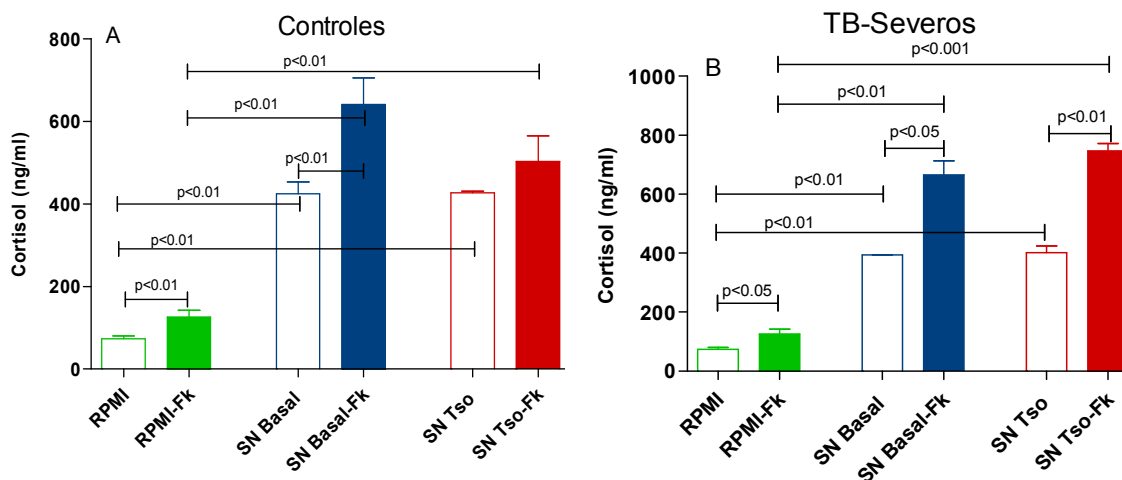


Figura 15: Niveles de Cortisol (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% RPMI (control de línea) o SN de CMP provenientes de Controles (A) y Pacientes severos (B), adicionados o no con Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente) y cultivadas durante 24 h. Los datos se representan como media y error estándar, n=4. Concentración de siembra: 70.000 cél/cm<sup>2</sup>/200µl; La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

Por último, para evaluar si productos de la respuesta inmune adaptativa lograban modificar la síntesis de los tres esteroides estudiados, se procedió a cuantificar la producción de los mismos en aquellos cultivos de la línea celular, adicionados con sobrenadantes de CMP de Controles y Pacientes con TB que fueron cultivados durante 4 días.

#### 4.3.2.3. Niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S, en Sobrenadantes de la línea adrenal humana NCI-H295R adicionada con SN de CPM de Pacientes y Controles cultivadas durante 4 días.

Como se evidencia en la figura 16 A y B, en todos los cultivos, el agregado de Fk aumentó significativamente la síntesis de DHEA, independientemente de la procedencia del SN. Además, tanto la adición de SN de CMP de Controles como de Pacientes, estimuladas o no con Tso, indujo un aumento significativo en la síntesis de esta hormona, y este incremento pudo observarse aún en los cultivos de la línea que no fueron estimulados con Fk. Un comportamiento similar se puso de manifiesto al evaluar los niveles de DHEA-S en los mismos cultivos.



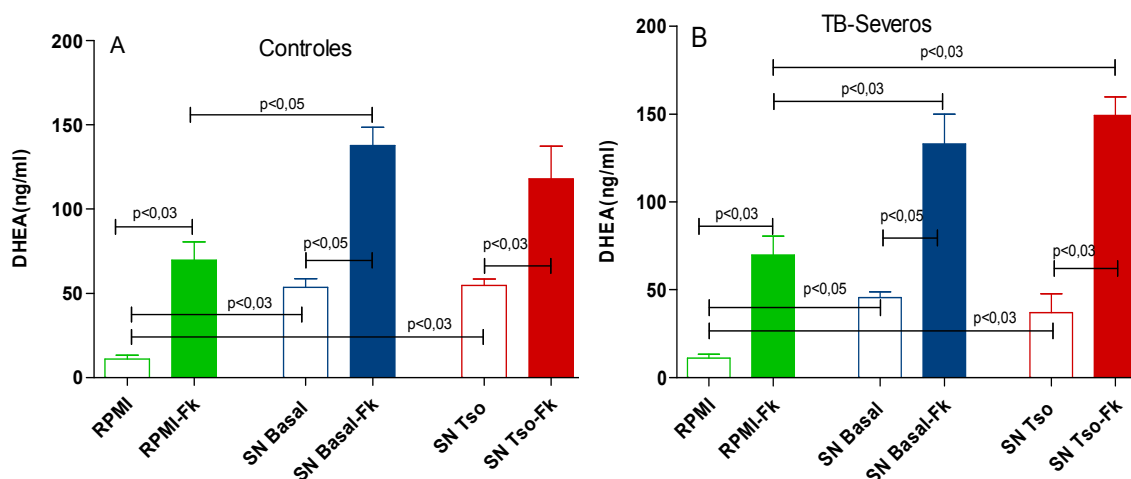
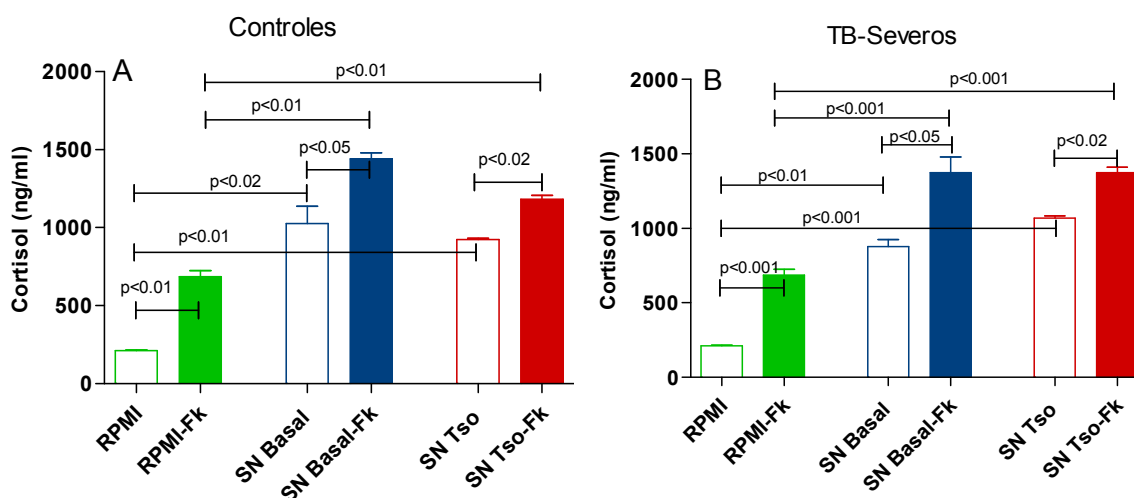


Figura 16: Niveles de Dhea (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% RPMI 1640 (control de línea) o SN de CMP provenientes de Controles (A) y Pacientes (B), adicionados o no con Tso y cultivadas durante 4 días. (SN Basal y SN Tso respectivamente). Los datos se representan como media y error estándar; n=4 Concentración de siembra: 70.000 cél/cm<sup>2</sup>/200μl; La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

La figura 17 muestra la producción de Cortisol en los cultivos de la línea tratados con los mencionados SN. Tanto para el agregado de SN Basal como para el de SN Tso se observó un aumento significativo en los niveles cuantificados de este esteroide ya sea que los SN procediesen de cultivos de CMP de Controles (panel A) o de Pacientes Severos (panel B), este efecto se hizo más evidente con el agregado de Fk.



---

Figura 17: Niveles de Cortisol (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R con y sin Fk, (barras vacías y llenas respectivamente), al adicionar 50% RPMI1640 (Control de línea) o SN de CMP provenientes de Controles (A) y Pacientes severos (B) cultivadas durante 4 días y adicionados o no con Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente). Los datos se representan como media y error estándar; n=4. Concentración de siembra: 70.000 cél/cm<sup>2</sup>/200µl. La cuantificación se realizó a las 48 h luego de alcanzar el 70 % de confluencia. DMEM: medio DMEM/F12+aditivos. RPMI: medio RPMI 1640 + Atb + SAbi (ver Materiales y Métodos ítem 3.12 y 3.13)

---

De acuerdo a los tiempos de cultivo de las CMP y de la procedencia de las mismas, los distintos SN mostraron un efecto diferencial sobre la esteroidogénesis. Los SN de 24 h y 4 días favorecieron tanto la síntesis de DHEA y DHEA-S como de Cortisol, en cambio aquellos de 36 h indujeron una inhibición en la producción de DHEA y DHEA-S, fundamentalmente los SN provenientes de CPM estimuladas con Tso o provenientes de Pacientes Severos. En esta etapa de la respuesta inmune donde priman mediadores de la respuesta innata, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, los mismos podrían modular positivamente la esteroidogénesis. IL-10, TGF- $\beta$  e IL-6 son mediadores producidos durante esta infección con potenciales efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune (63) y los dos últimos con reconocida influencia sobre la síntesis de esteroides (141,142,144), hechos que sugieren que algunos de estos medidores podrían estar implicados en la inhibición de la síntesis de DHEA adrenal.

Como se expresó previamente, TGF- $\beta$  se encuentra incrementado en el plasma de los pacientes con TB, y además es una citocina producida por las CMP de los Pacientes con TB Severa ante la estimulación con Tso, sin embargo la adición de concentraciones fisiológicas de DHEA a estos cultivos inhibió su síntesis. De entre las citocinas con potencial efecto inhibitorio sobre la síntesis de esta hormona adrenal, el TGF- $\beta$  se podría proponer como uno de los responsables.

En esta etapa se investigó si entre las citocinas presentes en los SN de cultivo de CMP de Pacientes y Controles, el TGF- $\beta$  podía inhibir la síntesis de DHEA por parte de la línea adrenal.

Para ello se realizaron cultivos de la línea a los cuales se les adicionaron concentraciones de TGF- $\beta$  recombinante correspondientes a las halladas en los plasmas de Pacientes Severos que fue el grupo que mayores valores plasmáticos arrojó: 6.100 pg/ml, (ver

Materiales y Métodos ítem 3.16 y 3.17), corroborándose la inhibición en la producción de DHEA por parte de la línea adrenal. A continuación se realizó una prueba piloto con distintas relaciones anti-TGF- $\beta$ :TGF $\beta$  de la cual surgieron las concentraciones de anti-TGF- $\beta$  que mostraron revertir el efecto inhibitor del TGF- $\beta$  recombinante, las que se muestran a continuación:

Relación	Anti-TGF- $\beta$ (pg/ml)	TGF- $\beta$ (pg/ml)
25:1	152.500	6.100
10:1	61.000	6.100
1:1	6.100	6.100

En los experimentos donde a la línea se la co-cultivó con SN de CPM de Pacientes y Controles (SN Basal y Tso) sólo se trató a los pooles con anti-TGF- $\beta$ , no se le agregó TGF- $\beta$  recombinante ya que justamente el objetivo de este ensayo fue revertir las modificaciones en la producción de hormonas esteroideas por parte de la línea comentadas anteriormente al adicionar los SN de las CMP.

