



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Médicas

Tesis Doctoral

*Mediciones inmunoendócrinas y su
aplicabilidad para el seguimiento clínico del
paciente con tuberculosis pulmonar.*

Presentada por: Lic. Ariana Díaz

Rosario, Argentina

2015

Directora: Dra. María Luisa Bay

Co-Directora: Dra. Bettina Bongiovanni

Realizada en el Instituto de Inmunología de la Fac. de Cs. Médicas

Mediciones inmunoendócrinas y su aplicabilidad para el seguimiento clínico del paciente con tuberculosis pulmonar.

Ariana Díaz

Licenciada en Genética, Universidad de Morón

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Inmunología dependiente de la Facultad de Cs. Médicas (UNR), durante el período comprendido entre Agosto de 2010 y Enero de 2015, bajo la dirección de la Dra. María Luisa Bay y la co-dirección de la Dra. Bettina Bongiovanni.

Agradecimientos

A María Luisa, quien me dirigió durante el desarrollo de este trabajo de tesis. Quiero agradecerle por todo lo aprendido, por guiarme durante este trayecto y por su eterna paciencia. Gracias por enseñarme a ser una mejor profesional y transmitirme la pasión por la investigación... y sobre todo por el cariño que nos das!

A Bettina, mi co-directora, por guiarme con tanta paciencia en los trabajos de laboratorio y por estar siempre dispuesta a ayudar. Gracias por todas las charlas y buenos momentos compartidos!

A Oscar, por permitirme formar parte del Instituto, por transmitirme tantos conocimientos, y por toda la colaboración brindada durante la elaboración de este trabajo de tesis.

Al grupo de TB: Griselda, Luciano, Natalia, Silvana y Rocío. Por su paciencia y aguante incondicional, por las charlas, consejos y miles de buenos momentos compartidos... Gracias totales!. Y a todos los que conforman el Instituto de Inmunología, por su desinteresada colaboración y predisposición; y por crear un lindo ambiente de trabajo.

A Leandro, por su colaboración y asesoramiento estadístico.

A mis padres Patricia y Luis, por enseñarme que con esfuerzo todo es posible. Por la educación que me brindaron, por los consejos siempre tan acertados, por el apoyo constante e incondicional y el amor que me dan día a día.

A mi hermana Camila, por acompañarme en todas mis locuras y ser "el pequeño terremoto" que llegó a alegrar nuestras vidas.

A toda mi familia, en especial a mis abuelos, tía y prima. Por confiar siempre en mí, por el cariño incondicional y porque son la mejor familia que uno puede pedir!

A Germán, por tenerme tanta paciencia y acompañarme todos estos años!

A mis amigos, por hacer de mi vida una linda aventura.

Publicaciones y Presentaciones en Reuniones Científicas

Publicaciones sobre el tema de la Tesis

- Increased frequency of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T regulatory cells in pulmonary tuberculosis patients undergoing specific treatment and its relationship with their immune-endocrine profile. Díaz A, Santucci N, Bongiovanni B, D'Attilio L, Massoni C, Lioi S, Radcliffe S, Dídoli G, Bottasso O, Bay ML. *J of Immunol Res.* **2014**. En prensa.
- Changes in the immune-endocrine response in patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. Bongiovanni B, **Díaz A**, D'Attilio L, Santucci N, Dídoli G, Nannini JL, Gardeñez W, Bogue C, Besedovsky H, del Rey A, Bottasso O, Bay M. *Ann N Y Acad Sci.* **2012**; 1262(1):10-5

Publicaciones relacionadas con el tema de la Tesis

- Leptin does not enhance cell-mediated immune responses following mycobacterial antigen stimulation. Santucci N, **Díaz A**, Bianchi E, Spinelli S, D'Attilio L, Bongiovanni B, Dídoli G, Brandan N, Nannini L, Bay ML, Bottasso O. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2014**;18(8):981-7.
- Levels of inflammatory cytokines, adrenal steroids, and mRNA for GR α , GR β and 11 β HSD1 in TB pleurisy. D'Attilio L, **Díaz A**, Santucci N, Bongiovanni B, Gardeñez W, Marchesini M, Bogue C, Dídoli G, Bottasso O, Bay ML. *Tuberculosis (Edinb).* **2013**;93(6):635-41
- Altered microRNA expression levels in patients with pulmonary and pleural tuberculosis. Spinelli S, **Díaz A**, D'Attilio L, Marchesini M, Bogue C, Bay ML Bottasso O. *Mol Immunol.* **2013**; 53(3):265-9

Presentaciones en Reuniones Científicas

- Desregulación Inmunoendócrina e incremento en la expresión de PPAR en tuberculosis pulmonar. **Díaz A**; Penas F; D'Attilio L; C A; Bottasso O; Goren N; Bay ML. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 4-5 de Diciembre de **2014**, Rosario, Argentina
- T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory cells and its relationship with immune-endocrine mediators during pulmonary tuberculosis treatment. Díaz* A; Santucci* N; Bongiovanni B; D'Attilio L; Dídoli G; Lioi S; Massoni C; Radcliffe S; Gardeñez W; Bottasso O; Bay ML. **ex aequo*. VII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. 14-17 de Septiembre de 2014, Canela, Brasil

- El tratamiento antibacilar en pacientes tuberculosos y los cambios inmunoendócrinos que se suscitan tras ello. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. **Díaz A**; Bongiovanni B; Santucci N; Dídolo G; Pochettino A; Spinelli S; Radcliffe S; Brandan, N; Nannini L; Bottasso O; Bay ML. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 7-9 de Noviembre de **2013**, Los Cocos, Córdoba, Argentina
- Niveles de expresión de genes involucrados en la acción de los Glucocorticoides en pacientes con Tuberculosis Pulmonar desde el momento del diagnóstico, durante el tratamiento específico y luego de finalizado. D'Attilio L; **Díaz A**; Bongiovanni B; Santucci N; Pavón N; Nannini L; Brandan N; Farroni MA; Dídolo G; Bottasso O; Bay ML. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 7-9 de Noviembre de **2013**, Los Cocos, Córdoba, Argentina
- A partly normalization in the immune-endocrine circulating profile of tuberculosis patients undergoing specific treatment. **Díaz A**; Bongiovanni B; D'Attilio L; Santucci N; Dídoli G; Radcliffe S; Brandan N; Nannini L; Bottasso O; Bay ML. 15th International Congress of Immunology. 22-27 de Agosto de **2013**, Milan, Italia
- Expression levels of mRNA for GR α GR β , 11bHSD1 and GR α / β ratio in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis, throughout the 6-month course of etiological treatment and 3 month following its completion. D'Attilio L; **Díaz A**; Bongiovanni B; Santucci N; Dídoli G; Gardeñez W; Besedovsky, H; del Rey A; Bottasso O; Bay ML. 15th International Congress of Immunology. 22-27 de Agosto de **2013**, Milan, Italia
- Niveles plasmáticos de hormonas del eje hipotalamo-pituitario-adrenal y de parámetros de la respuesta inmune durante el tratamiento específico en tuberculosis pulmonar. **Díaz A**; D'Attilio L; Santucci N; Bongiovanni B; Dídoli G; Lioi S; Massoni C; Danielle S; Radcliffe S; Baravalle V; Brandan N; Nannini L; Bottasso O; Bay ML. LVII Reunión Científica SAIC y LX Reunión anual de la SAI. 14-17 de Noviembre de **2012**, Mar del Plata, Argentina. Resumen en Medicina 72 (Supl II): 204, 2012
- Distintos patrones de expresión de microARN en células mononucleares de pacientes con tuberculosis pulmonar y pleural. Spinelli SV; **Díaz A**; D'Attilio L; Marchesini MM; Bogue C; Bay ML; Bottasso OA. LVII Reunión de SAIC y LX Reunión de la SAI. 14-17 de Noviembre de **2012**, Mar del Plata, Argentina. Resumen en Medicina 72 (Supl II): 206, 2012
- Análisis de parámetros inmunoendócrinos en pacientes con tuberculosis pleural y tuberculosis pulmonar. D'Attilio L; **Díaz A**; Dídoli G; Santucci N; Bongiovanni B; Pavón N; Radcliffe S; Gardeñez W; Bottasso O; Bay ML. LVII Reunión de SAIC y LX Reunión de la SAI. 14-17 de Noviembre de **2012**, Mar del Plata, Argentina. Resumen en Medicina 72 (Supl II): 207, 2012

- The pro-and anti-inflammatory balance and T-reg levels in patients with pulmonary tuberculosis treated with antimycobacterial drugs. **Díaz A**; Santucci N; Bongiovanni B; D'Attilio L; Dídoli G; Bogue C; Marchesini M; Bottasso O; Bay ML. X Congreso Latinoamericano de la Asociación de Inmunología (ALAI). **2012**, Lima, Perú
- Modulación de la producción de citocinas en células THP1 estimuladas con Mycobacterium tuberculosis y tratadas con cortisol y/o Dehidroepiandrosterona (DHEA). Bongiovanni B; Jeandrevin D; D'Attilio L; **Díaz A**; Santucci N; Bottasso O; Bay ML. X Congreso Latinoamericano de la Asociación de Inmunología (ALAI). **2012**, Lima, Perú
- Comportamiento de la respuesta inmunoendocrina en pacientes con Tuberculosis (TB) pulmonar durante el tratamiento específico. **Díaz A**; Bongiovanni B; D'Attilio L; Santucci N; Dídoli G; Gardeñez W; Farroni M; Bottasso O; Bay María Luisa. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 19 al 21 de Octubre de **2011**, San Miguel de Tucumán, Argentina
- Niveles de expresión de los transcritos de 11 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 en células mononucleares periféricas de pacientes con tuberculosis pulmonar. D'Attilio L; Santucci N; Bongiovanni B; **Díaz A**; Marchesini M; Dídoli G; Bottasso O; Bay María Luisa. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 19 al 21 de Octubre de **2011**, San Miguel de Tucumán, Argentina
- Changes in the immune-endocrine response in patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. Bongiovanni B; **Díaz A**; D'Attilio L; Santucci N; Dídoli G; Lioi S; Muro S; Naninni L; Bottasso O; Bay ML. 8th International ISNIM Congress. 20-22 de octubre de **2011**, Dresden, Alemania
- Changes in the levels of dopamine, noradrenaline and adrenaline in patients with tuberculosis with different degree of lung compromise. D'Attilio L; Bongiovanni B; Santucci N; **Díaz A**; Dídoli G; Bay ML; Bottasso O; Besedovky H; del Rey A. 8th International ISNIM Congress. 20-22 de octubre de **2011**, Dresden, Alemania
- Improved immune-endocrine profile in tuberculosis patients under specific treatment. Bongiovanni B; D'Attilio L; Santucci N; **Díaz A**; Bogue C; Gardeñez W; Dídoli G; Lioi S; Bottasso O; Bay ML. Reunión FAIC (French-Argentine Immunology Congress), 3 al 5 de noviembre de **2010**, Buenos Aires, Argentina

ÍNDICE.

Abreviaturas	01
1- Introducción	04
1-1 La Tuberculosis	05
1-1.1 Reseña histórica	05
1-1.2 Epidemiología de la Tuberculosis	07
1-1.3 Diagnóstico y tratamiento de la TB	11
1-1.3.1 Tratamiento	13
1-1.4 Agente etiológico	14
1-1.5 Aspectos patogénicos y clínicos de la TB	16
1-1.6 Estructura del granuloma	19
1-2 El Sistema Inmune frente a la infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
1-2.1 Inmunidad Innata en la infección con <i>Mtb</i>	23
1-2.2 Principales citocinas de la respuesta inmune contra <i>Mtb</i>	34
1-2.2.1 Citocinas y mediadores proinflamatorios	35
1-2.2.2 Citocinas reguladoras y antiinflamatorias	41
1-2.3 Inmunidad Adaptativa en la infección con <i>Mtb</i>	43
1-2.3.1 Reconocimiento de la micobacteria por los linfocitos	44
1-2.3.2 Células de la inmunidad adaptativa	45
1-3 Interacción Neuroinmunoendócrina	49
1-3.1 Eje Hipotalámico-Pituitario- Adrenal	50
1-3.2 Glucocorticoides	51
1-3.2.1 Receptores de GC y mecanismos de acción	52
1-3.2.2 Glucocorticoides y su relación con el Sistema Inmune	54
1-3.2.3 Regulación del metabolismo del Cortisol a nivel celular	55
1-3.3 Dehidroepiandrosterona	56
1-3.3.1 DHEA como modulador de la respuesta inflamatoria e Inmune	57

2-	Construcción de la Hipótesis de trabajo	60
3-	Objetivos	64
3-1	Objetivos generales	64
3-2	Objetivos específicos	65
4-	Materiales y Métodos	67
4-1	Grupos de Estudio	67
4-1.1	Pacientes con tuberculosis pulmonar (TB)	67
4-1.2	Controles sanos (HCo)	68
4-2	Recolección de muestras y separación de células mononucleares	69
4-2.1	Análisis de la capacidad proliferativa de las CMP de pacientes con TB pulmonar	70
4-2.2	Determinación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo	71
4-2.3	Aislamiento de las células mononucleares y determinación de células T reguladoras	71
4-3	Cuantificación plasmática de citocinas, hormonas y otros factores	72
4-3.1	Cuantificación sérica de Cortisol y DHEA-S	73
4-4	Detección de citocinas de los patrones Th1/Th2/Th17 por citometría de flujo	73
4-5	Cuantificación en tiempo real de los ARNm de GR α , GR β , 11 β HSD1 y 11 β HSD2	73
4.5.1	Diseño de cebadores	74
4-5.2	Condiciones de reacción de la RT-PCR	75
4-5.3	Condiciones de reacción de la PCR en tiempo real (PCRq) para la cuantificación relativa de los ARNm de GR α , GR α , 11 β HSD 1 y 2 en CMP	76
4-6	Análisis estadísticos	80
5-	Resultados	82
5-1	Descripción de la población en estudio	82

5-2	Ensayo de linfoproliferación	87
5-3	Subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TB durante el tratamiento específico	89
5-4	Mediadores inmunológicos en plasma de pacientes con TB durante el tratamiento específico	94
5-5	Modificaciones en los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en pacientes con TB durante el tratamiento específico	97
5-6	Determinaciones séricas de Cortisol y DHEA-S	103
5-7	Niveles relativos de expresión de los ARNm de GR α , GR β y de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en CMP de pacientes con TB pulmonar	106
5-8	Análisis multivariado de componentes principales	108
6-	Discusión	113
7-	Conclusiones	126
8-	Resumen	129
9-	Bibliografía	132

Abreviaturas

ACTH:	Hormona Adenocorticotrofina
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido Desoxirribonucleico copia
ARN:	Ácido Ribonucleico
ARNm:	Ácido Ribonucleico mensajero
BAAR:	Bacilos Ácido Alcohol Resistentes
BCG:	Bacilo de Calmette Guérin, M. bovis
CD:	Células Dendríticas
CD1:	Molécula presentadora de antígenos no clásica
CMH:	Complejo mayor de histocompatibilidad
CM:	Células mononucleares
CMP:	Células mononucleares de sangre periférica
cmp:	Cuentas por minuto
CPA:	Células Presentadoras de Antígeno
CRP:	Proteína C reactiva
CR3:	Receptor del complemento de tipo 3
CycA:	Ciclofilina A
DHEA:	Dehidroepiandrosterona
DHEAS:	Dehidroepiandrosterona sulfato
DOTS:	Tratamiento directamente observado
ELISA:	Enzimoimmunoensayo
EMB:	Etambutol
EQ:	Electroquimioluminiscencia
ERS:	Velocidad de eritrosedimentación
FcR:	Receptor de la Fracción cristalizante de Ig
FoxP3:	Forkhead box P3
GC:	Glucocorticoides
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GR:	Receptor de glucocorticoides
GR α :	Receptor de glucocorticoides alfa
GR β :	Receptor de glucocorticoides beta
GRs:	Elementos de respuesta específicos de glucocorticoides
HIV:	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
HCo:	Controles sanos
HPA:	eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal
IE:	Índice de estimulación
IFN- γ :	Interferon Gamma

Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
IMC:	Índice de masa corporal
INH:	Isoniacida
iNOS:	Sintasa inducible de óxido nítrico
LAM:	Lipoarabinomanano
LTCD4+:	Linfocitos T CD4+
LTCD8+:	Linfocitos T CD8+
LXA4	lipoxina A4
MDR-TB:	Tuberculosis multiresistente
MΦ:	Macrófagos
MR:	Receptor para mineralocorticoides
Mtb:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mtbi:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> muerto por radiación
MyD 88:	Proteína de diferenciación mieloide 88
M1:	Macrófagos activados de manera clásica
M2:	Macrófagos activados de modo alternativo
NF-κB:	Factor nuclear-κB
NK:	Células citotóxicas naturales
NLR:	Receptor de tipo NOD
NOD:	Dominio de Oligomerización de Nucleótidos
NPV:	Núcleo paraventricular
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	Solución salina de buffer fosfato
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRq:	PCR en tiempo real
PMN:	Polimorfonucleares neutrófilos
PPD:	Derivado proteico purificado
PZA:	Pirazinamida
RMP:	Rifampicina
RFLP:	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RI:	Respuesta Inmune
RNS:	Especies reactivas del nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RRP:	Receptores de reconocimiento de patógeno
RT-PCRq:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SI:	Sistema Inmune

SNC:	Sistema Nervioso Central
T0:	Momento del diagnóstico
T2:	Segundo mes de tratamiento específico
T4:	Cuarto mes de tratamiento específico
T6:	Sexto mes de tratamiento específico
T9:	Tres meses luego de finalizado el tratamiento
TACO:	<i>Tryptophan Aspartate Coat protein</i>
TB:	Tuberculosis
TBL:	Tuberculosis Latente
TCR:	Receptor de células T
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante beta
Th1:	T colaborador 1
Th2:	T colaborador 2
TNF- α :	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TLR:	Receptor de tipo Toll
T-reg:	Células T reguladoras
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WHO:	Organización Mundial de la Salud
XDR-TB:	Tuberculosis extremadamente resistente
11 β HSD1:	11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 1
11 β HSD2:	11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 2

Introducción

1-1 La Tuberculosis

1-1.1 Reseña histórica

La Tuberculosis (TB) es considerada una de las enfermedades infecciosas más antiguas que azotó a la humanidad y que, aún hoy en día, continúa siendo un importante problema de salud pública. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, su agente etiológico [1]. La principal vía de transmisión del bacilo es la aérea, por lo que los pulmones suelen ser los órganos más afectados y la TB pulmonar la presentación clínica más frecuente.

Una de las primeras evidencias sobre la presencia de esta enfermedad en la antigüedad, fueron los indicios de lesiones tuberculosas constatadas en huesos humanos datados en el Neolítico [2]. En los últimos años y gracias a las nuevas tecnologías fue posible detectar la presencia de ADN de la bacteria en momias de más de 3000 años provenientes de diferentes partes del mundo [3, 4]. A lo largo de la historia la TB recibió distintas denominaciones como: consunción, mal del rey o plaga blanca. En la antigua Grecia, donde se encontraron diversos registros escritos sobre esta enfermedad, la expresión elegida por los médicos para nombrarla fue phthisis intentando así describir el característico cuadro que presentaban los enfermos: pérdida progresiva de peso, debilidad general, astenia e hiporexia, fiebre prolongada, tos y ocasionalmente hemoptisis [5].

La ocurrencia de esta enfermedad aumentó progresivamente durante la Edad Media y el Renacimiento, hasta alcanzar su máxima expresión entre mediados del siglo XVIII y del XIX. Esta última época caracterizada por el desplazamiento masivo de campesinos hacia las grandes urbes a causa de la “Revolución industrial”. La situación de pobreza, el hacinamiento, jornadas de trabajo interminables y viviendas inadecuadas (húmedas, faltas de ventilación y luz natural), generaron las condiciones propicias para la propagación del *Mtb* [2].

El descubrimiento del agente etiológico se debe al microbiólogo alemán Robert Koch, quien empleó un novedoso método de tinción y lo aplicó a muestras de esputo procedentes de pacientes con TB, revelándose por primera vez el agente causante de la enfermedad: el *Mycobacterium tuberculosis*, o bacilo de Koch en su honor. En 1890 el mismo Koch desarrolla la tuberculina, un preparado obtenido de los cultivos del bacilo que creía útil como agente inmunizante pero que Charles Mantoux depuraría posteriormente para administrar por vía intradérmica como método diagnóstico conocido como prueba de Mantoux o de la Tuberculina. La cual consiste en la aplicación intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD), obtenido de la micobacteria y que actúa como antígeno, para generar una respuesta inmunitaria diferente en el huésped dependiendo si este ha estado o no previamente en contacto con el bacilo de la TB [2 Baguena 1992]. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) el PPD de referencia es el RT-23 (Statens Serum Institut, Dinamarca).

Haber conocido el agente causal de la TB condujo a la búsqueda de posibles tratamientos, pero no fue hasta mediados del siglo XX con el desarrollo de la estreptomycin y isoniacida, como fármacos específicos contra el *Mtb*, que se logró convertir a la TB en una enfermedad curable en la mayoría de los casos [2, 6]. La posterior aparición de la rifampicina, pirazinamida y del etambutol acortó los tiempos de tratamiento [7], generando una importante disminución en la tasa de mortalidad e incidencia; lo que llevó a un descenso tan grande de la enfermedad y la suposición de su eventual erradicación por los años setenta [2, 5, 8].

Por otro lado, hasta la fecha no se dispone de un método preventivo efectivo. La única vacuna existente por el momento es la denominada BCG (Bacilo de Calmette y Guerin), compuesta por una suspensión de bacterias atenuadas, de la cepa *Mycobacterium bovis*, y generada hace más de 100 años. La misma, se aplica a neonatos en regiones de todo el mundo con riesgo de TB siguiendo las indicaciones del programa de expansión de inmunización de la WHO. Aunque la BCG es efectiva para limitar la meningitis tuberculosa y diseminación en niños, su eficiencia para proteger a los adultos es escasa y contradictoria. Es por esto que hay una urgente necesidad de desarrollar

vacunas más efectivas. Si bien existen nuevas estrategias experimentales prometedoras [9] el desarrollo de vacunas eficientes claramente depende de una completa comprensión de la respuesta inmune (RI) ejercida por el hospedador contra este patógeno [10].

La tuberculosis en las últimas décadas del siglo XX. Desde mediados de los años 80 el mundo fue testigo de un dramático aumento en los casos de TB, las causas de tal incremento se debieron a diversos factores tales como: la co-infección con el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV), cambios socioeconómicos con marcadas diferencias sociales fundamentalmente en los países en vías de desarrollo con incremento de la pobreza, hacinamiento, desnutrición, mayor migración de individuos provenientes de países de alta prevalencia de la enfermedad hacia países más desarrollados, como así también el riesgo de reactivación de la TB latente por aumento en la expectativa de vida [5, 11]. Estas realidades sumadas a programas deficientes en el manejo de la TB condujeron a que en 1993 la WHO declarara a la TB "urgencia mundial".

1-1.2 Epidemiología de la Tuberculosis

La TB continúa siendo un importante problema de salud pública mundial. Según el informe de la WHO se presentaron 9 millones de nuevos casos de TB en 2013 y 1,5 millones de muertes por esta enfermedad (360.000 de los cuales fueron HIV positivos). Es así que la TB se ubica como la segunda causa de muerte atribuida a un agente infeccioso en todo el mundo, después del HIV [1]. La mayoría de los casos y de muertes se producen entre los hombres, pero la carga de la enfermedad entre las mujeres también es alta [1, 12].

Además de los factores involucrados en el aumento de la incidencia de la TB, previamente mencionados, se suman la capacidad de las bacterias para evadir la RI del hospedero, la de mutar y generar cepas resistentes a las drogas del tratamiento

antibacilar, a la par de la escasa asignación de recursos para la investigación de nuevas drogas, métodos diagnósticos y vacunas [13].

Si bien la micobacteria suele afectar pulmones, puede comprometer cualquier órgano o tejido del cuerpo humano [14]. Una vez producido el ingreso del *Mtb*, en función de la RI montada por el hospedero, podrán manifestarse distintos tipos de desenlaces. Aproximadamente un 5% de los individuos inmunocompetentes desarrollarán la enfermedad activa dentro de los primeros dos años post-infección, mientras que el 95% restante no presentará manifestación clínica de la enfermedad, ya que cursarán una infección asintomática [15]. Entre estos sujetos el 5 % reactivará la infección con el consecuente desarrollo de enfermedad en algún momento de su vida [16]. En los sujetos infectados inmunocompetentes y asintomáticos, es posible que el patógeno persista indefinidamente, son los denominados sujetos con TB latente (TBL). En estos casos la micobacteria permanece en un estado de latencia y retrasa su multiplicación, proceso que ocurre por la capacidad del bacilo para modificar su metabolismo ante circunstancias adversas como cambios en el pH del entorno o de la disponibilidad de oxígeno. De lo expuesto se desprende que el reservorio natural del *Mtb* es el ser humano, tanto el sujeto sano infectado como el enfermo.

Es importante mencionar que el riesgo de desarrollar la enfermedad activa es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está dañado, como ocurre en casos de infección por el HIV, desnutrición o diabetes [15, 17]. A lo que se suma el incremento en la incidencia de casos por micobacterias resistentes a los fármacos de primera y segunda línea.

El número de casos de TB activa en relación con la población (tasa de incidencia) varía ampliamente entre los países como puede observarse en la Figura 1. Las tasas más bajas registradas en el año 2013 se encuentran predominantemente en los países más desarrollados, incluyendo a Canadá, Estados Unidos, Japón, Australia, Nueva Zelanda y la mayoría de los países en el oeste de Europa. En estas regiones, la tasa de incidencia es menor a 10 casos por cada 100.000 habitantes. Mientras que en América, la mayoría de

los países tienen tasas por debajo de 50 casos por 100.000 habitantes, haciendo de este continente la región con la menor carga de TB en promedio.