#### **4.3.3. Análisis de la modificación en la producción de esteroides adrenales por SN de cultivos de CMP de Pacientes con TB y Controles, tratados con anti-TGF- $\beta$**

##### **4.3.3.1. Cuantificación de DHEA, y DHEA-S en cultivos de la línea adrenal NCI-H295R adicionados con *pooles* de SN de CMP provenientes de Pacientes con TB y Controles, cultivadas durante 36 h y tratados con anti-TGF- $\beta$**

Los resultados correspondientes a los cultivos adicionados con SN de CMP, provenientes de Pacientes y Controles, estimuladas o no con Tso durante 24 h y 4 días no mostraron inhibición en la síntesis de hormonas adrenales por parte de la línea celular, razón por la cual solo se presentarán los correspondientes a 36 h de cultivo. A su vez como el tratamiento con Fk induce una mayor producción de hormonas adrenales, los experimentos que se describen se realizaron en cultivos de la línea estimulados con este activador de la adenilato ciclasa.

Cuando se analizó el efecto del tratamiento de los *pooles* de SN Tso provenientes de CMP de Controles, con anti-TGF- $\beta$ , se observó que la dosis de anti-TGF- $\beta$  correspondiente a la

relación 10:1 revertía el efecto inhibitor de SN Tso sobre la síntesis de DHEA, figura 18 panel A.

Para el caso de los SN provenientes de CMP de Pacientes con TB Severa tanto los SN Basal como SN Tso inhibieron la síntesis de DHEA, efecto que fue revertido por el tratamiento con anti-TGF- $\beta$  pero en una relación 25:1, figura 18 panel B.

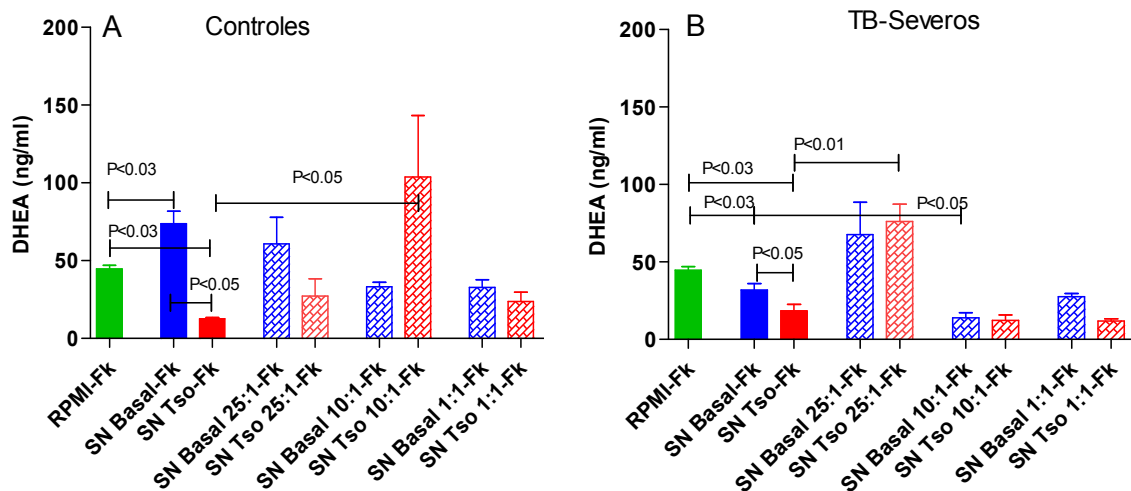


Figura 18: Niveles de Dhea (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R tratadas con Fk, y con distintas dosis de anti-TGF- $\beta$ , y adicionadas con SN de CMP provenientes de Controles (A) y Pacientes con TB severa (B), cultivadas 36 h con y sin Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente). Control de la línea: 50% RPMI 1640 adicionado con Fk (barras verdes). Los datos se representan como media y error estándar; n=3

Al igual que lo observado con respecto a la producción de DHEA, la adición de anti-TGF- $\beta$  a los *pools* de SN Tso proveniente de cultivos de CMP de Controles, en las relaciones 10:1 y 1:1, revertió la inhibición en la síntesis de DHEA-S observada en aquellos cultivos tratados solo con SN Tso, figura 19 Panel A.

Si los SN provenían de cultivos de CMP de Pacientes severos, tanto los SN Basal como SN Tso inhibían la síntesis de DHEA-S, efecto que se pudo revertirse cuando los mismos previamente se trataron con anti-TGF- $\beta$  en una relación 25:1, figura 19 Panel B.

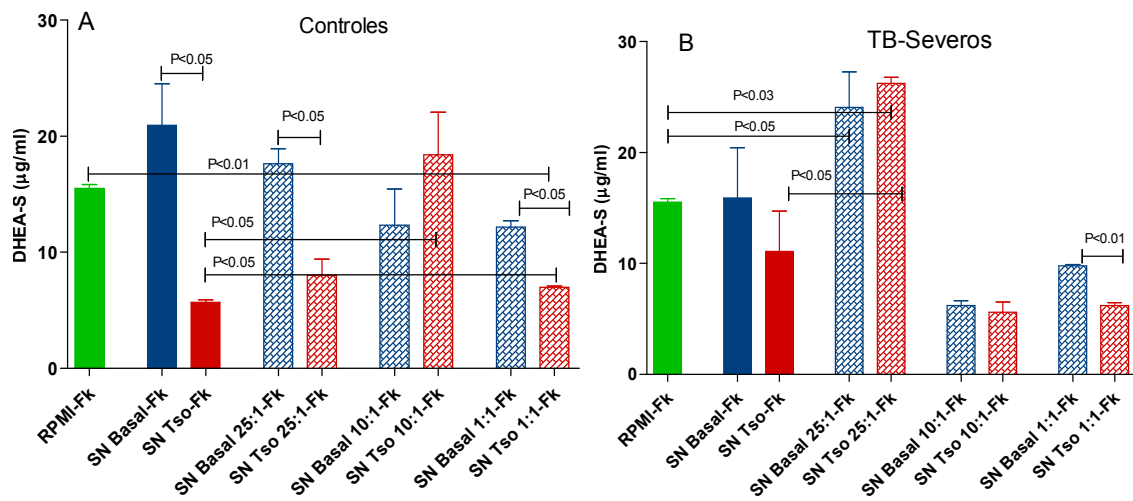


Figura 19: Niveles de DHEA-S ( $\mu\text{g/ml}$ ) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R tratadas con Fk, y con distintas dosis de anti-TGF- $\beta$ , y adicionadas con SN de CMP provenientes de Controles (A) y Pacientes con TB severa (B), cultivadas 36 h con y sin Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente). Control de la línea: 50% RPMI 1640 adicionado con Fk (barras verdes). Los datos se representan como media y error estándar;  $n=3$

#### 4.3.3.2. Cuantificación de Cortisol en cultivos de la línea adrenal NCI-H295R adicionados con pools de SN de CMP provenientes de Pacientes con TB y Controles, cultivadas durante 36 h y tratados con anti-TGF- $\beta$

Con respecto a la producción de Cortisol, previamente se mostraron aumentos en los niveles de la hormona en los cultivos de la línea, luego del tratamiento con SN Basal y SN Tso de cultivos de CMP de individuos sanos, figura 13 y 20.

Cuando a cultivos de la línea adrenal se les adicionaron los mencionados SN tratados con anti-TGF- $\beta$  (relación 10:1) sólo en el caso de SN Tso se constató mayor producción de Cortisol, figura 20.

Este mismo ensayo, pero realizado con SN provenientes de CMP de Pacientes con TB severa no mostró variaciones en la síntesis de hormona atribuibles al tratamiento con anti-TGF- $\beta$ , figura 20 panel B.

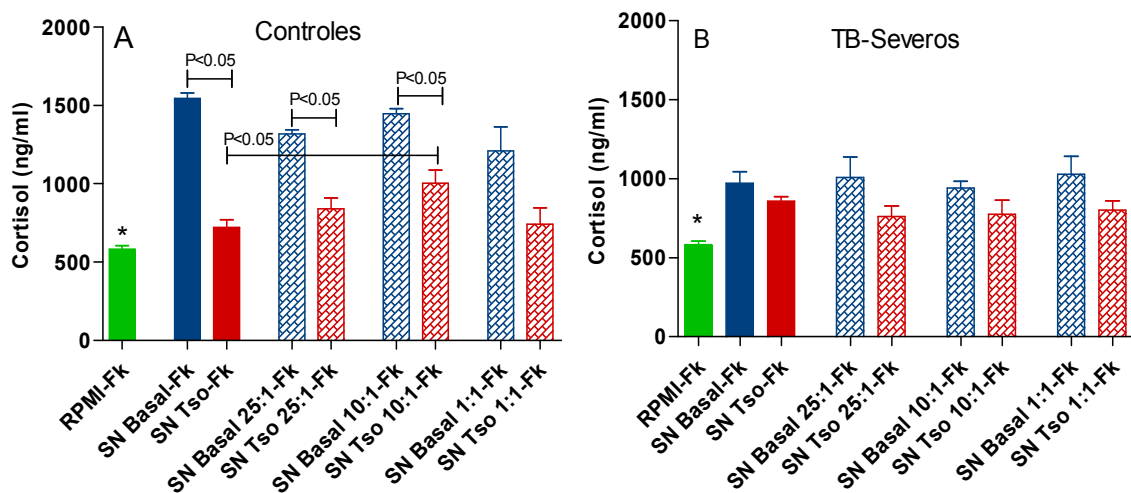


Figura 20: Niveles de Cortisol (ng/ml) en SN de cultivos de la línea adrenal humana NCI-H295R tratadas con Fk, y con distintas dosis de anti-TGF- $\beta$ , y adicionadas con SN de CMP provenientes de Controles (A) y Pacientes con TB severa (B) y cultivadas 36 h con y sin Tso (SN Basal y SN Tso respectivamente). Los datos se representan como media y error estándar. n=3.

\* distinto al resto de los grupos excepto a SN Tso 1:1-Fk

Cuando los SN Basal y SN Tso provenientes de CMP de Controles y Pacientes Severos de 24 h y 4 días de cultivo, se trataron con anti-TGF- $\beta$ , y luego se adicionaron a los cultivos de la línea adrenal NCI H295-R no modificaron significativamente la producción de los distintos esteroides aquí estudiados.