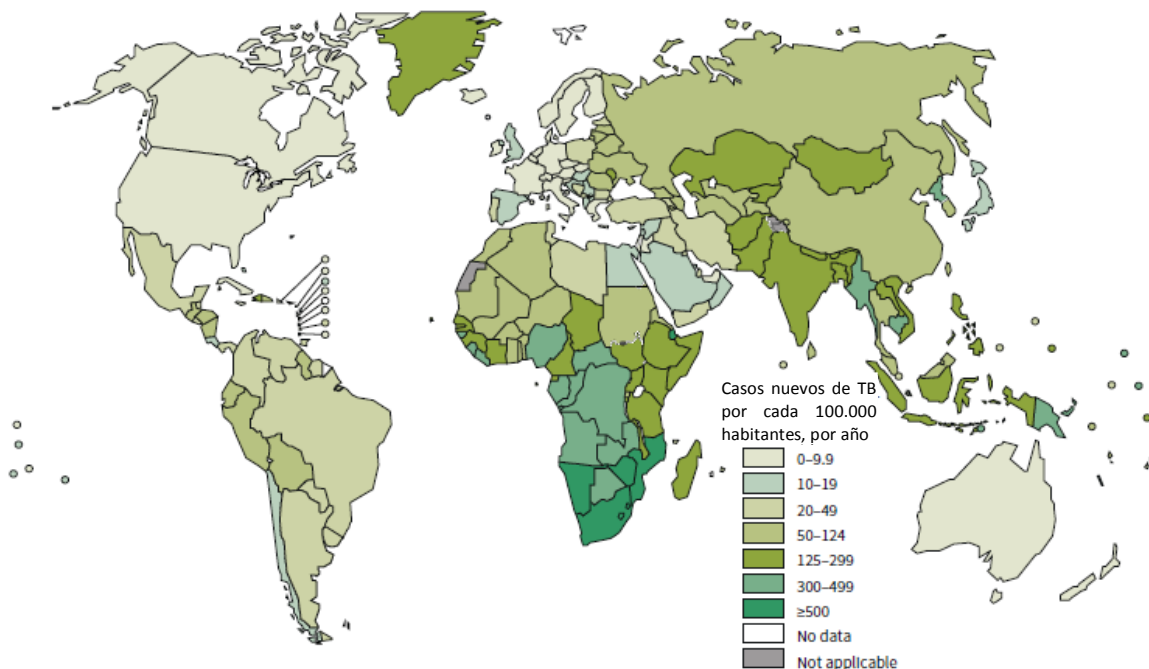


Figura 1. Número estimado de nuevos casos de tuberculosis durante el año 2013. ©Who 2014 [1]

En Argentina, en el año 2012 se notificaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Dr. Emilio Coni” 10.006 casos de TB, de los cuales el 90% fueron casos nuevos, constituyendo una tasa de 22,0 casos cada 100 mil habitantes (Figura 1). De estos, 7.533 tuvieron localización pulmonar, lo que representó un 83,1% de todos los casos nuevos [18]. Si bien en nuestro país la tasa de notificación ha registrado un leve descenso con respecto a lo observado en años anteriores, continúa existiendo una considerable brecha entre las diferentes jurisdicciones, con elevada concentración de casos en provincias como Jujuy, Salta y Tucumán (cuyas tasas (48,5; 45,7y 40,4 cada 100 mil habitantes, respectivamente) duplican prácticamente la media nacional). A su vez, la provincia de Buenos Aires y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires notifican la mitad de los casos de todo el país (Figura 2). Este panorama de desigual distribución de la enfermedad

en Argentina refleja un escenario epidemiológico preocupante que requiere especial atención.

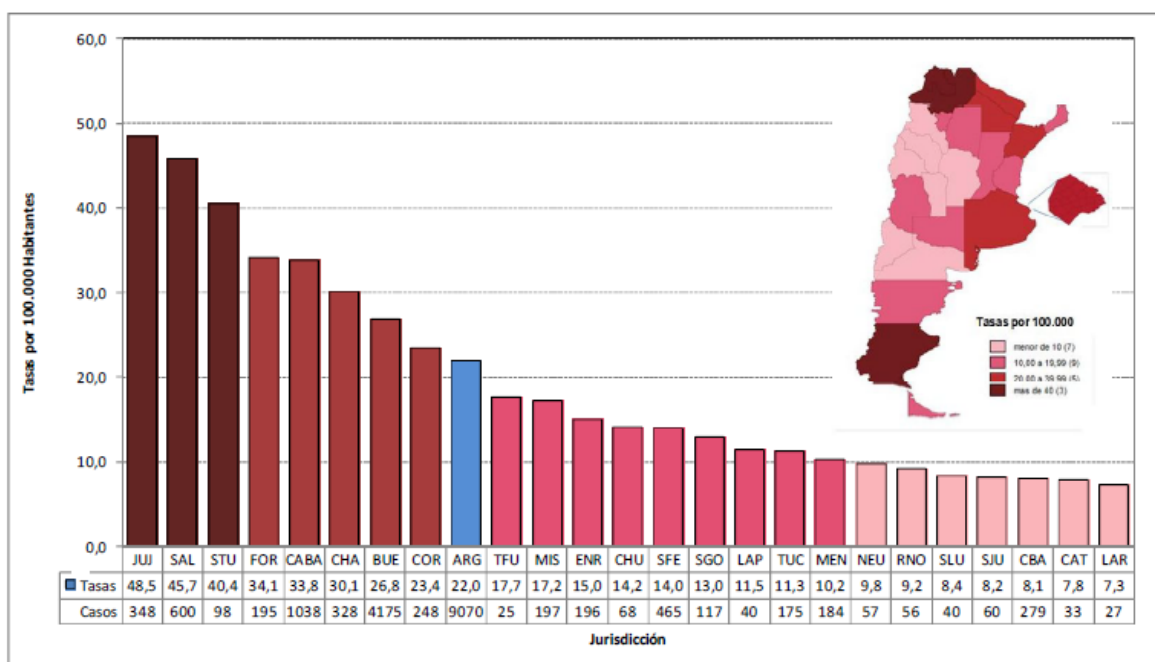


Figura 2: Número estimado de nuevos casos de tuberculosis durante el año 2012 en Argentina [18].

En el año 2006 a fin de reducir radicalmente la carga mundial de esta enfermedad para el 2015, la WHO formuló una nueva estrategia conocida como **Alto a la Tuberculosis**, cuya aplicación se recomendó en todos los países. La finalidad de este programa es reducir drásticamente la carga mundial de la TB para el año 2015, logrando la mitad de la incidencia, prevalencia y mortalidad presentada en el año 1990; para esto se propuso: garantizar que todos los pacientes, entre ellos los co-infectados por el HIV y los que padecen TB resistente a drogas del tratamiento específico, se beneficien del acceso universal a un diagnóstico de gran calidad y a un tratamiento centrado en el paciente; además de continuar con la expansión del DOTS (tratamiento directamente observado); y de fomentar y apoyar el desarrollo de nuevos instrumentos eficaces para prevenir, detectar y tratar la enfermedad [19, 20, 21]. Según el último reporte de la WHO, si bien es difícil que se cumplimente la estrategia para la fecha indicada, la incidencia, prevalencia y

tasa de mortalidad de la TB están disminuyendo a nivel mundial. La incidencia de esta enfermedad se redujo a una tasa promedio de 1,5% por año entre el 2000 y 2013; mientras que la tasa de mortalidad descendió un 45% y la de prevalencia un 41% desde 1990 hasta 2013 [1].

1-1.3 Diagnóstico y tratamiento de la TB

El diagnóstico de certeza de TB implica la identificación del agente causal en muestras de secreciones orgánicas o en muestras de tejidos. Las técnicas disponibles para el diagnóstico de esta enfermedad son: la bacteriología, la radiología, y la reacción de PPD, entre otras.

Bacteriología. La baciloscopía es la técnica diagnóstica más práctica, ya que es sencilla y rápida, puede ser realizada en la mayoría de los servicios de salud y detecta a los pacientes que expectoran gran cantidad de bacilos y diseminan la infección en la comunidad. Entre el 65 y 80% de los casos de TB pulmonar en adultos pueden ser confirmados por esta técnica que detecta la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), directamente de la muestra de esputo mediante la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, donde las micobacterias, debido a las características de su pared celular rica en lípidos y ceras, toman un color rojizo. En simultáneo se realiza un **cultivo** de la muestra de esputo del paciente. Esta es una técnica de mayor sensibilidad que la baciloscopía, el mayor inconveniente es el tiempo requerido para el diagnóstico dado que las colonias tardan entre 20 y 30 días para su desarrollo [22].

Radiología. Radiológicamente la TB puede producir: infiltrados, nódulos, cavidades, fibrosis y retracciones. Mediante esta técnica es imposible discriminar con certeza las lesiones activas de las inactivas, por lo que esto debe evaluarse mediante la bacteriología. Además la radiología no es tan efectiva para el diagnóstico ya que las

imágenes que genera la TB pueden ser producidas por otras patologías respiratorias y enfermedades sistémicas [22]. Esta técnica suele utilizarse para clasificar el grado de compromiso pulmonar presentado por los pacientes.

Reacción de PPD. La reacción de PPD o prueba de Mantoux, es de poca ayuda diagnóstica, ya que determina infección y no enfermedad. Entre el 10 al 20% de las formas de TB pueden aparecer como anérgicas (no reactivas) a la tuberculina, ya sea por mala realización de la técnica o por enfermedades que producen inmunodepresión, como infección por HIV, insuficiencia renal, malnutrición, etc. Además la reacción de Mantoux no permite distinguir una reacción inducida por la vacuna BCG de otra causada por una infección natural, por lo que no es de gran utilidad en países donde la vacunación con BCG es obligatoria, como sucede en Argentina. La prueba suele utilizarse: como índice epidemiológico de infección por *Mtb*, para detectar infecciones recientes por el viraje tuberculínico y para evidenciar la infección con la micobacteria en personas con alto riesgo de pasar de infección a enfermedad [22].

Otras técnicas de laboratorio. En la actualidad, podemos encontrar un conjunto de pruebas no convencionales para el diagnóstico de la TB, aunque ninguna cumple con las condiciones ideales de bajo costo, simplicidad, sensibilidad y especificidad. Estas pruebas incluyen: la reacción en cadena de la polimerasa, cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía gaseosa, cuantificación de Adenosina Deaminasa y dosaje de anticuerpos por técnica de Elisa [22]. También están los llamados IGRA (*interferon gamma release assays*), que detectan la liberación de Interferon Gamma (IFN- γ) por los linfocitos en respuesta a antígenos micobacterianos específicos, que suelen utilizarse como ayuda en el diagnóstico de infección latente y de enfermedad tuberculosa.

Pese a la aparición de nuevas metodologías, hasta el momento el examen bacilosκόpico directo es la técnica de confirmación más utilizada principalmente en los países en desarrollo [22].

1-1.3.1 Tratamiento

La mayoría de los pacientes con TB se curarán si se les indica y cumplen con el tratamiento adecuado. Actualmente se cuenta con medicamentos de primera y segunda línea, los primeros también conocidos como esenciales son la isoniacida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB). Estos fármacos son efectivos en la mayoría de los casos y logran la curación de los pacientes en un período de aproximadamente seis meses. Mientras que los medicamentos de segunda línea o subsidiarios, como las fluoroquinolonas y la rifabutina, son los que se utilizan en caso de reacciones adversas y resistencia a fármacos tradicionales [1]. La prolongada duración del tratamiento específico tiene como consecuencia que la adherencia y el cumplimiento del mismo sea incompleto o parcial, en muchos casos provocando la aparición de numerosas cepas de *Mtb* resistentes a algunos de los fármacos específicos de primera línea –generalmente a INH y RMP- como es el caso de la TB multirresistente (MDR-TB) o a casi todos los fármacos, como en la TB extremadamente resistente (XDR-TB) –INH, RMP, fluoroquinolonas y a otras drogas inyectables de segunda línea como la kanamicina- [23]. Es por esto que en muchos lugares del mundo, incluido Argentina, se ha optado por el tratamiento supervisado, asegurando de este modo la toma diaria de la medicación. Esta estrategia conocida como DOTS, es el esquema promovido por la WHO desde 1995, ya que mejora la adherencia al tratamiento y disminuye el riesgo de aparición de multirresistencia debida a la toma irregular de los medicamentos y al abandono del mismo [1, 24].

Los medicamentos específicos actualmente empleados para la TB cumplen, en su conjunto, con los siguientes requisitos: potencia bactericida contra los bacilos metabólicamente activos, actividad esterilizante contra los bacilos de metabolismo semi-activo y persistentes; y prevención de la selección de bacilos resistentes durante el tiempo del tratamiento. Como no se conoce ningún agente quimioterápico que posea en sí mismo todas estas propiedades, en forma suficiente para el tratamiento, se deben utilizar cuatro drogas de manera combinada en los primeros dos meses (fase inicial intensiva) generalmente INH, RMP, PZA y EMB, para eliminar la mayor parte de la población bacilar

activa rápidamente y negativizar los exámenes baciloscópicos. En los cuatro meses restantes (fase de continuación) se administran dos drogas, INH y RMP, cuyo objeto es reducir el número de bacilos persistentes a fin de evitar recaídas después de finalizado el tratamiento [22]. El esquema farmacológico utilizado es bien tolerado, de baja toxicidad y logra la curación de casi el 100% de los enfermos, con 1 a 2% de recaídas. La mayoría de los pacientes con TB completa su tratamiento sin presentar ningún efecto secundario significativo a los medicamentos [22, 25].

La mejor manera de prevenir la TB es detectar precozmente a las personas enfermas para que inicien rápidamente el tratamiento y verificar que el mismo se cumpla, así como también controlar los contactos para descartar la presencia de la enfermedad en ellos [25]. Se considera contactos o convivientes de alto riesgo a aquellos individuos que conviven al menos 6 hs diarias con un paciente bacilífero.

1-1.4 Agente etiológico

El agente etiológico causante de la TB pertenece al complejo *M. tuberculosis* (MTBC), el cual incluye otras seis especies relacionadas: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, y *M. canetti*. Todos los miembros de este complejo son genéticamente similares [26, 27].

La especie tipo es el *Mtb*, que se trata de una bacteria con forma de bastón que no posee flagelos, no forma esporas, no produce toxinas, no posee cápsula, es aeróbica estricta y de vida intracelular. Su pared es sumamente particular y es responsable de muchas de las características de la micobacteria como su crecimiento lento y antigenicidad. Aproximadamente un 60% de la pared bacteriana está compuesto por lípidos, y de estos los que se encuentran en mayor proporción son los ácidos micólicos, que representan el 50% del peso seco de la pared celular y actúan como antígenos en el hospedero. Además, la pared celular de la micobacteria contiene una capa de

péptidoglicano denominado lipoarabinomanano (LAM), esta molécula es compleja y se extiende desde la membrana plasmática hasta la superficie celular. El péptidoglicano está unido a un polisacárido ramificado, llamado arabinogalactano, por enlaces fosfodiéster; quien a su vez se encuentra unido a los ácidos micólicos. Por lo que el esqueleto de la pared celular de las micobacterias está formado por el complejo péptidoglicano-arabinogalactano-ácido micólico [28, 29]. Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos están intercaladas con la de los numerosos lípidos y glicolípidos asociados con la pared. El alto contenido de lípidos en la pared de la bacteria es el responsable de volverla hidrófoba, lo cual hace que estas sean resistentes a la coloración con tinciones básicas de anilina, a menos que éstas se apliquen con calor o detergentes, o durante periodos prolongados, y es por esto que se les asigna el nombre de BAAR [30].

El crecimiento micobacteriano está subordinado a presencia de oxígeno y al valor del pH circundante, las condiciones ideales de multiplicación del bacilo son pH de 7,40 y una presión de oxígeno entre 100 y 140 mm de Hg. Es muy resistente a las condiciones de frío, congelación y desecación; por el contrario, es muy sensible a las de calor, luz solar y luz ultravioleta. Pertenece al grupo de micobacterias de crecimiento lento, ya que posee un tiempo de duplicación que varía de 12 a 20 hs. Cultivadas en medio sólido Löwenstein-Jensen, las colonias demoran entre 3 y 4 semanas para su identificación, y presentan una superficie característica rugosa y seca.

Las distintas cepas de *Mtb* poseen diferentes capacidades de virulencia y pueden ser distinguidas por técnicas de biología molecular, como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) [31], estas técnicas además permitieron establecer el origen y la evolución del MTBC [32, 33]. Actualmente se dispone del genoma secuenciado de *Mtb* (cepa de laboratorio H37Rv) así como de la información de las proteínas que codifica, herramientas importantes para la identificación de genes de factores de virulencia, los que podrán utilizarse como nuevos blancos para la quimioterapia [34]; a su vez, la identificación de nuevos antígenos será de utilidad tanto en el diagnóstico y pronóstico de la TB como en el diseño de nuevas vacunas.

1-1.5 Aspectos patogénicos y clínicos de la TB

La transmisión de la enfermedad producida por el *Mtb* se origina por la inhalación de pequeñas gotas de Flügge que contienen la micobacteria, expelidas por un enfermo bacilífero. El reducido tamaño de las mismas posibilita su permanencia en el aire en suspensión por al menos 30 minutos, además le permite al bacilo ingresar hasta la vía aérea pequeña y sacos alveolares, donde se pone en contacto con los macrófagos (MΦ). Los factores determinantes del contagio incluyen la localización de la TB (pulmonar o no), características de la enfermedad (mayor o menor cantidad de bacilos en el esputo), la duración y frecuencia del contacto entre la persona sana y la enferma, las características del ambiente en que ocurre (inadecuada ventilación) y las condiciones del individuo expuesto (nutrición, enfermedades concomitantes).

Si bien es posible el contagio tras un único contacto, gran parte de las infecciones se producen por una exposición sostenida en el tiempo. La enfermedad comienza como una respuesta inflamatoria alveolar no específica, que progresa hacia una reacción de tipo granulomatosa [22, 35]. El foco inicial es casi siempre de localización subpleural generalmente ubicado en la zona media de los pulmones donde el mayor flujo aéreo favorece el establecimiento de los bacilos inhalados. Excepcionalmente se encuentra el foco inicial en otras áreas (por ejemplo: piel, intestino, orofaringe, genitales). En la mayoría de los casos el foco pulmonar inicial es único, aunque en un 25% de los casos pueden ser múltiples [36].

Los primeros acontecimientos que siguen a la inhalación del *Mtb* implican la internalización de los bacilos por los MΦ alveolares y, a menudo, su muerte inmediata por diferentes mecanismos bactericidas de estas células (activación de enzimas proteolíticas y especies reactivas del oxígeno -ROS- como consecuencia de la maduración del fagosoma, entre otras). La eficacia de estos mecanismos depende de la capacidad intrínseca microbicida de los MΦ alveolares, las características patogénicas de la cepa del *Mtb* inhalado, y el microambiente inflamatorio en el sitio de la infección. Si bien la RI frente al

Mtb es en general eficaz en el control de la infección primaria, la micobacteria casi nunca es erradicada por completo [37].

La TB puede presentarse en tres estadios: **primaria, latente y post-primaria**. La primera es la infección que se presenta en una persona que no ha tenido contacto previo con el *Mtb*, suele ocurrir durante la infancia y frecuentemente cursa como una enfermedad asintomática y auto-limitada, excepto bajo ciertas circunstancias donde puede progresar causando meningitis o TB diseminada, especialmente en individuos muy jóvenes o inmunodeprimidos. La respuesta temprana del huésped frente a la infección está caracterizada por la afluencia de células fagocíticas, que incluyen principalmente a los MΦ alveolares allí residentes, células dendríticas (CD) y neutrófilos reclutados. Los bacilos internalizados por los fagocitos pueden ser inmediatamente eliminados o crecer en el medio ambiente intracelular en lesiones localizadas. Dos a tres semanas después de la infección se establece la inmunidad celular, y la subsecuente infiltración de MΦ y linfocitos activados en la lesión, lo que conduce a la eliminación de la mayor parte de los bacilos y a la finalización de la infección primaria, habitualmente sin la presencia de síntomas clínicos [15, 20, 38, 39]. Si la RI del huésped predomina, la lesión es contenida, pudiendo o no causar daño residual en los pulmones [14, 40].

La TB Post-primaria, también conocida como Secundaria es la fase de la infección que se produce en una persona previamente sensibilizada, tanto si los bacilos provienen de origen endógeno (reactivación) o exógeno (reinfección). El desarrollo de una TB post-primaria como ya se expresó ocurre en un 5%-10% de las personas con una infección latente [41]. Una respuesta inefectiva al control de la multiplicación bacilar, lleva a una evolución inadecuada del granuloma con la aparición de necrosis caseosa seguida de formación de cavidades, y a una diseminación del material infeccioso a través de los bronquios, que habitualmente se eliminan con el esputo. La enfermedad comienza como un proceso inflamatorio exudativo con características neumónicas y a medida que progresa aparecen los síntomas típicos de la TB que incluyen tos, expectoración, fiebre, sudoración nocturna, anorexia y pérdida de peso. La caseificación y la cavitación se presentan con posterioridad, principalmente en los lóbulos superiores. Si la infección

progresar de forma aguda, su pronóstico empeora y puede generar una amplia destrucción de tejidos. Por el otro lado, si el infiltrado inicial progresa hacia cronicidad, el proceso podría estabilizarse con el desarrollo de fibrosis. En esta etapa los enfermos podrían sobrevivir por varios años, con recurrentes episodios de hemoptisis. En la Figura 3 se muestra el curso natural de los eventos y desenlaces de la exposición al *Mtb* [15].

Ante una inadecuada RI el contenido bacilar puede vaciarse en la sangre y/o linfa infectando otros órganos. Esta forma de la enfermedad, conocida como TB miliar, suele ocurrir en los nódulos linfáticos, el hígado, el sistema genitourinario, las meninges, el peritoneo, la piel y el mismo pulmón [20], y representa entre el 1-2% de todos los casos de TB reportados.

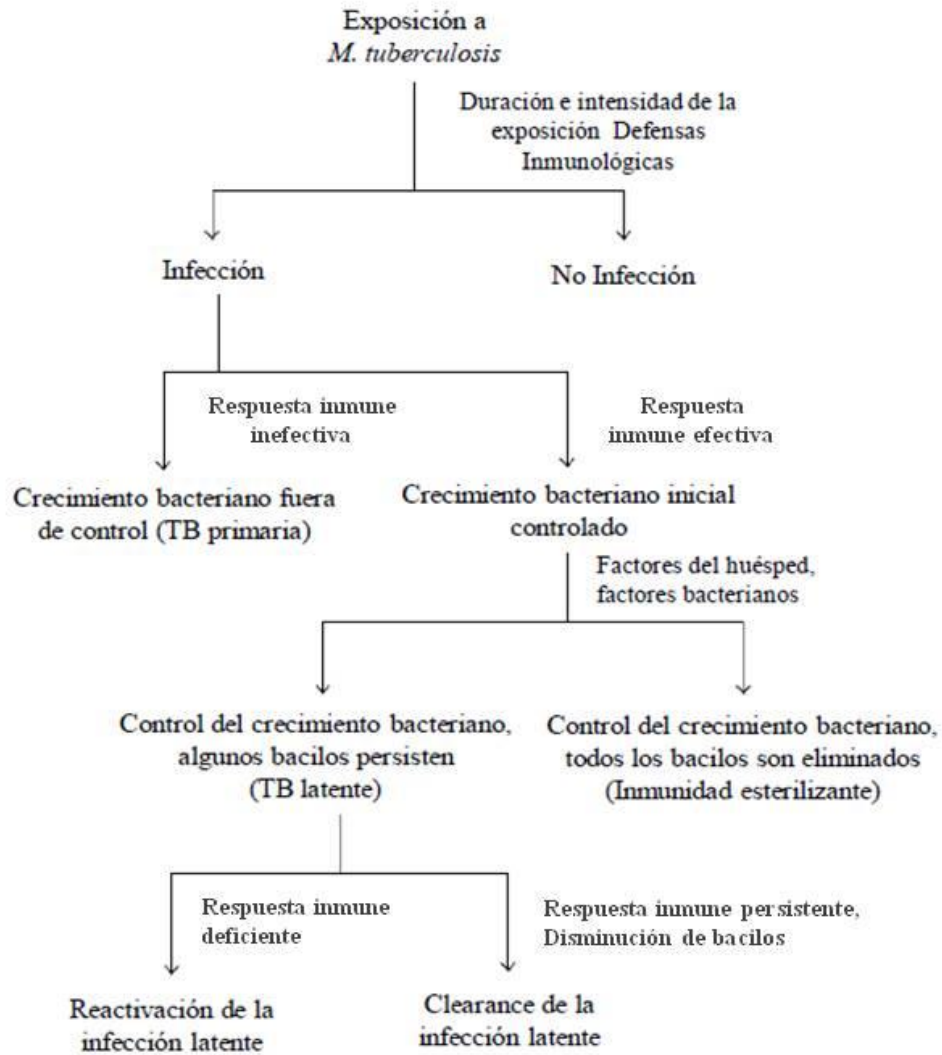


Figura 3. Progresión del curso natural de los eventos y desenlaces en individuos inmunocompetentes expuestos al *Mtb*. Adaptada de Ahmad y colaboradores [42].

1-1.6 Estructura del granuloma

La TB es una infección esencialmente pulmonar y es en este órgano donde la micobacteria se pone en contacto con las células allí residentes, principalmente con los MΦ alveolares (su huésped por excelencia). Algunos individuos no muestran signos de la infección: ninguna patología, sin síntomas clínicos y sin la aparente presencia de la RI adaptativa. Es posible que en estas situaciones la RI innata haya eliminado al bacilo, en un

estadio temprano, por completo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la internalización de la micobacteria por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) induce una respuesta inflamatoria. La liberación de citocinas y quemoquinas provoca la rápida acumulación de una gran variedad de células inmunes, y con el tiempo, la formación de una estructura conocida como granuloma [43].

El granuloma es el resultado de la interacción local entre la bacteria y las células del hospedero dentro del sitio de la infección. Esta estructura presenta un rol dual, por un lado crea un microambiente inmunológico en el que la infección puede ser controlada, sin embargo en algunos casos también le proporciona a la bacteria un nicho donde puede modular la RI para asegurar su supervivencia durante largos períodos de tiempo [44]. La formación de esta estructura es un proceso dinámico que comienza poco después de la infección y evoluciona continuamente con el tiempo. Uno de los factores más importantes que se requieren para el establecimiento de la infección es un equilibrio entre las citocinas pro- y antiinflamatorias, producidas para reducir o controlar la proliferación bacteriana. Entre estos mediadores los que más se destacan son el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) y el IFN- γ , particularmente importantes para promover la formación y función del granuloma, mientras que la Interleucina 10 (IL-10) es uno de los principales reguladores negativos de la respuesta.