## 5. Discusión

### 5.1. CAPITULO 1

---

#### **Evaluación de la apoptosis de CMP de Pacientes con TB pulmonar y Controles, estimuladas con Mtb y co-cultivadas con distintas concentraciones de Cortisol y/o DHEA.**

Las distintas manifestaciones de la infección con Mtb reflejan la resultante de la interacción entre el bacilo y los mecanismos de defensa del hospedador. Tradicionalmente se consideraba a la inmunidad mediada por células como protectora frente al bacilo, destacándose la acción de los linfocitos T CD4+ como cruciales en una respuesta eficiente. Estudios más recientes avalan el hecho de que la inmunidad innata es también relevante en la TB; (14,145) ya que a través de sus distintos componentes contribuye al control inicial de la infección micobacteriana. Asimismo la respuesta innata es la responsable de modular los mecanismos de contención y destrucción bacteriana (14,146,147)

Por otro lado y como se mencionó anteriormente está ampliamente aceptada la interacción de dos complejos sistemas como son el Sistema Inmune y el Neuroendócrino, éste último puede influir en el control de la respuesta inmune celular y humoral. Además también ha sido reportado en numerosas oportunidades que el Sistema Inmune puede modificar respuestas del Sistema Nervioso Central a través de las citocinas (100).

Tratando de descifrar las intrincadas redes de interacción entre estos dos sistemas en una patología como es la TB, en estudios previos observamos que el tratamiento con Cortisol ( $10^{-6}$  M) inhibía la blastogénesis y la producción de IFN- $\gamma$ , tanto cuando las CMP provenían de Pacientes como de Controles, respecto de los cultivos estimulados sin hormonas, y el agregado de DHEA en simultáneo no podía revertir dicho efecto. Sin embargo, la DHEA sí era capaz de inhibir la síntesis de TGF- $\beta$  cuando se adicionaba, sola o conjuntamente con Cortisol, a cultivos de CMP de Pacientes con TB severa (143).

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen en las mencionadas interrelaciones, nos propusimos conocer el efecto de la adición de las distintas concentraciones de Cortisol y/o DHEA sobre la inducción de la apoptosis de CMP

en cultivo, obtenidas de Pacientes en distintos estadios de la enfermedad y, reestimuladas *in vitro* con el antígeno específico.

Con respecto a las características de la muestra, pudo observarse un mayor porcentaje de neutrófilos al aumentar la severidad de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones donde se demostró que los neutrófilos contribuyen significativamente en la respuesta innata contra el Mtb, y que esta actividad guarda relación con la producción de péptidos antimicrobianos (146-148). A su vez, el porcentaje de linfocitos disminuyó en los pacientes con enfermedad avanzada y, al analizar las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+, si bien hubo modificaciones las diferencias no llegaron a ser significativas entre los grupos Control y TB. Con respecto al descenso de la población linfocitaria, cabe destacar que en los cultivos de CMP se usó siempre la misma concentración de células,  $10^6$  CMP/ml, para conocer las proporciones de células apoptóticas y la capacidad linfoproliferativa. Por lo expuesto las diferencias mencionadas en los porcentajes de linfocitos no debieron afectar los resultados posteriores.

En los ensayos de proliferación pudo constatarse que sólo los pacientes con TB avanzada presentaban disminución de la blastogénesis específica, tanto frente al grupo de los Controles como a los grupos de TB leve y moderada. Este hecho podría indicar la presencia de mecanismos supresores operando durante el proceso tuberculoso, como por ejemplo la activación de linfocitos T reguladores (43), la delección de clones específicos por apoptosis; o que la mayoría de las células comprometidas hayan migrado a los sitios de lesión, con máxima concentración micobacteriana.

Desde hace tiempo se conocen los efectos proapoptóticos del Cortisol sobre las CMP. Estudios en humanos (95), sugieren que los GC cumplen un rol importante en la selección negativa de células T inmaduras a través de la inducción de la apoptosis en timocitos. También provocan la apoptosis en linfocitos maduros periféricos. Asimismo, una importante cantidad de estudios sugieren que la DHEA y sus metabolitos ejercen acciones antigluco corticoideas en animales y humanos (109,149). En este sentido es necesario tener en cuenta los trabajos de Chmielewski y col., quienes demostraron que la DHEA disminuye la apoptosis inducida por el glucocorticoide Dexametasona en timocitos provenientes de ratones.



En cultivos de CMP, tanto la apoptosis temprana medida por la exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática como la apoptosis tardía evidenciada mediante la cuantificación de los eventos hipodiploides, fue mayor en el grupo TB, y este comportamiento pudo observarse ya desde los cultivos basales. Es probable que la mayor susceptibilidad de los linfocitos provenientes de pacientes a la muerte celular por apoptosis sea una consecuencia de su activación *in vivo*, posiblemente afectando tanto a células T específicas para el antígeno como a aquellas residentes no comprometidas con el mismo (86,150).

Además, este comportamiento también guardaría relación con los mayores niveles de IFN- $\gamma$  obtenidos en los SN de cultivos de CMP provenientes de Pacientes tuberculosos, (ver resultados capítulo 2, tabla 20), debido al conocido rol proapoptótico de este mediador en linfocitos activados (83,84). Al respecto, se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  induce la apoptosis de Linfocitos T CD4+ activados durante la infección por BCG. Reforzando este concepto, se observó que ratones deficientes en la síntesis de este mediador son incapaces de inducir la apoptosis de los Linfocitos T CD4+ activados durante la infección, determinándose en ellos una acumulación de estas células (151). Es posible que la producción de IFN- $\gamma$  por células Th1 diferenciadas contribuya a su eliminación, especialmente en situaciones de prolongada estimulación antigénica, tales como infecciones crónicas y respuestas a autoantígenos. Este mecanismo sería importante para prevenir el daño a los tejidos del hospedador durante las infecciones, debido a que las células Th1 son proinflamatorias y potencialmente perjudiciales (43).

Dentro de los grupos de estudio, al analizar la apoptosis temprana de las CMP en cultivo, no se observó un incremento de la misma al estimular con Tso. Es ampliamente conocida la habilidad de los linfocitos activados de entrar en el programa apoptótico al ser reestimulados con el antígeno específico (75,81), fenómeno conocido como muerte celular inducida por activación, la cual restringe la expansión de las células T cuando el antígeno es encontrado de manera continua y sostenida. Sin embargo, la menor cantidad de clones específicos para el Mtb expuestos a partir de las muestras de sangre periférica, tanto de controles como de pacientes, podría explicar en parte estos resultados.

A su vez, se obtuvo un mayor porcentaje de células apoptóticas en los cultivos adicionados con Cortisol  $10^{-6}$  M, tanto en los estimulados como en los no estimulados, y de manera más marcada en el grupo Control. En este caso se puso en evidencia el conocido efecto proapoptótico de los GC sobre las CMP (90,109), el cual no pudo ser revertido por ninguna de las concentraciones de DHEA utilizadas. Este comportamiento se mantuvo aún al analizar las muestras separadas de acuerdo al grado de compromiso pulmonar de la TB. Los resultados en cierta manera explicarían los obtenidos en estudios previos, donde se demostró que la preincubación de las CMP con Cortisol  $10^{-6}$  M inhibía la blastogénesis específica inducida a las 24 h (127,152).

Cuando se compararon los efectos de los distintos tratamientos con las hormonas esteroideas sobre la apoptosis tardía, estimada por el porcentaje de eventos hipodiploides, no pudieron comprobarse los efectos proapoptóticos ni del antígeno ni de Cortisol.

En relación con lo expresado anteriormente vale la pena recordar que la apoptosis antígeno-inducida y la dependiente de GC tienen diferencias en cuanto a sus mecanismos. La primera se correlaciona con la progresión a través del ciclo celular, y requiere que las células entren en la fase S para poder iniciar la ruta apoptótica. La muerte estimulada por el antígeno es generada únicamente por la ocupación del TCR; moléculas coestimuladoras tales como el CD28, que promueven la activación de células en reposo, no tienen efecto en la muerte apoptótica inducida por el antígeno (81,82). Por otro lado, la apoptosis inducida por GC depende de la interacción de este último con su receptor específico intracelular (GR), que al activarse media sus efectos reprimiendo la transcripción de genes necesarios para la supervivencia de la célula, como los factores antiapoptóticos p53, Bcl-xL y Bcl-2, o aumentando la expresión de genes codificantes para factores necesarios para la muerte celular, como las caspasas (92). Este mecanismo involucra un arresto del ciclo celular en fase G0/G1, la exposición de la PS en la cara externa de la membrana plasmática, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c desde la mitocondria, la activación de caspasas, la fragmentación del ADN y por último la muerte.

Cabe destacar que con ninguna de las dos técnicas utilizadas para la medición de la apoptosis pudieron evidenciarse efectos específicos de la DHEA. En relación a esto vale la pena recordar trabajos realizados en líneas celulares humanas (153) y murinas (118) los que mostraron el efecto proapoptótico de la hormona, pero sólo a concentraciones farmacológicas. Las células del estroma del timo, que incluye células epiteliales y células dendríticas, son las principales responsables de esta modificación, la cual no puede ser realizada por CMP humanas. Takahashi y col. también demostraron que la DHEA suprime la apoptosis de CMP humanas inducida por stauroponina, y que este efecto protector es dosis dependiente. Sin embargo, aún no se ha esclarecido si la DHEA ejerce sus efectos directamente o a través de sus metabolitos (154).

De estos resultados se desprende que la DHEA, en concentraciones fisiológicas y en las condiciones experimentales expuestas, no inhibiría el efecto proapoptótico del Cortisol, aún considerando la severidad de la TB; ni presentaría efecto modulador de la apoptosis inducida por el antígeno.

## Capítulo 2

---

### **5.2. Análisis de los niveles plasmáticos de Cortisol, DHEA y DHEA-S, y su relación con la producción de INF- $\gamma$ en cultivos de CMP de Pacientes con TB, Controles y Convivientes de primer grado.**

La exposición al Mtb de individuos inmunocompetentes conlleva a la expansión de poblaciones linfocitarias antígeno-específicas y resulta en la formación de un granuloma inmune donde la infección puede ser contenida pero no erradicada. Esta condición de infección persistente en niveles subclínicos se denomina “infección latente” (155). El estudio de estos individuos que han estado expuestos a la infección es de importancia a fin de comprender el proceso por el cual la infección no se tradujo en patología y pudo ser controlada. La mayor producción de IFN- $\gamma$  antígeno dependiente observada en el grupo de los Convivientes se relacionaría con el mencionado control de la enfermedad. Esta citocina, producida por los linfocitos T CD4+ y T CD8+, luego del reconocimiento de los epítopes micobacterianos, incrementa la capacidad de los macrófagos para suprimir la replicación y posiblemente eliminar la micobacteria residente en el fagosoma (13,156). Estudios con macrófagos humanos mostraron que el IFN- $\gamma$  estimula la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y 1,25 dihidroxicolecalciferol, ambos con propiedades inhibitorias para la micobacteria, probablemente debido a la generación de intermediarios del oxígeno y eventualmente del nitrógeno, así como al control de los niveles intracelulares de hierro (157,158).

El tratamiento con Cortisol no mostró una actividad diferencial de acuerdo a la procedencia de las CMP, ya que pudo observarse una disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  en todos los grupos evaluados al co-cultivar las células con la mencionada hormona, aunque hay que destacar que los niveles de esta citocina permanecieron comparativamente altos en los cultivos de CMP provenientes de Convivientes con respecto al resto, este hallazgo estaría de acuerdo con nuestros resultados previos (143) y numerosos reportes en la literatura con referencia a la inhibición de células Th1 por acción de los GC (159-161). Mientras que en la mayoría de los cultivos la producción de IFN- $\gamma$  se vio modestamente incrementada o sin cambios por la adición de DHEA, los resultados de aquellos cultivos de CMP provenientes de Convivientes mostraron una producción de esta

citocina más aumentada aún con las concentraciones de DHEA más bajas. Este resultado confirmaría la acción favorecedora de la mencionada hormona sobre la respuesta Th1 (162), y provee nueva evidencia de un efecto diferencial relacionado con el tipo de huésped, por lo menos durante la infección con Mtb.

Por otra parte los GC desempeñan efectos anti-inflamatorios y favorecen una respuesta inmune ineficiente para la eliminación de patógenos intracelulares (101,111,163), mientras que la DHEA se contrapone a esta acción promotora de una respuesta tipo Th2 facilitada por los GC, pero además posee efectos anti-inflamatorios muy potentes (162). La repercusión potencial del balance Cortisol/DHEA en las perturbaciones inmunes durante la TB se evaluó recientemente estudiando la relación entre los niveles de Cortisol y DHEA y la respuesta inmune *in vitro* de CMP de Pacientes con TB activa, hacia antígenos micobacterianos. El incremento observado en esta relación en los Pacientes podría ser perjudicial para el desarrollo de una respuesta mediada por células apropiada para este tipo de patógeno, además, este hecho fue avalado por una correlación inversa entre la relación Cortisol/DHEA y la linfoproliferación observada *in vitro*. Por otro lado, pudo constatar que las concentraciones plasmáticas de los niveles de DHEA están positivamente correlacionadas con las concentraciones de IFN- $\gamma$ , mientras que la correlación era inversa entre la relación Cortisol/DHEA y los niveles de la mencionada citocina (127); aunque un mecanismo diferencial podría estar actuando en las células de los Convivientes ya que mostraron la producción más alta de IFN- $\gamma$  a pesar de que la relación Cortisol/DHEA se presentaba levemente aumentada y este grupo fue el que mostró los incrementos más altos de esta citocina al cocultivar con DHEA.

El análisis de la relación entre DHEA-S y DHEA reveló cuestiones importantes que necesitan profundizarse.

Aparentemente los Pacientes y los Convivientes no presentan diferencias en la producción de DHEA pero sí una disponibilidad o utilización distinta de esta hormona.

Con respecto a la TB latente, otro argumento que necesita ser respondido es la diferencia en la producción de IFN- $\gamma$  al separar a los Convivientes de acuerdo a su consanguinidad. Como el grupo de Convivientes es heterogéneo, es posible que no todos los individuos que lo forman se encuentren infectados con Mtb, a pesar de su reciente exposición al

bacilo. Los convivientes consanguíneos podrían compartir alguna carga genética, haciéndolos más susceptibles a la infección. Por otro lado, como una alta producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con antígenos micobacterianos representa una infección más activa, sería necesario un estudio más profundo de este grupo. Trabajos realizados en Etiopía demostraron que aproximadamente un 30% de los Convivientes presentan bajas respuestas en cuanto a la producción de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación con ESAT-6 y CFP-10, mientras que un 10% muestra niveles de esta citocina altos (117,164). Una alta respuesta de ESAT-6 inmediatamente luego de la exposición a antígenos micobacterianos se correlaciona con un subsecuente desarrollo de la patología (117,164). Estudios en bovinos y primates infectados con *M. bovis* o *M. tuberculosis* también revelaron una asociación entre los niveles de IFN- $\gamma$  en respuesta a ESAT-6 y la progresión de la enfermedad (165-167)

Debido a que el IFN- $\gamma$  es necesario para una respuesta inmune eficiente en TB, y por otro lado, debido a la ausencia de un marcador específico para identificar una respuesta inmune protectora, la evaluación en los niveles de IFN- $\gamma$  está comenzando a ser utilizada para este fin. Trabajos publicados sobre estudios en diferentes patologías infecciosas indican que las células T CD4+ que secretan solo IFN- $\gamma$  predominan en las infecciones con una carga antigénica aguda o persistentemente alta, como por ejemplo TB no tratada, (168-171). En contraste una respuesta polifuncional de células T CD4+ secretoras de IFN- $\gamma$  solamente, IFN- $\gamma$ /IL-2, o IL-2 solamente, es característica de infecciones con cargas antigénicas bajas persistentes como por ejemplo infección por citomegalovirus latente asintomática (168-170), mientras que células T CD4+ secretoras únicamente de IL-2 se asocian con infecciones tratadas o resueltas (168-170,172).

La defensa de un organismo frente a una infección requiere una serie de reacciones neurales, endócrinas e inmunológicas coordinadas, las cuales conllevan a la eliminación del patógeno y a la recuperación del tejido dañado. A pesar de que los mecanismos protectores en las distintas resistencias a la enfermedad mostradas por los Pacientes y Convivientes no están completamente identificados, los resultados presentados sugieren la existencia de una relación inmunoendócrina particular, presentando al IFN- $\gamma$  como uno de los mediadores más importante en este aspecto.

### **5.3. Efectos de la adición de sobrenadantes de cultivos de CMP de Pacientes con TB y Controles sobre la producción de esteroides por la línea celular NCI-H295R.**

Las modificaciones neuro-inmuno-endocrinas son importantes desde el punto de vista adaptativo frente a situaciones de estrés. Sin embargo cuando la respuesta inmune no logra erradicar al patógeno, el proceso infeccioso se vuelve crónico produciéndose alteraciones en las respuestas de estos sistemas con consecuencias nocivas para el hospedero (140). Numerosos estudios han respaldado y ya está ampliamente aceptado que el Sistema Nervioso y el Sistema Inmune se comunican por medio de un lenguaje bioquímico común a través de un circuito completo bidireccional que incluye neurotransmisores, hormonas neuroendócrinas, citocinas y sus respectivos receptores. (99). Además como se comentó anteriormente, la interrelación existente entre el Sistema Inmune y el eje HPA, desempeña un papel primordial en la defensa frente a patógenos, habiéndose demostrado que mediadores del Sistema Inmune influyen en la secreción de CRH y ACTH (173).

Alteraciones en las concentraciones de los esteroides adrenales en Pacientes con TB, tales como un aumento en las concentraciones de Cortisol y una disminución en las de DHEA pueden influir sobre la respuesta inmune, contribuyendo a la pérdida gradual de citocinas efectoras de la respuesta tipo Th1 (156)

Los resultados expuestos en esta tesis son complementarios a observaciones de un trabajo previo en las cuales los mediadores liberados en diferentes fases de la respuesta inmune antituberculosa modulan diferencialmente la producción de esteroides por parte de las células adrenales (128).

La línea adrenal NCI-H295R, representa la primer línea celular adrenocortical que mantiene la habilidad, bajo ciertas condiciones, de producir todos los esteroides adrenocorticales (mineralocorticoides, GC y andrógenos adrenales). De esta manera emerge como un excelente modelo para estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan la esteroidogénesis (174)

A partir de la gentil donación de la Dra. M. Ehrhart-Bornstein fue necesario expandir la línea y analizar si conservaba la capacidad de producir las hormonas adrenales en estudio

(Cortisol, DHEA y DHEA-S), así como la respuesta frente a la estimulación de la esteroidogénesis por el tratamiento con Fk (173,175). En todos los casos se obtuvieron concentraciones detectables de las 3 hormonas evaluadas y pudo observarse un aumento significativo de los niveles de las mismas al estimular la línea adrenal con Fk.

En función de los ensayos realizados se consideró que las condiciones de trabajo con la línea eran las óptimas para comenzar a demostrar los objetivos propuestos, es así como una vez alcanzado el 70% de confluencia y en plena fase exponencial de desarrollo, se comenzaron los experimentos orientados a evaluar el comportamiento de la esteroidogénesis adrenal frente al agregado de los SN de CMP provenientes de Pacientes con TB y Controles Sanos.

La decisión de cultivar las CMP durante 24, 36 h y 4 días para luego recolectar los SN y adicionarlos a la línea fue tomada basándonos en trabajos previos (132) en donde se analizaron varios estadios de la respuesta inmune frente a Mtb, estudiando, la linfoproliferación, y los niveles de citocinas producidas en cultivos de CMP de Pacientes y Controles en los tiempos mencionados.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en una primera etapa pudimos observar que, al tratar la línea NCI-H295R con SN de CMP de 36 h de cultivo, los SN de las CMP no estimuladas (SN Basal) provenientes de Controles favorecían la producción de DHEA, mientras que los SN de CMP del mismo grupo de personas, pero estimuladas con antígenos de Mtb, mostraban un efecto opuesto (Figura 11 panel A).

Las CMP de Pacientes con TB severa también sintetizaron factores que inhibieron la producción de DHEA, aún en condiciones basales (SN Basal) (Figura 11, panel B). Efectivamente, la estimulación con la micobacteria indujo la síntesis de mediadores capaces de reducir la producción de DHEA por parte de las células adrenales. En el caso de los pacientes con TB severa, la infección *in vivo* con el agente etiológico fue suficiente para estimular a las CMP a liberar tal(es) producto(s) inhibidor(es) *in vitro*.

Un efecto opuesto se observó con respecto a la producción de Cortisol; los SN de las CMP de Controles así como de TB mostraron la misma tendencia al aumentar la producción de esta hormona. En los experimentos en donde las CMP fueron estimuladas con el antígeno específico, aquellas que provenían de los Pacientes mostraron un efecto más potente.



Con respecto al comportamiento de la DHEA-S, se observó un patrón similar al de la DHEA cuando fueron adicionados a la línea los SN estimulados o no con Tso y tanto de Pacientes como de Controles.

Estos resultados demuestran efectivamente que los productos de la respuesta inmune, o al menos alguno de ellos son capaces de disminuir la producción de DHEA por parte de la línea celular NCI-H295R. Cabe resaltar el hecho de que ni el antígeno por si mismo, ni el medio en el cual se cultivaron las CMP (RPMI) produjeron modificaciones en los niveles de esta hormona al ser adicionados a la línea.

Los SN de 24 h de cultivo de las CMP estimuladas o no con Tso, tanto de Controles como de Pacientes, favorecieron la producción de DHEA. Asimismo, en los sobrenadantes de la línea adrenal obtenidos luego de la adición de SN Basales y SN Tso provenientes de CMP de Pacientes, se observó aumento en la producción de Cortisol. En esta etapa de la respuesta inmune donde priman mediadores de la respuesta innata, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, los mismos podrían modular positivamente la esteroidogénesis, como lo demostraron distintos autores al adicionar las mencionadas citocinas a cultivos de la línea adrenal (141,144,173,176).