El granuloma consiste en una lesión anatomopatológica bien estructurada y organizada, constituyendo un agregado multicelular dinámico donde predominan desde el centro hacia la periferia los M Φ en diferentes estadios madurativos (células gigantes multinucleadas, células espumosas y células epitelioides), neutrófilos y linfocitos T de diversos fenotipos. Dentro del grupo de linfocitos encontramos las células TCD4+ que se distribuyen tanto en el interior como en las capas más externas del granuloma, los linfocitos TCD8+ (LTCD8+) ubicados principalmente en la zona externa, así como también células T- $\gamma\delta$, células citotóxicas naturales (NK), y células T reguladoras. Además, en la zona más externa pueden observarse agregados de células B, muchas de ellas, actuando como CPA [41]. El típico granuloma caseoso incluye un centro necrótico, si bien pueden encontrarse algunos bacilos en este sitio la mayoría de ellos se ubican en la interfase entre

el centro necrótico y la zona rica en MΦ. A medida que la enfermedad progresa, los granulomas tienden a ser menos organizados y pueden devenir en cavitarios, lo cual facilita la conexión del centro caseoso con el árbol bronquioalveolar. La pérdida de organización de esta estructura altera la interacción entre las células inmunes y deriva en la destrucción tisular. Eventualmente esta lesión puede curar por fibrosis y/o calcificación. Si la alteración de la estructura del granuloma persiste, proceso conocido como cavitación, asociada con el incremento en el número de bacilos, facilita la diseminación de la bacteria a otras áreas del pulmón y hacia otros órganos con formación de nuevos granulomas [41, 45]. Esto da lugar al síntoma característico de la TB, una tos persistente con sangre en el esputo. En este punto, el paciente es altamente contagioso, dado que libera las bacterias a través de las gotitas de saliva [10]. En la Figura 4 se muestra la progresión del granuloma tuberculoso humano [41].

En base a lo expuesto resulta claro que la destrucción tisular que se observa en la TB no se encuentra mediada mayoritariamente por la micobacteria sino que es de naturaleza inmunológica. De esta manera se torna evidente que la RI e inflamatoria es crítica tanto para la supervivencia del hospedero como así también de la bacteria. Es por esto que el bacilo por su parte estimula y subvierte de manera activa esta respuesta con el fin de asegurarse su supervivencia y propagación [46].

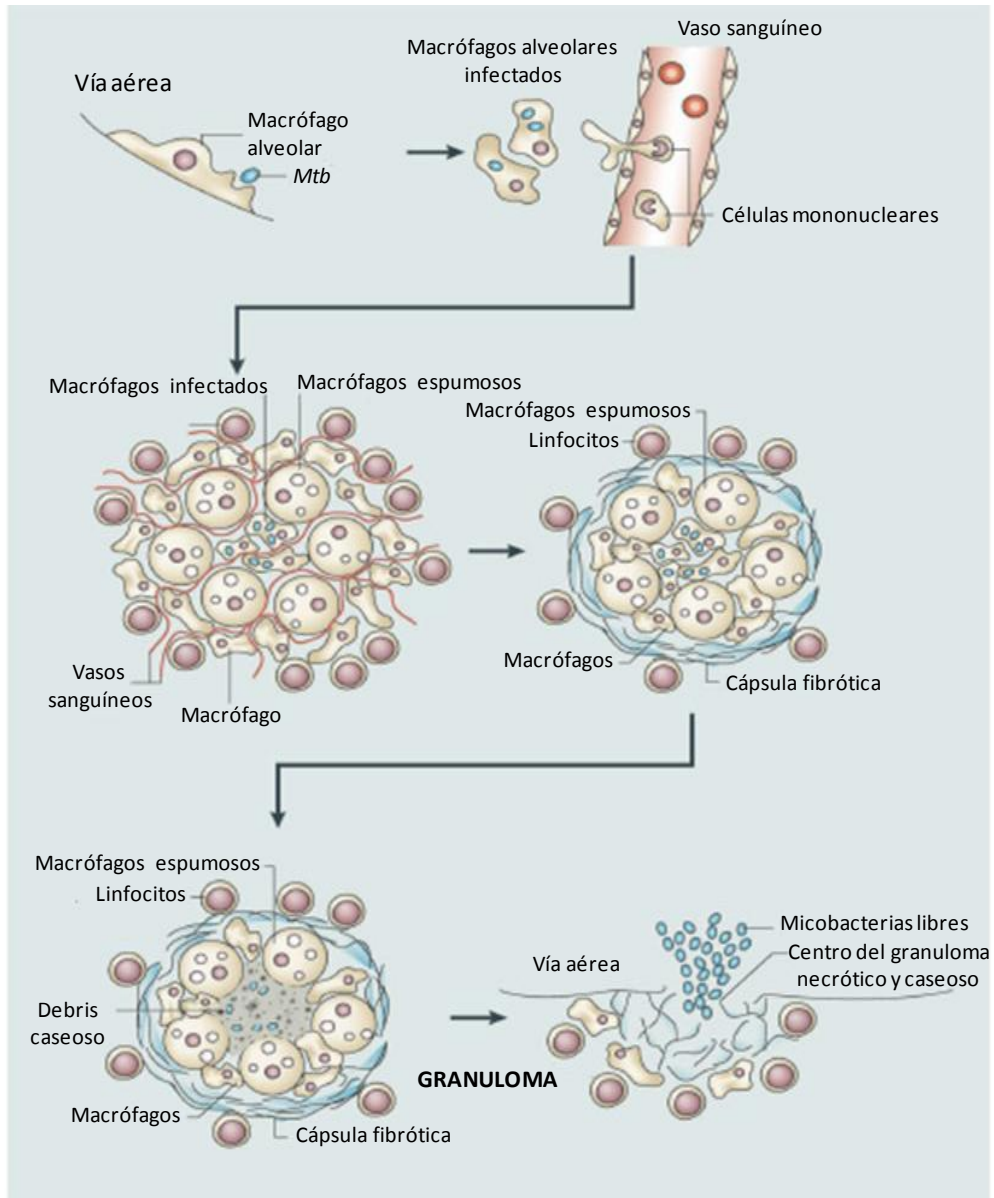


Figura 4: Progresión del granuloma tuberculoso humano. Adaptada de Russell y colaboradores [41].

1-2 El Sistema Inmune frente a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*

1-2.1 Inmunidad Innata en la infección con *Mtb*

El sistema inmune (SI) innato o inespecífico es el más ancestral para la defensa del hospedero y está constituido por una serie de factores solubles, proteínas y células especializadas que le permitirán lidiar con el patógeno en las primeras instancias de la infección. Dentro de las células que forman parte de este sistema podemos mencionar a los MΦ, CD, neutrófilos, NK, linfocitos T-γδ, mastocitos y células epiteliales.

Muchos de los mecanismos efectores de la RI innata son utilizados por la RI adaptativa, favoreciendo su activación en pos de la destrucción del patógeno [47]. Si bien no se conocen en su totalidad los mecanismos de la inmunidad innata que responden al bacilo, su importancia resulta evidente si consideramos que la gran mayoría de los individuos expuestos por primera vez a la micobacteria no se enferman.

Reconocimiento de la micobacteria por el sistema inmune. La infección con *Mtb* comienza por el reconocimiento de la bacteria luego de su inhalación, y la captación de la misma por parte de los fagocitos residentes en el pulmón, incluyendo MΦ alveolares y CD. Estas células juegan un rol fundamental en el inicio y direccionamiento de la inmunidad adaptativa mediante la presentación de antígenos micobacterianos, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas [48, 49]. El reconocimiento de moléculas antigénicas expresadas por el *Mtb* conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que constituyen estructuras muy conservadas entre los microorganismos (como ácido nucleico bacteriano, carbohidratos, lipopéptidos, glicolípidos, entre otros), es fundamental para el inicio de la RI innata del hospedero. Estas señales son detectadas por un grupo de receptores expresados tanto en la superficie de las células como en compartimentos intracelulares, denominados colectivamente receptores de reconocimiento de patógeno (RRP) [50]. Muchos RRP actúan principalmente como receptores de señalización, pero algunos de ellos también están

implicados en la fagocitosis de la bacteria, en la activación del complemento e inducción de la apoptosis [51]. La expresión de los RRP no se encuentra restringida a las células presentadoras, sino que también pueden hallarse en otras poblaciones celulares sanguíneas, células del epitelio y mucosas. Algunos de los receptores más destacados son: receptor para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G (FcγR), receptor de complemento 3 (CR3), los de tipo Toll (TLR), los de tipo NOD (NLR), de lectina de tipo C, entre otros [48, 49].

Las micobacterias pueden ser opsonizadas por IgG, C3b y proteínas de unión a manosa, así como por el factor surfactante A, lo que ayuda a que la bacteria ingrese al MΦ de manera eficiente. Los bacilos opsonizados por moléculas de inmunoglobulina G (IgG) ingresan a la célula hospedadora vía el FcγR, este mecanismo de ingreso favorece la fusión fagosoma-lisosoma e induce la producción ROS, contribuyendo de este modo con la eliminación del bacilo [48]. Si en cambio, la micobacteria se encuentra opsonizada por fragmentos del complemento C3b es reconocida e internalizada por CR3. Este receptor puede reconocer también productos microbianos como residuos de oligosacáridos presentes en la superficie del *Mtb*, por lo tanto participa en la fagocitosis de la micobacteria opsonizada por C3b, como de las no-opsonizadas [52]. La fagocitosis mediada por CR3 no contribuiría con la muerte de la bacteria, dado que el reconocimiento e ingreso de la misma mediado por este receptor inhibiría la maduración del endosoma temprano y el estallido respiratorio [48].

Los TLR constituyen una familia de receptores conservados filogenéticamente, esenciales para el reconocimiento de patógenos fundamentalmente por MΦ y CD, así como por otras células inmunes (neutrófilos, mastocitos). Estos receptores están conformados por proteínas transmembrana que contienen motivos repetidos ricos en leucina en su dominio extracelular, mientras que el dominio citoplasmático es homólogo al de señalización del receptor para la Interleucina-1 (IL-1R) y recibe el nombre de dominio TIR (*Toll/IL-1 receptor*). Este último activa la proteína de diferenciación mieloide (MyD 88), componente de señalización común a todos los TLR (con excepción del TLR-3), que une a los TLR a Irak [53, 54]. Irak constituye una serina cinasa que activa factores de

transcripción, como el factor nuclear- κ B (NF- κ B), favoreciendo la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), quemoquinas, moléculas co-estimuladoras, así como la inducción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) a través de la producción de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) [51, 55]. Hasta el momento se han identificado tres TLRs que juegan un importante rol en la detección del *Mtb* y en el inicio de la RI contra la micobacteria [55]. **TLR-2** (como homodímero o heterodímero con TLR-1 o TLR-6) reconoce lipopéptidos y glicolípidos; **TLR-4** interactúa con lipoproteínas y **TLR-9** con ADN bacteriano [56, 57]. Algunos trabajos recientes proponen que TLR-3 también interactuaría con la micobacteria al reconocer su ARN y favorecería la producción de IL-10 a través de la vía de señalización fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa (PI3K/AKT) [58]. A pesar del gran incremento de información sobre la conformación y mecanismos de acción de estos receptores, frente a la infección por *Mtb*, aún existen muchos interrogantes.

Los NLR representan una amplia familia de censores intracelulares que están involucrados en la detección de señales provenientes de patógenos y también de situaciones de estrés. Se sabe que los NLR reconocen, dentro del compartimento citoplasmático, péptidos muramilados y péptidoglicanos que pueden hallarse sobre la micobacteria. La activación de NOD2, uno de los integrantes más caracterizados de esta familia de receptores, favorece la RI inflamatoria a través de la activación de la vía del NF- κ B [50, 59, 60]. Además otros miembros de la familia NLR como NLRP1 y NLRP3 activan los llamados inflamomas, complejos de estructuras proteicas inductores de procesos proteolíticos. En el caso del *Mtb*, la inducción del NLRP3-inflamoma lleva a la activación de la caspasa 1, la cual actúa sobre diferentes pro-citocinas de la familia de IL-1 (IL-1 β e IL-18) las que son activadas y secretadas [61, 62]. Algunos estudios en ratones demostraron que la micobacteria utilizaría diversos mecanismos para inhibir la activación de este inflamoma, lo que generaría una disminución en la producción de IL-1 β [62, 63].

Con respecto a los receptores de lectinas de tipo C, varios de ellos están involucrados en el reconocimiento del *Mtb*, principalmente de las estructuras de polisacáridos. Un ejemplo son los receptores de manosa que, como su nombre lo indica, reconocen residuos terminales de manosa presentes sobre la micobacteria e inducen la

fagocitosis de la misma. El ingreso del *Mtb* por esta vía inhibe la fusión fagosoma-lisosoma y estimula la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13) y dificulta la síntesis de IL-12 [57, 64, 65]. Al respecto, se ha demostrado que la internalización del *Mtb* por M ϕ humanos utilizando este receptor, no conduce a la muerte del bacilo, ni reduciría la carga bacilar [66], de acuerdo a lo demostrado en un modelo murino [67].

Otro tipo de receptor de lectina de tipo C, DC-SIGN, juega un papel fundamental en el reconocimiento e internalización de la micobacteria por parte de las CD y en menor medida por los M ϕ alveolares. DC-SIGN actúa como RRP y como receptor de adhesión, favoreciendo la migración de las CD y la interacción entre estas células con los linfocitos [57]. La activación de este receptor por el *Mtb* promueve una respuesta antiinflamatoria mediada por la inducción de la producción de IL-10 por parte de las CD [48, 68].

Dectin-1, que también forma parte de los receptores de lectina de tipo C, es expresado fundamentalmente en M ϕ , CD y neutrófilos. Generalmente reconoce β -glucanos y ha sido ampliamente estudiado en infecciones fúngicas, aunque también es conocida su participación en el reconocimiento del *Mtb* [57]. Si bien no se sabe con que ligandos micobacterianos interactuaría, hasta el momento el ligando que podría ser reconocido es el α -glucano presente en la superficie de algunas micobacterias [69]. Rothfuchs y colaboradores demostraron en un modelo murino *in vitro* que la exposición de CDs provenientes del bazo estimuladas con *Mtb*, favorecería la producción de IL-12 vía la activación de este receptor [69, 70].