Al evaluar si los productos de la respuesta inmune adaptativa frente a Mtb modificaban de alguna manera la producción de las mencionadas hormonas adrenales, se observó que la adición a los cultivos de línea de SN Basal y SN Tso de 4 días, tanto de CMP de Controles como de Pacientes, favorecieron la síntesis de DHEA. En el caso de SN provenientes de CMP de Pacientes también se observó aumento en la producción de Cortisol. La mayor síntesis de esta hormona en cultivos de la línea adrenal, inducida por productos de la respuesta inmune antituberculosa, podría relacionarse con el aumento en los niveles de Cortisol plasmático que presentan los pacientes con TB (127).

Por otro lado existen numerosas citocinas, las cuales han sido reportadas como reguladoras de la función adrenal, entre las más relevantes se pueden mencionar IL-1, IL-6, IGF I y II, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Del balance de las mismas resultan sus efectos estimuladores o inhibidores de la secreción de esteroides (173,177). Dado que el TGF- $\beta$  se comportaría como inhibidor específico de la producción de andrógenos adrenales (DHEA y DHEA-S) (141,144,177) y que tanto en estudios previos de nuestro grupo como en trabajos de otros

autores se observó un marcado aumento en los niveles plasmáticos de esta citocina en pacientes con TB (44,57), el TGF- $\beta$  emerge como uno de los posibles responsables de las modificaciones observadas en las concentraciones de hormonas adrenales expuestas en esta tesis.

Es así que en nuestros estudios pudo demostrarse que el TGF- $\beta$  está implicado en la inhibición de la producción de DHEA por las células adrenales. De hecho, el tratamiento con anti-TGF- $\beta$  revirtió el efecto inhibitor de los SN de CMP estimulados con Tso y provenientes tanto de Pacientes como de Controles sobre la liberación de DHEA. Sin embargo fueron necesarias altas concentraciones de anticuerpo anti-TGF- $\beta$  para revertir la mencionada inhibición cuando los SN adicionados a las células adrenales provenían de CMP de Pacientes con TB activa. Como se mencionó anteriormente, estos resultados están en concordancia con el hecho de que los SN de cultivo de CMP provenientes de Pacientes contenían concentraciones mayores de TGF- $\beta$  que su contraparte proveniente de Controles.

El TGF- $\beta$  es una citocina clave en la inmunopatología de la TB, ya que suprime el desarrollo de células Th1 *in vitro*, desactiva macrófagos y regula en menos la producción de IFN- $\gamma$  (47). Como ya fue comentado, resultados previos de nuestro grupo mostraron que CMP estimuladas con Tso provenientes de Pacientes con TB severa producen más TGF- $\beta$  que las de los Controles y a su vez, mayores concentraciones de esta citocina que los Pacientes con TB Leve o Moderada (57). Ampliando estos hallazgos, ahora podemos evidenciar que el TGF- $\beta$  es responsable, entre otros mediadores, de la comunicación inmuno-endócrina durante la TB, particularmente en la secreción disminuida de DHEA que los pacientes presentan.

Paralelamente, un hallazgo interesante fue que la neutralización del TGF- $\beta$  presente en los SN de CMP provenientes de Controles y estimuladas con Tso incrementó la producción de Cortisol por parte de las células adrenales.

Estos resultados indican que la estimulación con Tso de las CMP de Controles dispara la producción de factores solubles capaces de incrementar la producción de Cortisol, una actividad que se manifiesta al neutralizar el TGF- $\beta$ . Esta observación adhiere un nivel extra

de complejidad en la intrincada red de influencias que subyace la regulación inmuno-endócrina.

## 6. Conclusiones Generales

---

De todo lo referido en este trabajo de tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

- ✚ Al analizar la proporción de células apoptóticas, en los cultivos de CMP de 24 h provenientes de Pacientes con TB y Controles, estimuladas o no con Mtb pudimos observar que la misma fue siempre mayor en las CMP de enfermos, independientemente del tratamiento hormonal.
- ✚ Al adicionar GC a los cultivos de CMP de Controles, estimuladas con Mtb, se evidenció un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas, este incremento se observó también cuando el GC fue adicionado a cultivos sin estimular de células provenientes tanto de Pacientes como de Controles y este efecto no pudo ser revertido por la DHEA.
- ✚ Si bien en trabajos previos demostramos la inhibición mediada por GC tanto en la linfoproliferación como en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las CMP de Controles, y más aun, de Pacientes (132), éstos resultados fueron complementados por los expuestos en esta tesis y nos sugiere que la mencionada inhibición no se debe a un aumento de la apoptosis, y además, que este proceso ya se encuentra aumentado en las CMP provenientes de los Pacientes.
- ✚ Cuando las CMP fueron estimuladas con el antígeno específico, la capacidad blastogénica de las células provenientes de Pacientes con TB se encontró disminuida, fundamentalmente en aquellos con patología severa, por otro lado el grupo de los Convivientes de pacientes bacilíferos mostró una marcada respuesta proliferativa al compararlos con el grupo de Controles.
- ✚ En concordancia con los resultados observados en proliferación, los niveles de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivos de CMP estimuladas con Mtb de Convivientes fueron mayores que los observados en Pacientes o Controles, y dentro del grupo

de Pacientes, fueron los Leves los que presentaron mayores niveles de esta citocina.

- ✚ La adición de Cortisol inhibió la producción de IFN- $\gamma$  inducida por el Antígeno específico tanto en los cultivos de células mononucleares de Pacientes, como de Convivientes y de Controles.
- ✚ Al analizar la relación Cort/DHEA a nivel plasmático, se constató que los Pacientes presentaban los valores más altos de la misma con respecto al resto de los grupos y más aun para Pacientes Severos. Estos resultados sugieren que valores elevados de la relación Cort/DHEA indicarían el curso de una respuesta inmune celular inapropiada.
- ✚ Si bien fueron las CMP provenientes de Convivientes las que mostraron mayor producción de IFN-  $\gamma$ , los resultados en conjunto sugieren la existencia de una particular relación inmuno-endócrina en este grupo orientada a favorecer una respuesta inmune celular apropiada para eliminar o contener a la micobacteria.
- ✚ Con respecto a la síntesis local de hormonas esteroideas, los mediadores liberados durante las distintas fases de la respuesta inmune antituberculosa modulan de forma diferente la producción de esteroides por las células adrenales. Este efecto fue más evidente en los cultivos estimulados con Forskolin.
- ✚ Si bien en la etapa inicial de la respuesta inmune se produce un aumento en la síntesis de DHEA y Cortisol, al adicionar a cultivos de la línea adrenal NCI-H295R SN de cultivos de CMP de Controles, estimuladas con Mtb durante 36 h se observó una marcada inhibición sólo en la producción DHEA por la mencionada línea; para el caso de los cultivos de la línea estimulados con Fk, que recibieron SN provenientes de CMP de Pacientes, no sólo se constató una inhibición en la producción de DHEA en aquellos tratados con SN Tso, sino también en los que recibieron SN Basal.

- ✚ Los ensayos de neutralización demostraron que al menos uno de los mediadores producidos durante la respuesta inmune antituberculosa responsables de la inhibición en la producción de DHEA y DHEA-S por las células adrenales es el TGF- $\beta$ .
- ✚ Estos resultados originales contribuyen con nueva evidencia para lograr un mejor conocimiento en cuanto a la comunicación neuroinmunoendócrina en TB.

## Referencias Bibliográficas

1. world health organization **(2006)**. Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing, WHO report.
2. Daniel, T. M. **(2006)**. The history of tuberculosis. *Respir.Med.* **100** (11): 1862-1870.
3. Bjune, G. **(2005)**. Tuberculosis in the 21st century: an emerging pandemic? *Norsk Epidemiologi* **15** (2): 133-139.
4. Ducati, R. G.; Ruffino-Netto, A.; Basso, L. A.; y Santos, D. S. **(2006)**. The resumption of consumption-- a review on tuberculosis. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **101** (7): 697-714.
5. Bellamy, R. J. y Hill, A. V. **(1998)**. Host genetic susceptibility to human tuberculosis. *Novartis.Found.Symp.* **217** : 3-13.
6. Hill, A. V. **(1998)**. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu.Rev Immunol* **16** : 593-617.
7. Marks, S. M.; Taylor, Z.; Qualls, N. L.; Shrestha-Kuwahara, R. J.; Wilce, M. A.; y Nguyen, C. H. **(2000)**. Outcomes of contact investigations of infectious tuberculosis patients. *Am.J.Respir.Crit Care Med* **162** (6): 2033-2038.
8. Whalen, C. C.; Chiunda, A.; Zalwango, S.; Nshuti, L.; Jones-Lopez, E.; Okwera, A.; Hirsch, C.; Peters, P.; Boom, W. H.; y Mugerwa, R. D. **(2006)**. Immune correlates of acute Mycobacterium tuberculosis infection in household contacts in Kampala, Uganda. *Am.J.Trop.Med Hyg.* **75** (1): 55-61.
9. Palomino JC, Leao SC, and Ritacco V **(2007)**. Tuberculosis 2007, from basic science to patient care
10. Pardo, G. **(1999)**. Manejo de contactos de enfermos tuberculosos. *Sociedad Argentina de Medicina, Avances en Medicina* **99**: 209-214.
11. Becerra, M. C.; Pachao-Torreblanca, I. F.; Bayona, J.; Celi, R.; Shin, S. S.; Kim, J. Y.; Farmer, P. E.; y Murray, M. **(2005)**. Expanding tuberculosis case detection by screening household contacts. *Public Health Rep.* **120** (3): 271-277.
12. Abbas A, Lichtman A, and Pober J **(2000)**. Celular and molecular immunology *Sauders Company editora, Philadelphia.*
13. Flynn, J. L. **(2004)**. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis.(Edinb.)* **84** (1-2): 93-101.
14. van Crevel, R.; Ottenhoff, T. H.; y van der Meer, J. W. **(2002)**. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin.Microbiol.Rev* **15** (2): 294-309.