Por lo expresado se puede inferir que la respuesta a desarrollar contra *Mtb* va a depender, entre otros factores, del tipo de receptor con el que esta interactúe en los estadios tempranos de la infección.

Células de la inmunidad innata. A continuación se detallan las funciones de los integrantes más importantes de la respuesta innata frente a la infección por *Mtb*.

Macrófagos: El MΦ es la célula blanco con respecto a la infección por *Mtb*. De hecho, los MΦ alveolares han demostrado jugar un papel esencial en la eliminación de las partículas que ingresan en el organismo a través de las vías respiratorias, y han sido considerados como una de las primeras poblaciones celulares que interactúan con el bacilo de la TB, además también están involucradas en el inicio de la respuesta adaptativa. El reconocimiento e ingestión del *Mtb* por parte de los MΦ gatilla, mediante la inducción de diversas vías como por ejemplo la del NF-κB, la activación transcripcional de numerosos genes, entre ellos se incluyen los de las citocinas proinflamatorias y quemoquinas, iniciando así la cascada inflamatoria necesaria para la llegada de leucocitos al sitio de la infección [57, 71, 72].

Estas células pueden eliminar a la micobacteria a través de diversos mecanismos, bien establecidos sobre todo en modelos murinos. Con respecto a la fagocitosis, en condiciones ideales, la internalización de microorganismos inicia una serie de procesos dinámicos donde distintas vesículas endosomales y por último el lisosoma, se fusionan al fagosoma inicial o temprano y llevan a la formación del fagolisosoma o fagosoma maduro. La actividad antimicrobiana del fagolisosoma está mediada, al menos en parte, por la función degradativa de las hidrolasas lisosomales y por el medio ácido, que tienen como consecuencia la degradación de lípidos y proteínas bacterianas. Además la maduración del fagosoma favorece la producción de ROS, que constituye un importante mecanismo microbicida demostrado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [73, 74], ya que dañan al patógeno produciendo importantes modificaciones en su ADN, lípidos y proteínas [57, 75]. A este mecanismo efector se sumaría la producción de RNS como consecuencia de la activación del MΦ.

Sin embargo, se ha observado que la micobacteria utiliza diversos mecanismos para poder sobrevivir dentro de los MΦ, por ejemplo restringiendo la acidificación del fagosoma mediante la exclusión de la bomba de protones, pudiendo además contribuir a este efecto la producción de NH_4^+ por parte del patógeno [76]. Por otro lado, *Mtb* interfiere con la maduración del fagosoma, existen trabajos que demuestran que sulfatidos y algunos glicolípidos micobacterianos impiden la fusión fagolisosomal. La

inhibición de la maduración del fagosoma podría estar también asociada al secuestro de una proteína, identificada por Ferrari y colaboradores, conocida como TACO (*Tryptophan Aspartate Coat protein*). Esta proteína se encuentra asociada a la red de microtúbulos corticales en MΦ no infectados y, tras la infección con *Mtb*, la misma se relocaliza en la membrana fagosomal, manteniéndose allí por prolongados períodos de tiempo. De esta manera, a través de la retención de TACO y la consecuente inhibición de la fusión fagolisosomal el *Mtb* evade una de las potentes vías microbicidas macrofágicas. La inhibición de la maduración del fagosoma mediada por la bacteria, puede ser revertida por citocinas como el IFN-γ y el TNF-α, que a su vez también estimulan los mecanismos microbicidas [77, 78, 79]. Es importante mencionar que TACO se une a la membrana plasmática de los MΦ a través del colesterol [80, 81]. De hecho, el colesterol presente en la membrana de estas células es una molécula esencial para la internalización de la micobacteria, estabilizando su interacción con la membrana del MΦ y haciendo más efectivo su ingreso por fagocitosis [77]. La importancia de este lípido se hizo evidente en un modelo *in vitro* donde al reducir los niveles de colesterol en la membrana de MΦ murinos derivados de medula ósea, se observó una marcada reducción en la internalización de la micobacteria [77].

Otro mecanismo utilizado por el *Mtb* para evadir las defensas del hospedero está dado por la manipulación de las vías de muerte de la célula hospedera. La apoptosis de estas células mantiene la membrana plasmática intacta, restringe la viabilidad y diseminación del bacilo (que queda retenido dentro de los cuerpos apoptóticos), y favorece la presentación cruzada por parte de las CD [82]. Alternativamente la muerte por necrosis, caracterizada por lisis celular, favorece la supervivencia y propagación de la bacteria fuera del hospedero e incrementa la respuesta proinflamatoria [83]. En el caso particular del *Mtb*, la micobacteria impediría la apoptosis y promovería la muerte por necrosis de estas células mediante la estimulación de la producción de lipoxinas, como la lipoxina A4 (LXA4), que inhibe la producción de prostaglandina E2, la cual es necesaria para la protección de la membrana interna mitocondrial [83, 84]. Estudios en MΦ humanos y murinos demostraron que la infección de estas células por cepas de

micobacterias atenuadas induce apoptosis, mientras que las cepas virulentas inducen necrosis [85], indicando de este modo que el destino del MΦ se ve influenciado diferencialmente de acuerdo a la virulencia de la micobacteria con la que interactúa.

En MΦ humanos se observó que el metabolito biológicamente activo de la vitamina D3: 1,25 dihidroxi vitamina D3 [1,25 (OH) 2D3], sólo o conjuntamente con IFN-γ y TNF-α, era capaz de activar a los MΦ para inhibir o eliminar al *Mtb*, por ejemplo mediante la inducción de la producción de proteínas antimicrobianas como las catelipsinas [73, 86]. En este caso, el destino de la micobacteria intracelular es ser eliminada a través de la autofagia, un proceso celular a través del cual los componentes celulares, como organelas o patógenos intracelulares, son secuestrados en una estructura llamada autofagosoma que se fusiona con los lisosomas para su degradación [75, 87]. La autofagia actuaría como un efector inmune, por lo que su inducción y activación contribuiría con la eliminación del *Mtb* favoreciendo la maduración del fagosoma [86]. Algunos estudios en modelos murinos demostraron que el tratamiento con INH y PZA induce autofagia en MΦ infectados con *Mtb*, contribuyendo también de este modo a la eliminación de la micobacteria [86].

El MΦ requiere de hierro para poder ejercer algunas de sus funciones microbicidas, con lo cual se establece una franca competencia por el mismo entre patógeno y hospedero, dado que para el *Mtb* este metal es esencial para su supervivencia. El MΦ se provisiona de hierro a través del receptor para la transferrina, mediante el cual internaliza este metal extracelular unido a transferrina y lactoferrina. Al producir el *Mtb* un arresto en la maduración endosomal las condiciones reinantes de mediana acidez favorecerían la separación del hierro de su transportador en beneficio de la micobacteria [88]. Además, el *Mtb* ha desarrollado moléculas especiales para la fijación de este metal conocidas como sideroforos. Estos tienen gran afinidad por el hierro intracelular y lo captan para luego transferirlo a ciertas moléculas especializadas de la pared micobacteriana, las micobactinas [88, 89].

Como se ha señalado anteriormente, los MΦ son las principales células que se encuentran en los granulomas, pero no todos los MΦ dentro de esta estructura están infectados. Las células no infectadas parecen ayudar en la contención de la infección y

contribuirían a la secreción de citocinas. Diversos estudios en ratones sugieren la existencia de dos tipos de M ϕ , los activados de manera clásica (M1) que se diferencian en respuesta a la señal de diversas citocinas, o los activados de modo alternativo (M2). Los M1, inducidos por la secreción de citocinas de los linfocitos T colaboradores de tipo 1 (Th1), fundamentalmente IFN- γ , son capaces de destruir a la bacteria y a su vez producir citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-23. Mientras que los M2, inducidos por citocinas de los linfocitos T colaboradores de tipo 2 (Th2) (IL-4, IL-13) sintetizan citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β), carecen de actividad antimicrobiana y poseen una baja actividad presentadora de antígenos [57, 90]. Si bien ambas poblaciones suelen encontrarse en el granuloma frente a la infección por *Mtb*, una RI eficiente depende fundamentalmente de un predominio del perfil M1, pero como parte de una respuesta bien balanceada se requiere de la presencia de factores antiinflamatorios y de M2 para controlar la inflamación y evitar el daño en el hospedero [90].

Otra clase de M ϕ también presente en los granulomas son los M ϕ espumosos, quienes adquieren su apariencia esponjosa como resultado de la acumulación de lípidos intracelulares dentro de estructuras conocidas como cuerpos lipídicos [91]. Lay y colaboradores demostraron, en un modelo *in vitro*, que estas células pierden su capacidad fagocítica y su actividad bactericida permitiéndole de este modo a las bacterias previamente ingeridas permanecer en un estado de latencia. Además los lípidos presentes en estas células servirían como una fuente de nutrientes para la micobacteria [92].

Células dendríticas. Estas células reconocen, capturan y procesan antígenos, para poder presentarlos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), así como a través de la molécula presentadora de antígenos no clásica (CD1) [93]. Una vez que los antígenos han sido capturados e interiorizados, las CD maduran (sufren cambios fenotípicos y funcionales) y migran hacia los ganglios linfáticos periféricos donde tiene lugar la presentación antigénica. La maduración de estas células está caracterizada por el incremento en la síntesis de moléculas del CMH de tipo I y II, así como también por el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras [94].

Frente a la infección por *Mtb*, las CD juegan un rol fundamental en la inducción de la RI celular, activando a los linfocitos T vírgenes específicos en los ganglios linfáticos. Además la producción de citocinas como IL-12 e IL-18 por estas células favorece la maduración de las células T hacia un perfil Th1 [95, 96]. En modelos murinos se vio que la presentación de antígenos micobacterianos por las CD a los linfocitos vírgenes ocurre en los ganglios linfáticos entre 9 y 12 días post-infección. No se sabe exactamente cuál es el motivo de dicho retardo pero tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* se observó que la población de CD presentes en el tejido alveolar, infectadas con *Mtb*, tardaban en migrar hacia los ganglios y eran menos eficientes en la presentación antigénica que otras poblaciones de CD [96, 84]. Además, está reportado que la infección con *Mtb* de las CD derivadas de monocitos altera la habilidad de estas para presentar antígenos lipídicos, por la disminución en la expresión de las moléculas CD1 [97]. Sin embargo, Ernst y colaboradores demostraron que las CD que migran hacia los ganglios linfáticos utilizarían algunos mecanismos para compensar la inhibición de la presentación antigénica mediada por *Mtb*, por ejemplo, mediante la transferencia célula a célula de proteínas micobacterianas a CD residentes en los ganglios, optimizando de este modo la presentación y activación de los linfocitos TCD4+ vírgenes.

Neutrófilos. Estas células, que constituyen aproximadamente el 70% de la población total de los glóbulos blancos, juegan un rol activo en el control de infecciones mediadas por patógenos intracelulares. Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) se encuentran entre las primeras células inmunes innatas en migrar ante estímulos inflamatorios, mediante la acción de factores quimiotácticos, desde la sangre hacia los sitios de la infección [98]. Además, también participan en la regulación de la respuesta inflamatoria, en la cicatrización y reparación de tejidos dañados [99].

Al igual que lo observado en modelos animales, las PMN humanos también pueden infectarse con el *Mtb* [100]. La mayoría de los microorganismos fagocitados por los PMN mueren rápidamente luego de la fusión del fagosoma con los compartimentos lisosomales y con gránulos citoplásmicos especializados que contienen un vasto arsenal de moléculas

efectoras antimicrobianas como α defensinas (pequeños péptidos antimicrobianos) [101], proteasas, lactoferrina (secuestran hierro) y lipocalina (molécula de unión a sideróforos). Al fagocitar a la micobacteria se activan diversas cascadas de señales que culminan en la producción de citocinas tales como TNF- α e IL-1 β y de quemoquinas por parte de estas células [102]. Además la interacción con el *Mtb* desencadena la apoptosis de los PMN, e *in vitro* se observó que la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por parte de los M Φ resulta en la disminución de la viabilidad de la micobacteria intracelular, dado que los gránulos presentes en los cuerpos apoptóticos son trasladados hacia los endosomas tempranos donde se localiza la micobacteria, potenciando de este modo la actividad antimicrobiana de los M Φ [103, 104].

También se observó en diversos modelos que estas células son importantes en la formación del granuloma durante la infección con *Mtb*, dado que producen quemoquinas como CXCR3 que favorecen la organización de los linfocitos y monocitos que llegan al sitio de la infección [105, 106, 107]. Por otro lado, la acumulación y persistencia de estas células en el sitio de la infección por períodos prolongados de tiempo resulta perjudicial para el huésped, dado que la continua liberación de gránulos y sus respectivas enzimas genera importante daño tisular. Por lo que, si bien los PMN tendrían un rol protector inmediatamente después de la infección, la persistencia de estas células en etapas tardías de la enfermedad estaría asociada con la falla en la contención del *Mtb* y la progresión de la enfermedad activa [108].