15. Raupach, B. y Kaufmann, S. H. (2001). Immune responses to intracellular bacteria. *Curr.Opin.Immunol* **13** (4): 417-428.
16. Bhatt, K. y Salgame, P. (2007). Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J.Clin.Immunol* **27** (4): 347-362.
17. Mueller, K. L. (2010). Innate immunity. Recognizing the first responders. Introduction. *Science* **327** (5963): 283-
18. Thoma-Uszynski, S.; Stenger, S.; Takeuchi, O.; Ochoa, M. T.; Engele, M.; Sieling, P. A.; Barnes, P. F.; Rollinghoff, M.; Bolcskei, P. L.; Wagner, M.; Akira, S.; Norgard, M. V.; Belisle, J. T.; Godowski, P. J.; Bloom, B. R.; y Modlin, R. L. (2001). Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* **291** (5508): 1544-1547.
19. Liu, P. T. y Modlin, R. L. (2008). Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Curr.Opin.Immunol*
20. Delbridge, L. M. y O'Riordan, M. X. (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr.Opin.Immunol* **19** (1): 10-16.
21. Boom, W. H.; Canaday, D. H.; Fulton, S. A.; Gehring, A. J.; Rojas, R. E.; y Torres, M. (2003). Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis.(Edinb.)* **83** (1-3): 98-106.
22. Flynn, J. L. y Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu.Rev Immunol* **19** : 93-129.
23. Akaki, T.; Tomioka, H.; Shimizu, T.; Dekio, S.; y Sato, K. (2000). Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Clin.Exp.Immunol* **121** (2): 302-310.
24. Kaufmann, S. H. (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann.Rheum.Dis.* **61 Suppl 2** : ii54-ii58.
25. Underhill, D. M. y Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu.Rev Immunol* **20** : 825-852.
26. Herbst, S.; Schaible, U. E.; y Schneider, B. E. (2011). Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS.ONE.* **6** (5): e19105-
27. Adams, L. B.; Dinauer, M. C.; Morgenstern, D. E.; y Krahenbuhl, J. L. (1997). Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice. *Tuber.Lung Dis.* **78** (5-6): 237-246.
28. Parris, K. (2003). **Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease.** *Altern Med Rev* **8** (3): 223-246.



29. Samuel, L. P.; Song, C. H.; Wei, J.; Roberts, E. A.; Dahl, J. L.; Barry, C. E., III; Jo, E. K.; y Friedman, R. L. (2007). Expression, production and release of the Eis protein by *Mycobacterium tuberculosis* during infection of macrophages and its effect on cytokine secretion. *Microbiology* **153** (Pt 2): 529-540.
30. Samuel, L. P.; Song, C. H.; Wei, J.; Roberts, E. A.; Dahl, J. L.; Barry, C. E., III; Jo, E. K.; y Friedman, R. L. (2007). Expression, production and release of the Eis protein by *Mycobacterium tuberculosis* during infection of macrophages and its effect on cytokine secretion. *Microbiology* **153** (Pt 2): 529-540.
31. Abebe, F.; Mustafa, T.; Nerland, A. H.; y Bjune, G. A. (2005). Cytokine profile during latent and slowly progressive primary tuberculosis: a possible role for interleukin-15 in mediating clinical disease. *Clin.Exp.Immunol* **143** (1): 180-192.
32. Okamura, H.; Kashiwamura, S.; Tsutsui, H.; Yoshimoto, T.; y Nakanishi, K. (1998). Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr.Opin.Immunol.* **10** (3): 259-264.
33. Song, C. H.; Lee, J. S.; Kim, H. J.; Park, J. K.; Paik, T. H.; y Jo, E. K. (2000). Interleukin-8 is differentially expressed by human-derived monocytic cell line U937 infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and *Mycobacterium marinum*. *Infect.Immun.* **71** (10): 5480-5487.
34. Zhang, M.; Gong, J.; Presky, D. H.; Xue, W.; y Barnes, P. F. (1999). Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J.Immunol.* **162** (4): 2441-2447.
35. Li, X. C.; Demirci, G.; Ferrari-Lacraz, S.; Groves, C.; Coyle, A.; Malek, T. R.; y Strom, T. B. (2001). IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat.Med.* **7** (1): 114-118.
36. Kanegane, H. y Tosato, G. (1996). Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* **88** (1): 230-235.
37. Reljic, R. (2007). IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. *J.Interferon Cytokine Res.* **27** (5): 353-364.
38. Crome, S. Q.; Wang, A. Y.; y Levings, M. K. (2010). Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin.Exp.Immunol.* **159** (2): 109-119.
39. Afzali, B.; Mitchell, P.; Lechler, R. I.; John, S.; y Lombardi, G. (2010). Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin.Exp.Immunol.* **159** (2): 120-130.

40. Torrado, E.; Robinson, R. T.; y Cooper, A. M. **(2011)**. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol.* **32** (2): 66-72.
41. Iwakura, Y. y Ishigame, H. **(2006)**. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* **116** (5): 1218-1222.
42. Giacomini, E.; Remoli, M. E.; Scandurra, M.; Gafa, V.; Pardini, M.; Fattorini, L.; y Coccia, E. M. **(2011)**. Expression of proinflammatory and regulatory cytokines via NF-kappaB and MAPK-dependent and IFN regulatory factor-3-independent mechanisms in human primary monocytes infected by Mycobacterium tuberculosis. *Clin.Dev.Immunol.* **2011** : 841346-
43. Li, X.; McKinstry, K. K.; Swain, S. L.; y Dalton, D. K. **(2007)**. IFN-gamma acts directly on activated CD4+ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals. *J.Immunol.* **179** (2): 939-949.
44. Olobo, J. O.; Geletu, M.; Demissie, A.; Eguale, T.; Hiwot, K.; Aderaye, G.; y Britton, S. **(2001)**. Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand.J.Immunol* **53** (1): 85-91.
45. Demangel, C. y Britton, W. J. **(2000)**. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* **78** (4): 318-324.
46. Redford, P. S.; Murray, P. J.; y O'Garra, A. **(2011)**. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal.Immunol.* **4** (3): 261-270.
47. Toossi, Z. y Ellner, J. J. **(1998)**. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **87** (2): 107-114.
48. Forsey, R. J.; Thompson, J. M.; Ernerudh, J.; Hurst, T. L.; Strindhall, J.; Johansson, B.; Nilsson, B. O.; y Wikby, A. **(2003)**. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech.Ageing Dev.* **124** (4): 487-493.
49. Li, M. O.; Wan, Y. Y.; Sanjabi, S.; Robertson, A. K.; y Flavell, R. A. **(2006)**. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu.Rev Immunol* **24** : 99-146.
50. Danielpour, D.; Kim, K. Y.; Winokur, T. S.; y Sporn, M. B. **(1991)**. Differential regulation of the expression of transforming growth factor-beta s 1 and 2 by retinoic acid, epidermal growth factor, and dexamethasone in NRK-49F and A549 cells. *J.Cell Physiol* **148** (2): 235-244.
51. Kim, S. J.; Angel, P.; Lafyatis, R.; Hattori, K.; Kim, K. Y.; Sporn, M. B.; Karin, M.; y Roberts, A. B. **(1990)**. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol.Cell Biol.* **10** (4): 1492-1497.

52. Letterio, J. J. y Roberts, A. B. **(1998)**. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.* **16** : 137-161.
53. Ahuja, S. S.; Paliogianni, F.; Yamada, H.; Balow, J. E.; y Boumpas, D. T. **(1993)**. Effect of transforming growth factor-beta on early and late activation events in human T cells. *J.Immunol.* **150** (8 Pt 1): 3109-3118.
54. Czarniecki, C. W.; Chiu, H. H.; Wong, G. H.; McCabe, S. M.; y Palladino, M. A. **(1988)**. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J.Immunol.* **140** (12): 4217-4223.
55. Bogdan, C.; Paik, J.; Vodovotz, Y.; y Nathan, C. **(1992)**. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J.Biol.Chem.* **267** (32): 23301-23308.
56. Toossi, Z.; Gogate, P.; Shiratsuchi, H.; Young, T.; y Ellner, J. J. **(1995)**. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J.Immunol.* **154** (1): 465-473.
57. Dlugovitzky, D.; Bay, M. L.; Rateni, L.; Urizar, L.; Rondelli, C. F.; Largacha, C.; Farroni, M. A.; Molteni, O.; y Bottasso, O. A. **(1999)**. In vitro synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement. *Scand.J.Immunol.* **49** (2): 210-217.
58. Allen, S.; Cassone, L.; Lasco, T.; y McMurray, D. **(2004)**. Effect of Neutralizing Transforming Growth Factor 1 on the Immune Response against *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea Pigs. *Infection and immunity* **72** (3): 1358-1363.
59. Hirsch, C. S.; Ellner, J. J.; Blinkhorn, R.; y Toossi, Z. **(1997)**. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** (8): 3926-3931.
60. Kaufmann, S. H. **(2003)**. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis.(Edinb.)* **83** (1-3): 86-90.
61. Wassie, L.; Demissie, A.; Aseffa, A.; Abebe, M.; Yamuah, L.; Tilahun, H.; Petros, B.; Rook, G.; Zumla, A.; Andersen, P.; y Doherty, T. M. **(2008)**. Ex Vivo Cytokine mRNA Levels Correlate with Changing Clinical Status of Ethiopian TB Patients and their Contacts Over Time. *PLoS.ONE.* **3** (1): e1522-

62. Kaufmann, S. H. **(1993)**. Immunity to intracellular bacteria. *Annu.Rev Immunol* **11** : 129-163.
63. VanHeyningen, T. K.; Collins, H. L.; y Russell, D. G. **(1997)**. IL-6 produced by macrophages infected with Mycobacterium species suppresses T cell responses. *J.Immunol* **158** (1): 330-337.
64. Teixeira-Coelho, M.; Cruz, A.; Carmona, J.; Sousa, C.; Ramos-Pereira, D.; Saraiva, A. L.; Veldhoen, M.; Pedrosa, J.; Castro, A. G.; y Saraiva, M. **(2011)**. TLR2 deficiency by compromising p19 (IL-23) expression limits Th 17 cell responses to Mycobacterium tuberculosis. *Int.Immunol.* **23** (2): 89-96.
65. Jankovic, D.; Liu, Z.; y Gause, W. C. **(2001)**. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* **22** (8): 450-457.
66. Collins, C. H. **(2001)**. Tuberculosis today: a brief review. *Br.J.Biomed.Sci.* **58** (3): 137-138.
67. Rook, G. A.; Seah, G.; y Ustianowski, A. **(2001)**. M. tuberculosis: immunology and vaccination. *Eur.Respir.J.* **17** (3): 537-557.
68. De La Barrera, S. S.; Finiasz, M.; Frias, A.; Aleman, M.; Barrionuevo, P.; Fink, S.; Franco, M. C.; Abbate, E.; y del, C. S. **(2004)**. Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. *Clin.Exp.Immunol* **132** (3): 450-461.
69. Lockhart, E.; Green, A. M.; y Flynn, J. L. **(2006)**. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J.Immunol* **177** (7): 4662-4669.
70. Brandes, M.; Willimann, K.; y Moser, B. **(2005)**. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* **309** (5732): 264-268.
71. **(2003)**. Circle of life. *Nat.Immunol* **4** (5): 395-
72. Bonfill D and Scharovsky G **(2003)**. Oncología molecular y celular
73. William Paul **(1999)**. Fundamental Immunology 4ta<sup>o</sup> ed. *Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia*
74. Moreno de Alborán I; Robles M.S.; Bras A.; Bras A.; Baena E.; y Martínez C. **(2003)**. Cell death during lymphocyte development and activation. *Semin Immunol*(15): 125-133.
75. Saikumar, P.; Dong, Z.; Mikhailov, V.; Denton, M.; Weinberg, J. M.; y Venkatachalam, M. A. **(1999)**. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am.J.Med* **107** (5): 489-506.

76. Zhang, J.; Jiang, R.; Takayama, H.; y Tanaka, Y. **(2005)**. Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol.Immunol* **49** (9): 845-852.
77. Marsden, V. S. y Strasser, A. **(2003)**. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu.Rev Immunol* **21** : 71-105.
78. Gerondakis, S. y Strasser, A. **(2003)**. The role of Rel/NF-kappaB transcription factors in B lymphocyte survival. *Semin Immunol* **15** (3): 159-166.
79. Behnia, M.; Robertson, K. A.; y Martin, W. J. **(2000)**. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* **117** (6): 1771-1777.
80. Brunner, T.; Wasem, C.; Torgler, R.; Cima, I.; Jakob, S.; y Corazza, N. **(2003)**. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* **15** (3): 167-176.
81. Lenardo, M.; Chan, K. M.; Hornung, F.; McFarland, H.; Siegel, R.; Wang, J.; y Zheng, L. **(1999)**. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu.Rev Immunol* **17** : 221-253.
82. Soruri, A.; Schweyer, S.; Radzun, H. J.; y Fayyazi, A. **(2002)**. Mycobacterial antigens induce apoptosis in human purified protein derivative-specific alphabeta T lymphocytes in a concentration-dependent manner. *Immunology* **105** (2): 222-230.
83. Refaeli, Y.; Van Parijs, L.; Alexander, S. I.; y Abbas, A. K. **(2002)**. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J.Exp.Med* **196** (7): 999-1005.
84. Doms, H. y Abbas, A. K. **(2002)**. Life and death in effector T cells. *Nat.Immunol* **3** (9): 797-798.
85. Fayyazi, A.; Eichmeyer, B.; Soruri, A.; Schweyer, S.; Herms, J.; Schwarz, P.; y Radzun, H. J. **(2000)**. Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J.Pathol.* **191** (4): 417-425.
86. Das, S.; Subramanian, D.; y Prabha, C. **(2004)**. Cell proliferation and apoptosis: dual-signal hypothesis tested in tuberculous pleuritis using mycobacterial antigens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **41** : 85-92.
87. Hirsch, C. S.; Toossi, Z.; Vanham, G.; Johnson, J. L.; Peters, P.; Okwera, A.; Mugerwa, R.; Mugenyi, P.; y Ellner, J. J. **(1999)**. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J.Infect.Dis.* **179** (4): 945-953.

88. Fratazzi, C.; Arbeit, R. D.; Carini, C.; Balcewicz-Sablinska, M. K.; Keane, J.; Kornfeld, H.; y Remold, H. G. **(1999)**. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J.Leukoc.Biol.* **66** (5): 763-764.
89. Mustafa, T.; Phyu, S.; Nilsen, R.; Jonsson, R.; y Bjune, G. **(1999)**. A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis. *Scand.J.Immunol* **50** (2): 127-136.
90. Brunetti, M.; Martelli, N.; Colasante, A.; Piantelli, M.; Musiani, P.; y Aiello, F. B. **(1995)**. Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood* **86** (11): 4199-4205.
91. Li-Weber, M. y Krammer, P. H. **(2003)**. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* **15** (3): 145-157.
92. Rose, A. L.; Smith, B. E.; y Maloney, D. G. **(2002)**. Glucocorticoids and rituximab in vitro: synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. *Blood* **100** (5): 1765-1773.
93. Hu, J. M.; Bodwell, J. E.; y Munck, A. **(1994)**. Cell cycle-dependent glucocorticoid receptor phosphorylation and activity. *Mol.Endocrinol.* **8** (12): 1709-1713.
94. Walker R; Kwast-Welfeld J; Gourdeau H; Leblanc J; Neugebauer W; y Sikorska M **(1993)**. Relationship between Apoptosis and the Cell Cycle in Lymphocytes: Roles of Protein Kinase C, Tyrosine Phosphorylation, and AP1. *Exp Cell Res* **207** : 142-151.
95. Hirano, T.; Horigome, A.; Takatani, M.; y Oka, K. **(2001)**. Cortisone counteracts apoptosis-inducing effect of cortisol in human peripheral-blood mononuclear cells. *Int.Immunopharmacol.* **1** (12): 2109-2115.
96. Wilder, R. L. **(1995)**. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu.Rev Immunol* **13** : 307-338.
97. Haddad, J.; Saadé, B.; y Safieh-Garabedian, B. **(2002)**. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *Journal of Neuroimmunology* **133** : 1-19.
98. Downing, J. E. y Miyan, J. A. **(2000)**. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today* **21** (6): 281-289.
99. Blalock, J. E. **(2005)**. The immune system as the sixth sense. *J.Intern.Med* **257** (2): 126-138.
100. Wrona, D. **(2006)**. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J.Neuroimmunol.* **172** (1-2): 38-58.
101. Besedovsky, H. O. y Del Rey, A. **(1996)**. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr.Rev.* **17** (1): 64-102.

102. Del Rey, A.; Klusman, I.; y Besedovsky, H. O. **(1998)**. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. *Am.J.Physiol* **275** (4 Pt 2): R1146-R1151.
103. Del Rey, A.; Besedovsky, H.; Sorkin, E.; y Dinarello, C. A. **(1987)**. Interleukin-1 and glucocorticoid hormones integrate an immunoregulatory feedback circuit. *Ann.N.Y Acad.Sci.* **496** : 85-90.
104. McKay, L. I. y Cidlowski, J. A. **(1999)**. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr.Rev.* **20** (4): 435-459.
105. Schaaf, M. J. y Cidlowski, J. A. **(2003)**. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol.Cell Biol.* **23** (6): 1922-1934.
106. DeRijk, R. H.; Schaaf, M.; Stam, F. J.; de Jong, I. E.; Swaab, D. F.; Ravid, R.; Vreugdenhil, E.; Cidlowski, J. A.; de Kloet, E. R.; y Lucassen, P. J. **(2003)**. Very low levels of the glucocorticoid receptor beta isoform in the human hippocampus as shown by Taqman RT-PCR and immunocytochemistry. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **116** (1-2): 17-26.
107. Webster, J. I.; Tonelli, L.; y Sternberg, E. M. **(2002)**. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu.Rev.Immunol.* **20** : 125-163.
108. Padgett, D. A. y Glaser, R. **(2003)**. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* **24** (8): 444-448.
109. Rook, G. A. **(1999)**. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* **13** (4): 567-581.
110. Rook, G. A.; Dheda, K.; y Zumla, A. **(2005)**. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat.Rev.Immunol.* **5** (8): 661-667.
111. Elenkov, I. J. y Chrousos, G. P. **(1999)**. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol.Metab* **10** (9): 359-368.
112. Daynes, R. A.; Araneo, B. A.; Hennebold, J.; Enioutina, E.; y Mu, H. H. **(1995)**. Steroids as regulators of the mammalian immune response. *J.Invest Dermatol.* **105** (1 Suppl): 14S-19S.
113. Almawi, W. Y. y Melemedjian, O. K. **(2002)**. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J.Leukoc.Biol.* **71** (1): 9-15.

114. Hernandez-Pando, R.; de la Luz, S. M.; Orozco, H.; Arriaga, K.; Pavon, L.; Al Nakhli, S. A.; y Rook, G. A. **(1998)**. The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology* **95** (2): 234-241.
115. Elenkov, I. J. **(2002)**. Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications. *Int.Rev.Neurobiol.* **52** : 163-186.
116. Binello, E. y Gordon, C. M. **(2003)**. Clinical uses and misuses of dehydroepiandrosterone. *Curr.Opin.Pharmacol.* **3** (6): 635-641.
117. Kroboth, P. D.; Salek, F. S.; Pittenger, A. L.; Fabian, T. J.; y Frye, R. F. **(1999)**. DHEA and DHEA-S: a review. *J.Clin.Pharmacol.* **39** (4): 327-348.
118. Yang, N. C.; Jeng, K. C.; Ho, W. M.; Chou, S. J.; y Hu, M. L. **(2000)**. DHEA inhibits cell growth and induces apoptosis in BV-2 cells and the effects are inversely associated with glucose concentration in the medium. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **75** (2-3): 159-166.
119. Young, D. G.; Skibinski, G.; Mason, J. I.; y James, K. **(1999)**. The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6 sR) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) levels in normal healthy blood donors. *Clin.Exp.Immunol.* **117** (3): 476-481.
120. Auci, D.; Ahlem, C.; Li, M.; Trauger, R.; Dowding, C.; Paillard, F.; Frincke, J.; y Reading, C. **(2003)**. The Immunobiology and Therapeutic Potential of Androstene Hormones and Their Synthetic Derivatives:Novel Anti-Inflammatory and Immune Regulating Steroid Hormones. *Mod.Asp.Immunobiol.* **3** (2): 64-70.
121. Araneo, B. y Daynes, R. **(1995)**. Dehydroepiandrosterone functions as more than an antiglucocorticoid in preserving immunocompetence after thermal injury. *Endocrinology* **136** (2): 393-401.
122. Blauer K **(1991)**. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* **129** : 3174-3179.
123. Hernandez-Pando, R.; de la Luz, S. M.; Orozco, H.; Arriaga, K.; Pavon, L.; Marti, O.; Lightman, S. L.; y Rook, G. A. **(1998)**. Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *QJM.* **91** (11): 755-766.
124. Suzuki, T.; Suzuki, N.; Daynes, R. A.; y Engleman, E. G. **(1991)**. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **61** (2 Pt 1): 202-211.