Células Cytotóxicas Naturales. Estos linfocitos granulares juegan un rol importante en el desarrollo de la RI innata. Su función principal está asociada con el desarrollo de citotoxicidad frente a células diana, mediadas por los sistemas Fas/Fas-L y perforina/granzima [102], y además se encuentran entre las primeras células que producen IFN- γ durante la RI, lo cual fue corroborado en diversos modelos de infección con *Mtb* [109, 110, 111], así como en pleuresías tuberculosas [112]. En un modelo humano *in vitro* se demostró que estas células reconocen y lisan a los M Φ infectados con la micobacteria [102]; además, en modelos murinos de infección con *Mtb* se vio que estas

células también están involucradas en el inicio del proceso inflamatorio mediante la secreción de quemoquinas como IL-8 que reclutan leucocitos, e intervienen en la organización del granuloma [71].

Linfocitos T- $\gamma\delta$. El reconocimiento de antígenos por parte de estas células está dado por el receptor de células T (TCR) y no se encuentra restringido por moléculas del CMH [113], más bien poseerían la capacidad de interactuar con el antígeno intacto. El TCR de estas células se caracteriza por poseer una cadena γ y una δ . La mayoría de los linfocitos T- $\gamma\delta$ presentes en los humanos adultos expresan el mismo segmento génico V, V γ 9 junto con V δ 2 (subpoblación T V γ 9V δ 2) [114]. El *Mtb* activa con mayor facilidad a esta subpoblación de células T- $\gamma\delta$, que reconocen moléculas pequeñas de la micobacteria, fundamentalmente fosfoantígenos (pirofosfato de isopentenilo y pirofosfato de prenilo) [113].

Diversos estudios demostraron que los linfocitos T- $\gamma\delta$ están presentes en el sitio de la infección desde etapas tempranas de la RI. Estas células son las principales productoras de IL-17 en la fase inicial de la infección, también producen TNF- α , y al igual que los linfocitos TCD4+ y TCD8+, secretan IFN- γ . Además, pueden lisar a los M Φ infectados a través de la liberación de perforina y granulicina, y de este modo junto con la producción de citocinas contribuyen en la contención del crecimiento micobacteriano [113, 114].

Mastocitos. Estas células inflamatorias se ubican preferentemente en las mucosas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y urinario, y cerca de los vasos sanguíneos y linfáticos. Debido a su estratégica distribución en el pulmón, los mastocitos cumplen un papel importante en la defensa del hospedero contra el *Mtb*, cuyos productos microbianos pueden activar a estas células que responden liberando una gran cantidad de mediadores proinflamatorios (histamina, TNF- α , IL-6), proteasas, entre otros [115, 116]. La liberación de algunos de estos mediadores favorecería la migración de PMN y monocitos, y la formación de la estructura del granuloma [117, 118].

Células epiteliales. La habilidad de la micobacteria de unirse e invadir células epiteliales fue demostrado inicialmente por Shepar y colaboradores en un modelo *in vitro* [119]. Las células epiteliales de las vías respiratorias le brindan a la bacteria un nicho donde puede replicarse y establecer su infección [120]. Estas células podrían contribuir con la defensa temprana frente a la infección con *Mtb* a través de su capacidad de producir citocinas, quemoquinas, defensinas y otras moléculas que pueden eliminar a la micobacteria de forma directa, o indirectamente potenciando las funciones antimicrobianas de los MΦ infectados [121]. Referido a este último punto, en un modelo *in vitro* se vio que frente a la infección con *Mtb* estas células producirían IFN-γ, y de este modo contribuirían con la activación de los MΦ que han fagocitado a la micobacteria [121,122]. Además las células epiteliales presentarían antígenos micobacterianos a través del CMH de clase I a linfocitos TCD8+ residentes en el pulmón para estimular la producción de IFN-γ por parte de estas células [121], contribuyendo de este modo con el control de la infección con *Mtb*.

1-2.2 Principales citocinas de la respuesta inmune contra *Mtb*

Las citocinas son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa que median muchas de sus funciones. Son sintetizadas en respuesta a microorganismos y otros antígenos, de modo que diferentes citocinas estimulan distintas respuestas de células que participan en la inflamación y en la inmunidad. La secreción de estos mediadores es un acontecimiento breve y autolimitado, generalmente no suelen almacenarse en forma de moléculas pre-formadas y su síntesis se inicia por la transcripción de nuevos genes debido a la activación celular. Esta activación transcripcional es transitoria y el ARN mensajero que codifica la mayoría de las citocinas es inestable, de forma que la síntesis de estas también es transitoria [47].

Estas moléculas efectoras regulan la formación del granuloma y además influyen sobre el tipo de RI que se generará frente a la micobacteria. Este hecho se vería reflejado

en la evolución clínica de la infección: eliminación de la bacteria, contención de la misma o estado de latencia, o bien permitiendo el desarrollo de la enfermedad en sus distintas manifestaciones clínicas [123, 124]. Las citocinas producidas por los linfocitos Th1 como INF- γ desempeñan un rol protector durante la infección; mientras que las del tipo Th2 como la IL-4 o antiinflamatorias y antiproliferativas como IL-10 y TGF- β favorecerían el desarrollo de la enfermedad [123].

1-2.2.1 Citocinas y mediadores proinflamatorios

El reconocimiento de la micobacteria por parte de los fagocitos conlleva a la activación celular y producción de citocinas proinflamatorias, que a su vez inducen a una mayor activación y producción de citocinas, generándose así un proceso complejo de regulación cruzada. Este marco de citocinas es crucial en la respuesta inflamatoria y en el desenlace de la infección con la micobacteria, aunque la producción en exceso de las mismas puede generar daño tisular en el huésped.

En el caso de la TB la producción de **IFN- γ** es crítica para el control de la infección con *Mtb*, tanto cuando es sintetizado en forma inespecífica en las primeras etapas de la infección como reflejo de la activación de la RI innata principalmente por las células NK, o como producto de la activación de células T antígeno específicas (fundamentalmente linfocitos TCD4+ del patrón Th1, así como también por TCD8+). Pese a que la sola producción de esta citocina no es suficiente para el control de la TB, es necesaria para montar una respuesta protectora frente al *Mtb*. En modelos murinos se puso de manifiesto que una de las principales funciones del IFN- γ frente a la infección micobacteriana es que constituye el mayor activador de los M Φ . Su presencia en el entorno activa diversas cascadas de señales que incrementan la función microbicida de esta célula al estimular la maduración del fagosoma y la síntesis de ROS y RNS; además interviene en la inducción del programa de muerte celular y la autofagia en los M Φ

infectados [125, 126]. El IFN- γ también favorece la presentación antigénica al estimular la síntesis de moléculas del CMH de clase II en M Φ , lo que lleva a una mayor activación de linfocitos TCD4+ [48, 127]. Otro rol importante de esta citocina es que promueve la síntesis de IL-12 por parte de los M Φ activados y la expresión del receptor para la IL-12 en los linfocitos vírgenes [128]. El papel fundamental de esta citocina en humanos se ve reflejado en pacientes con deficiencia en la producción del IFN- γ o de su receptor, los que presentan una marcada susceptibilidad a infecciones micobacterianas [127].

La **IL-12** es una citocina proinflamatoria, producida por las CPA [129, 130] y es esencial para la generación de la RI protectora contra *Mtb* dado que favorece la activación del perfil Th1, y por consiguiente la síntesis de IFN- γ [131]. Además, esta citocina potencia la producción de IFN- γ por parte de las células citotóxicas naturales [131]. A nivel molecular, IL-12 inhibe la expresión de los factores de transcripción FoxP3 y ROR γ t específicos para el desarrollo de los linajes de las células T-reg y Th17, respectivamente [132]. En pacientes con TB activa, la IL-12 fue detectada en infiltrados pulmonares, pleuresías y granulomas [48].

Otra citocina que también participa en la regulación de la producción del IFN- γ es **IL-18**, quien comparte muchas características con la IL-1. Fue descubierta inicialmente como el factor inductor del IFN- γ que actuaba en sinergismo con IL-12, y es producida por los M Φ en respuesta a la micobacteria [48, 133]. Hoy en día se sabe que estimula la producción de otras citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1), quemoquinas y factores de transcripción como el NF- κ B [48, 134].

Dentro de las citocinas claves para el control de la TB también se halla el **TNF- α** , que es producido principalmente por monocitos, M Φ y CD como consecuencia de la interacción con la micobacteria o productos micobacterianos. Esta citocina proinflamatoria participa de manera directa en la formación del granuloma, posee propiedades inmunorregulatorias, estimula la respuesta de fase aguda, favorece la activación de los M Φ e induce la producción de quemoquinas y moléculas de adhesión que son importantes para el reclutamiento y retención de las células en el sitio de la infección [135]. También se vio que la presencia del TNF- α favorece la apoptosis de las

células infectadas con la micobacteria, aunque el exceso de esta citocina en el entorno puede llevar a la activación de la muerte celular por necrosis [135]. Además el TNF- α actúa en sinergia con el IFN- γ para favorecer la actividad antimicrobiana de los M Φ induciendo la síntesis de RNS y ROS [136]. La importancia de esta citocina en la infección con TB se evidenció en modelos animales donde la falta de la misma se encontró asociada a una progresión fatal de la TB, este desenlace se debe fundamentalmente a una menor capacidad de respuesta antimicrobiana por parte de los M Φ acompañada de una alteración en la estructura del granuloma [135]. Asimismo se observó que un exceso en la producción de esta citocina induce a la patología, asociada a un incremento en el daño tisular y en la respuesta proinflamatoria exacerbada.

En los pacientes con TB la principal producción de TNF- α tiene lugar en el sitio de la infección, el exceso de esta citocina genera efectos inflamatorios no deseados como fiebre, cansancio, pérdida de peso y daño tisular. El deterioro clínico temprano que presentan estos pacientes está asociado con un incremento en las concentraciones plasmáticas de esta citocina [49, 137], y una rápida recuperación durante el tratamiento está asociada con la disminución del TNF- α [49, 138]. Para limitar el efecto deletéreo de esta citocina, su producción sistémica es restringida y además hay un incremento del receptor soluble de este mediador que bloquea su actividad. En humanos, la importancia del TNF- α en la contención de la infección se ve reflejada en los individuos que sufren la enfermedad de Crohn y Artritis Reumatoidea, a quienes se les suministra un potente monoclonal anti-TNF- α y se tornan más susceptibles a la reactivación de la TB (incluida la TB miliar y extrapulmonar) [106, 136, 139]. Por lo tanto esta citocina es fundamental para controlar la infección, pero si se produce en altas cantidades y por períodos prolongados puede causar un severo daño tisular y diversos síntomas característicos de la TB.

Al igual que el TNF- α la **IL-1 β** es producida principalmente por monocitos, M Φ y CD, también se encuentra en exceso en el sitio de la infección en pacientes con TB y actúa como mediador de la respuesta inflamatoria del huésped. Esta citocina es sintetizada como forma inactiva (pro-IL-1 β), la cual necesita de la activación del inflamasoma para ser procesada y secretada en su forma biológicamente activa (IL-1 β) [140]. Este mediador

incrementa el procesamiento y presentación antigénica, y la producción de otras citocinas sobre las CPA, así como la fagocitosis y mecanismos efectores de los MΦ [141, 142].

La **IL-6** también ha sido implicada en la respuesta del hospedero frente al *Mtb*. Este mediador posee propiedades pro- y antiinflamatorias, es producido tempranamente durante la infección micobacteriana y se encuentra en grandes cantidades en el sitio de la infección [143]. IL-6 es sintetizada principalmente por los fagocitos mononucleares en respuesta a la bacteria y a otras citocinas tales como IL-1 y TNF- α . Muestra un importante pleiotropismo, en la inmunidad innata estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y contribuye a los efectos sistémicos de la inflamación conocida como respuesta de fase aguda. Además, estimula la producción de PMN a partir de sus progenitores en la médula ósea en coordinación con el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) [47]. Saunders y colaboradores evidenciaron un rol protector de la IL-6 demostrando que los ratones deficientes en la producción de este mediador presentaban una mayor susceptibilidad frente a infecciones con *Mtb*, atribuyéndolo a una producción deficitaria de IFN- γ previa al desarrollo de la inmunidad adaptativa [144, 48]. A su vez, se observó que el exceso de IL-6 podría ser perjudicial en las infecciones micobacterianas, dado que inhibiría la producción temprana de IL-1 y TNF- α por parte de los MΦ [49].

La **IL-2**, producida por los linfocitos T, constituye un factor de crecimiento autócrino y parácrino para los linfocitos estimulados por antígenos, es por esto que originalmente se la denominó factor de crecimiento de linfocitos T [145]. Esta citocina favorece la diferenciación y proliferación de otras células inmunitarias como es el caso de las NK y los linfocitos B, así como de las células T reguladoras en el timo. Además, en humanos se vio que IL-2 favorece la supervivencia de estas últimas en periferia y el incremento de la expresión del factor de transcripción FoxP3 [146]. Kellar y colaboradores demostraron que la producción de IL-2 se encuentra aumentada en pacientes con TB respecto de controles sanos frente al estímulo de antígenos micobacterianos [147].

La familia de **IL-17** se encuentra integrada por las isoformas IL-17 A, B, C, D y E (también conocida como IL-25), siendo IL-17A la más estudiada. Las células capaces de

responder a esta citocina incluyen CD, MΦ, linfocitos, células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos [148]. Ante la infección con *Mtb*, diversos estudios sugieren que las células T- $\gamma\delta$ son una importante fuente de producción temprana de IL-17, mientras que durante la RI adaptativa serían los linfocitos TCD4+, correspondientes a la subpoblación Th17, los principales productores [149].

En esta enfermedad, el reclutamiento de los PMN mediado por esta citocina, favorecería la organización temprana del granuloma [150]. Sin embargo, la exposición prolongada a IL-17 hace que estas células sobrevivan por largos períodos de tiempo, pudiendo contribuir a la inmunopatología [151, 152].