125. Martinez-Taboada, V.; Bartolome, M. J.; Amado, J. A.; Blanco, R.; Garcia-Unzueta, M. T.; Rodriguez-Valverde, V.; y Lopez-Hoyos, M. **(2002)**. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Mech.Ageing Dev.* **123** (11): 1477-1486.
126. Spencer, N. F.; Norton, S. D.; Harrison, L. L.; Li, G. Z.; y Daynes, R. A. **(1996)**. Dysregulation of IL-10 production with aging: possible linkage to the age-associated decline in DHEA and its sulfated derivative. *Exp.Gerontol.* **31** (3): 393-408.
127. Bozza, V. V.; D'Attilio, L.; Mahuad, C. V.; Giri, A. A.; Del Rey, A.; Besedovsky, H.; Bottasso, O.; y Bay, M. L. **(2007)**. Altered cortisol/DHEA ratio in tuberculosis patients and its relationship with abnormalities in the mycobacterial-driven cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Scand.J.Immunol.* **66** (1): 97-103.
128. Rey, A. D.; Mahuad, C. V.; Bozza, V. V.; Bogue, C.; Farroni, M. A.; Bay, M. L.; Bottasso, O. A.; y Besedovsky, H. O. **(2007)**. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav.Immun.* **21** (2): 171-179.
129. Wilckens, T. y De Rijk, R. **(1997)**. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol.Today* **18** (9): 418-424.
130. Zhang, D.; Kishihara, K.; Wang, B.; Mizobe, K.; Kubo, C.; y Nomoto, K. **(1998)**. Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of *Listeria monocytogenes*. *J.Neuroimmunol.* **92** (1-2): 139-151.
131. Tournier, J. N.; Mathieu, J.; Mailfert, Y.; Multon, E.; Drouet, C.; Jouan, A.; y Drouet, E. **(2001)**. Chronic restraint stress induces severe disruption of the T-cell specific response to tetanus toxin vaccine. *Immunology* **102** (1): 87-93.
132. Mahuad, C. **(2004)**. Regulación inmunoendócrina de la Respuesta Inmune. Estudios en pacientes con distintos grados de Afectación pulmonar. *Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Médicas U.N.R.*
133. Dlugovitzky, D.; Bay, M. L.; Rateni, L.; Fiorenza, G.; Vietti, L.; Farroni, M. A.; y Bottasso, O. A. **(2000)**. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin.Exp.Immunol.* **122** (3): 343-349.
134. Bozza, V. **(2003)**. Estudio in vitro del potencial efecto inmunomodulador del Cortisol y la Dehidroepiandrosterona sobre la respuesta inmune celular específica en

pacientes tuberculosos- Tesina presentada en la Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

135. Lienhardt, C.; Azzurri, A.; Amedei, A.; Fielding, K.; Sillah, J.; Sow, O. Y.; Bah, B.; Benagiano, M.; Diallo, A.; Manetti, R.; Manneh, K.; Gustafson, P.; Bennett, S.; D'Elíos, M. M.; McAdam, K.; y Del Prete, G. **(2002)**. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur.J.Immunol.* **32** (6): 1605-1613.
136. de la, B. S.; Aleman, M.; Musella, R.; Schierloh, P.; Pasquinelli, V.; Garcia, V.; Abbate, E.; y Sasiain, M. C. **(2004)**. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin.Exp.Immunol* **138** (1): 128-138.
137. Tuosto, L.; Cundari, E.; Gilardini Montani, M. S.; y Piccolella, E. **(1994)**. Analysis of susceptibility of mature human T lymphocytes to dexamethasone-induced apoptosis. *Eur.J.Immunol.* **24** (5): 1061-1065.
138. Zipp, F.; Wendling, U.; Beyer, M.; Grieger, U.; Waiczies, S.; Wagenknecht, B.; Haas, J.; y Weller, M. **(2000)**. Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *J.Neuroimmunol.* **110** (1-2): 214-222.
139. Voll, R. E.; Herrmann, M.; Roth, E. A.; Stach, C.; Kalden, J. R.; y Girkontaite, I. **(1997)**. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390** (6658): 350-351.
140. Straub, R. H. y Besedovsky, H. O. **(2003)**. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J.* **17** (15): 2176-2183.
141. Lebrethon, M.; Jaillard, C.; Naville, D.; Bigeot, M.; y Saez, J. **(1994)**. Effects of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 on Human Adrenocortical Fasciculata-Reticularis Cell Differentiated Functions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **79** (4): 1033-1039.
142. Judd, A. M.; Call, G. B.; Barney, M.; McIlmoil, C. J.; Balls, A. G.; Adams, A.; y Oliveira, G. K. **(2000)**. Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **917** : 628-637.
143. Mahuad, C.; Bay, M. L.; Farroni, M. A.; Bozza, V.; Del Rey, A.; Besedovsky, H.; y Bottasso, O. A. **(2004)**. Cortisol and dehydroepiandrosterone affect the response of peripheral blood mononuclear cells to mycobacterial antigens during tuberculosis. *Scand.J.Immunol.* **60** (6): 639-646.

144. Herrmann, M.; Scholmerich, J.; y Straub, R. H. **(2002)**. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **966** : 166-186.
145. Salgame, P. **(2005)**. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr.Opin.Immunol* **17** (4): 374-380.
146. Eum, S. Y.; Kong, J. H.; Hong, M. S.; Lee, Y. J.; Kim, J. H.; Hwang, S. H.; Cho, S. N.; Via, L. E.; y Barry, C. E., III **(2010)**. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* **137** (1): 122-128.
147. Fiorenza, G.; Farroni, M. A.; Bogue, C.; Selenscig, D.; Lamas, D. M.; y Dlugovitzky, D. **(2007)**. Functional characteristics of neutrophils and mononuclear cells from tuberculosis patients stimulated in vitro with heat killed *M. tuberculosis*. *Arch.Med.Res.* **38** (5): 526-533.
148. Martineau, A. R.; Newton, S. M.; Wilkinson, K. A.; Kampmann, B.; Hall, B. M.; Nawroly, N.; Packe, G. E.; Davidson, R. N.; Griffiths, C. J.; y Wilkinson, R. J. **(2007)**. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J.Clin.Invest* **117** (7): 1988-1994.
149. Chmielewski, V.; Drupt, F.; y Morfin, R. **(2000)**. Dexamethasone-induced apoptosis of mouse thymocytes: prevention by native  $7\alpha$ -hydroxysteroids. *Immunol.Cell Biol.* **78** (3): 238-246.
150. Aleman, M.; De La Barrera, S. S.; Schierloh, P. L.; Alves, L.; Yokobori, N.; Baldini, M.; Abbate, E.; y Sasiain, M. C. **(2005)**. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J.Infect.Dis.* **192** (3): 399-409.
151. Dalton, D. K.; Haynes, L.; Chu, C. Q.; Swain, S. L.; y Wittmer, S. **(2000)**. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J.Exp.Med.* **192** (1): 117-122.
152. D'Attilio, L. **(2005)**. Estudio de las modificaciones inducidas por la Dehidroepiandrosterona (DHEA) y el Cortisol sobre la respuesta inmune celular hacia *Mycobacterium tuberculosis*. *Tesina presentada en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas U.N.R.*
153. Jiang, Y.; Miyazaki, T.; Honda, A.; Hirayama, T.; Yoshida, S.; Tanaka, N.; y Matsuzaki, Y. **(2005)**. Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *J.Gastroenterol.* **40** (5): 490-497.

154. Takahashi, H.; Nakajima, A.; y Sekihara, H. **(2004)**. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) inhibit the apoptosis in human peripheral blood lymphocytes. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **88** (3): 261-264.
155. Morrison, J.; Pai, M.; y Hopewell, P. C. **(2008)**. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect.Dis.* **8** (6): 359-368.
156. Bottasso, O.; Bay, M. L.; Besedovsky, H.; y Del Rey, A. **(2007)**. The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand.J.Immunol.* **66** (2-3): 166-175.
157. Denis, M. **(1991)**. Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin.Exp.Immunol.* **84** (2): 200-206.
158. Rook, G. A.; Steele, J.; Fraher, L.; Barker, S.; Karmali, R.; O'Riordan, J.; y Stanford, J. **(1986)**. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *Immunology* **57** (1): 159-163.
159. Miyaura, H. y Iwata, M. **(2002)**. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J.Immunol.* **168** (3): 1087-1094.
160. Padgett, D. A.; Sheridan, J. F.; y Loria, R. M. **(1995)**. Steroid hormone regulation of a polyclonal TH2 immune response. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **774** : 323-325.
161. Ramirez, F.; Fowell, D. J.; Puklavec, M.; Simmonds, S.; y Mason, D. **(1996)**. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J.Immunol.* **156** (7): 2406-2412.
162. Dillon, J. S. **(2005)**. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **4** (3): 377-385.
163. Turnbull, A. V. y Rivier, C. L. **(1999)**. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* **79** (1): 1-71.
164. Schmidt, M.; Kreutz, M.; Loffler, G.; Scholmerich, J.; y Straub, R. H. **(2000)**. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J.Endocrinol.* **164** (2): 161-169.
165. Buddle, B. M.; Parlane, N. A.; Keen, D. L.; Aldwell, F. E.; Pollock, J. M.; Lightbody, K.; y Andersen, P. **(1999)**. Differentiation between Mycobacterium bovis BCG-vaccinated and M. bovis-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin.Diagn.Lab Immunol* **6** (1): 1-5.

166. Demissie, A.; Wassie, L.; Abebe, M.; Aseffa, A.; Rook, G.; Zumla, A.; Andersen, P.; y Doherty, T. M. **(2006)**. The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Infect.Immun.* **74** (5): 2817-2822.
167. Doherty, T. M.; Demissie, A.; Olobo, J.; Wolday, D.; Britton, S.; Eguale, T.; Ravn, P.; y Andersen, P. **(2002)**. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J.Clin.Microbiol.* **40** (2): 704-706.
168. Harari, A.; Vallelian, F.; Meylan, P. R.; y Pantaleo, G. **(2005)**. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J.Immunol.* **174** (2): 1037-1045.
169. Langermans, J. A.; Doherty, T. M.; Vervenne, R. A.; van der, L. T.; Lyashchenko, K.; Greenwald, R.; Agger, E. M.; Aagaard, C.; Weiler, H.; van Soolingen, D.; Dalemans, W.; Thomas, A. W.; y Andersen, P. **(2005)**. Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* **23** (21): 2740-2750.
170. Lyashchenko, K.; Whelan, A. O.; Greenwald, R.; Pollock, J. M.; Andersen, P.; Hewinson, R. G.; y Vordermeier, H. M. **(2004)**. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with Mycobacterium bovis BCG and infected with M. bovis. *Infect.Immun.* **72** (5): 2462-2467.
171. Younes, S. A.; Yassine-Diab, B.; Dumont, A. R.; Boulassel, M. R.; Grossman, Z.; Routy, J. P.; y Sekaly, R. P. **(2003)**. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J.Exp.Med.* **198** (12): 1909-1922.
172. Younes, S. A.; Yassine-Diab, B.; Dumont, A. R.; Boulassel, M. R.; Grossman, Z.; Routy, J. P.; y Sekaly, R. P. **(2003)**. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J.Exp.Med.* **198** (12): 1909-1922.
173. Ehrhart-Bornstein, M.; Hinson, J. P.; Bornstein, S. R.; Scherbaum, W. A.; y Vinson, G. P. **(1998)**. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr.Rev.* **19** (2): 101-143.
174. Rainey, W. E.; Bird, I. M.; y Mason, J. I. **(1994)**. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol.Cell Endocrinol.* **100** (1-2): 45-50.

175. Samandari, E.; Kempna, P.; Nuoffer, J. M.; Hofer, G.; Mullis, P. E.; y Fluck, C. E. **(2007)**. Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities. *J.Endocrinol.* **195** (3): 459-472.
176. l'Allemand, D. y Biason-Lauber, A. **(2000)**. Intra-adrenal regulation of androgen synthesis. *Eur.J.Clin.Invest* **30 Suppl 3** : 28-33.
177. Bornstein, S. R. y Ehrhart-Bornstein, M. **(2000)**. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z.Rheumatol.* **59 Suppl 2** : II/12-II/17.