IL-23 es producida por CD y MΦ que son activados por TLR-2. A su vez, estas células pueden ser activadas por esta citocina en forma directa, favoreciendo la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL-1 β [153]. Una de las funciones más importantes de IL-23 es su habilidad para sostener la actividad de los linfocitos T- $\gamma\delta$ y favorecer la expansión de los clones de Th17. Ambos tipos celulares son componentes esenciales de una inmunidad protectora contra *Mtb*, temprana y tardía respectivamente. En ausencia de IL-23 las células Th17 muestran una menor capacidad en la producción de citocinas proinflamatorias y un aumento en la síntesis de IL-10, por lo que la presencia de esta citocina es requerida para que las células Th17 maduren alcanzando su potencial plenamente inflamatorio [154]. Sin embargo, un exceso de producción de IL-23 e IL-17 conduciría a un gran reclutamiento y cambios fenotípicos en las células proinflamatorias con el consecuente daño tisular. Por consiguiente es indispensable un fino balance Th1-Th17 para lograr una respuesta efectiva contra el *Mtb* [148, 155].

Otra citocina pleiotrópica, miembro de la familia de IL-12, que posee funciones activadoras e inhibitorias sobre la RI innata y adaptativa es **IL-27**. En combinación con IL-2 y/o IL-12 incrementa la producción de IFN- γ por parte de las células TCD4+, contribuyendo de esta manera a la activación de los MΦ y a la inhibición del crecimiento micobacteriano [156]. Por otra parte, IL-27 ejercería actividad antiinflamatoria sobre los

MΦ durante la infección con *Mtb*, regulando negativamente la vía MAPK, la expresión y procesamiento de IL-1β y la localización de los receptores del TNF-α [157, 158].

La Proteína C reactiva (**CRP**), si bien no es una citocina, es uno de los componentes inflamatorios producidos por el hígado en respuesta a procesos infecciosos (bacterianos) o inflamatorios (Artritis Reumatoide y vasculitis), e integra el grupo de las denominadas “Proteínas de fase aguda”. Su síntesis a nivel hepático es estimulada principalmente por la citocina proinflamatoria IL-6 y en menor medida por TNF-α, IL-1 y glucocorticoides [159]. CRP une con alta afinidad residuos de fosfocolina presentes en polisacáridos de virus, bacterias, hongos y parásitos; a su vez, las membranas celulares de los mamíferos también expresan fosfocolina, aunque esta solo es accesible para su reconocimiento por la CRP en células necróticas o apoptóticas. Por consiguiente, CRP es capaz de reconocer no sólo microorganismos, sino también células propias que requieren ser eliminadas. Además esta proteína de fase aguda cuando se encuentra interaccionando con el ligando es capaz de unir C1q e inducir la activación del complemento por vía clásica, lo que lleva a la deposición de C3b sobre el patógeno favoreciendo su fagocitosis. CRP también puede ser reconocida por los receptores Fc de la IgG presentes en MΦ y PMN, actuando como opsonina e induciendo la fagocitosis [160].

Las concentraciones plasmáticas de CRP y la velocidad de eritrosedimentación (ERS) son los indicadores de proceso inflamatorio agudo más utilizados. Asimismo su determinación es útil en el seguimiento de la evolución de diferentes patologías inflamatorias y/o infecciosas. En pacientes con TB pulmonar las concentraciones plasmáticas de CRP se encuentran incrementadas y asociadas con los niveles bacterianos y el grado de afección de la enfermedad, estos valores descienden con el tratamiento específico [161, 162, 163].

1-2.2.2 Citocinas reguladoras y antiinflamatorias

La respuesta inflamatoria iniciada por la micobacteria es antagonizada por mecanismos antiinflamatorios así como reguladores de la respuesta en curso. Algunos de estos mecanismos dependen o están influenciados por citocinas como: IL-10, IL-4 y el TGF- β [49].

La **IL-10**, que en líneas generales ejerce efectos antiinflamatorios, es producida principalmente por los M Φ activados luego de la fagocitosis de la micobacteria, también puede ser liberada por las CD y por los linfocitos B y T durante la respuesta adaptativa. Mediante estudios *in vitro* se demostró que la IL-10 antagoniza la respuesta de citocinas proinflamatorias inhibiendo la producción de TNF- α e IL-12 por parte de los M Φ , así como del IFN- γ por parte de las células T como consecuencia de la disminución de IL-12 [48, 58]. También disminuye la actividad lítica de los linfocitos TCD4+ y TCD8+, inhibe el procesamiento y presentación de antígenos y la expresión de moléculas co-estimuladoras sobre monocitos y M Φ ; además posee propiedades desactivantes sobre estos últimos antagonizando los efectos activadores del IFN- γ [164]. Diversos trabajos postulan que la micobacteria estaría induciendo la producción de esta citocina con el objeto de suprimir la RI efectiva. Además, *in vitro* se observó que la presencia de niveles elevados de IL-10 durante infecciones con *Mtb* contribuiría con la persistencia de la micobacteria dentro del M Φ a través de los mencionados mecanismos. Al respecto, O'Leary y colaboradores demostraron que M Φ alveolares humanos infectados con *Mtb* producían niveles elevados de IL-10, y que el aumento de esta citocina inhibía la maduración del fagosoma, permitiendo la sobrevida del patógeno en estas células [49, 165]. Por lo que en el contexto de la infección con *Mtb*, esta citocina jugaría un doble rol ya que por un lado contribuiría con el control de la exuberante respuesta proinflamatoria limitando de este modo el daño en el hospedero, mientras que producida en exceso favorecería la sobrevida de la micobacteria al alterar la RI de protección.

El **TGF- β** frente a una infección con *Mtb* también parece contrarrestar la inmunidad protectora. Los productos micobacterianos inducen la síntesis de este mediador por parte de monocitos, M Φ y CD. Al igual que la IL-10 suele producirse en grandes cantidades en el sitio de la infección [48]. Esta citocina suprime la inmunidad celular: en las células T inhibe su proliferación y la producción del IFN- γ , mientras que en M Φ interfiere con la presentación antigénica, la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y la activación celular. Además, está involucrada en el daño pulmonar y la fibrosis producida durante la TB [166].

En algunos sujetos con TB se ha detectado una producción incrementada de **IL-4** asociada a la severidad [10]. El efecto deletéreo de esta citocina en infecciones intracelulares, incluida la TB, ha sido atribuido a la capacidad supresora que posee sobre la producción del IFN- γ y la activación de los M Φ . La IL-4 antagoniza los efectos activadores del IFN- γ sobre los M Φ y por consiguiente inhibe la RI celular. Esta citocina es producida por células Th2, mastocitos y basófilos entre otras [167]. En diversos estudios *in vitro* se vio que asociada con IL-13 induce la activación alternativa de los M Φ , causando una disminución de los receptores TLR-2 y de la producción de TNF- α , así como aumento en la expresión de DC-SIGN y en la síntesis de IL-10 [48]. La presencia de IL-4 estimula la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia un perfil Th2 y actúa como un factor de crecimiento autócrino para esta subpoblación, por lo que IL-4 es responsable de la inducción y expansión de este perfil.

Tanto en la RI innata como adaptativa, así como en la organización del granuloma también cumplen un rol importante un conjunto de proteínas de bajo peso molecular, de entre 8-10 kDa, conocidas como **quemoquinas**. Cuya producción es inducida por la acción de microorganismos y citocinas proinflamatorias, en especial TNF- α e IL-1 β . En conjunto se caracterizan por su capacidad de promover la migración y activación de diferentes poblaciones leucocitarias. Estas moléculas atraen a células de la defensa del huésped hacia la zona de infección y regulan el tráfico de linfocitos y otros leucocitos a través de los tejidos linfáticos periféricos [73, 49, 168].

1-2.3 Inmunidad Adaptativa en la infección con *Mtb*

En contraste con los mecanismos innatos, la RI adaptativa o adquirida requiere del reconocimiento específico de los antígenos extraños, y se clasifica en inmunidad celular e inmunidad humoral. Estos dos tipos de RI se caracterizan por la presencia de diferentes actores del SI y permiten eliminar distintos tipos de microorganismos. La inmunidad celular es la función efectora de los linfocitos T y sirve principalmente como mecanismo de defensa contra los microorganismos de vida intracelular. Mientras que la inmunidad humoral está mediada por la activación de las células B y la producción de anticuerpos secretados, y su función fisiológica consiste en la defensa contra los microbios extracelulares y las toxinas microbianas. En la situación particular de la TB, al igual que sucede con otras infecciones intracelulares, es la inmunidad de tipo celular la que juega un rol clave para su control. No obstante, durante la infección con *Mtb* también se observa una fuerte respuesta humoral [71, 169].

El resultado de las infecciones micobacterianas dependen de la interacción entre la bacteria y la RI innata y adaptativa del hospedero. Las células T son un componente fundamental de la respuesta protectora frente a la infección con *Mtb*. Para que los linfocitos T específicos se activen y expandan es necesario que la micobacteria sea trasladada del pulmón hacia el ganglio linfático drenante, donde se produce el reconocimiento de los antígenos micobacterianos. La RI celular tarda en ser inducida, por lo que el inicio de la misma se ve demorado en comparación con la de otras infecciones, lo que le permite a la micobacteria replicarse en los pulmones durante la fase temprana de la infección (primeros 21 días), establecerse y condicionar a la respuesta efectora, de modo que la misma se exprese en un sitio inflamatorio que ha sido iniciado y modulado por la bacteria [96].

Dadas las características de la infección humana, gran parte de estos conocimientos se adquirieron mediante la utilización de modelos animales, principalmente murinos. La infección de ratones permitió conocer y profundizar en los mecanismos de la RI relacionados tanto en la contención y eliminación de la micobacteria, así como en la persistencia de la infección y el consecuente daño tisular. Además el

estudio experimental en diversos modelos animales es de gran utilidad para el desarrollo de estrategias y evaluación de nuevas vacunas o terapias anti-TB [96, 9].

Como se expresó previamente, una vez que la bacteria es presentada a los linfocitos T en el ganglio linfático, las células vírgenes allí activadas migran hacia el sitio de la infección, donde mediaran sus funciones efectoras. La llegada de las células al foco de la infección ocurre entre dos a tres semanas post-inhalación de la bacteria. Además, la interacción de las células T y los MΦ infectados es central en la inmunidad frente al *Mtb*, las células TCD4+ son esenciales para montar una buena respuesta celular, pero son apoyadas por otras subpoblaciones de células T como las CD8+ y otros linfocitos capaces de reconocer componentes de la micobacteria expuestos por las moléculas no clásicas del CMH [113].

1-2.3.1 Reconocimiento de la micobacteria por los linfocitos

Dado que la micobacteria reside en general en los compartimentos fagocíticos, la presentación del antígeno por el CMH de tipo II es la más frecuente, y los **linfocitos TCD4+** son las células responsables de reconocer el *Mtb* en este contexto. Mientras que las moléculas pertenecientes al CMH de tipo I son capaces de presentar a los **linfocitos TCD8+** péptidos derivados de antígenos presentes en el citosol. En este caso el *Mtb* o componentes del mismo deben acceder al citosol para ser procesados y presentados por este tipo de molécula [49]. Al respecto, se ha observado que algunas proteínas de secreción micobacterianas pueden ser translocadas al citosol de las CPA infectadas y ser presentadas de este modo [84, 170]. A su vez se ha postulado la presencia de un poro o grieta, inducido por la micobacteria sobre la membrana vesicular, que permitiría un tráfico bidireccional de antígenos micobacterianos hacia el citoplasma, así como de nutrientes hacia el interior de la vesícula.

Otra subpoblación de células T que reconoce antígenos de la micobacteria, son las células TCR+ restringidas por **CD1**. CD1 es una molécula, similar a la del CMH pero menos

polimórfica, que puede ser inducida por citocinas o estar expresada constitutivamente en las CPA [113]. En el hombre, las moléculas presentadoras de antígenos CD1 del grupo 1 (CD1a, CD1b y CD1c) se expresan en CPA profesionales y son capaces de presentar lípidos y glicolípidos de la bicapa celular micobacteriana. Mientras que las del grupo 2 (CD1d) se expresan en las células del linaje hematopoyético y en ciertos epitelios, y pueden presentar fosfatidil-inositol-manósidos del *Mtb* a las células NK, induciendo la secreción de IFN- γ y su capacidad citotóxica [113].

1-2.3.2 Células de la inmunidad adaptativa

Linfocitos TCD4+. La eliminación de un patógeno intracelular, depende principalmente de la interacción efectiva entre los M Φ infectados y las células T específicas. Es por esto que estas células juegan un papel central en la RI humana frente al *Mtb*, lo cual se hace evidente en pacientes HIV+ que sufren una disminución en el número y funcionamiento de los linfocitos TCD4+, lo que resulta en reactivación de infecciones latentes, un aumento de la susceptibilidad a la re-infección así como a la infección por *Mtb* [171, 172, 173]. Estas células ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos, a experimentar el cambio de isotipo y maduración de la afinidad; favorecen la activación de M Φ , PMN y otras células efectoras en el sitio de la infección; mejoran y sostienen la respuesta de las células TCD8+, y también participan en el control de la excesiva RI. El reconocimiento de los antígenos micobacterianos unidos a las moléculas del CMH tipo II por parte del TCR, junto con las señales co-estimuladoras activan a los linfocitos TCD4+, lo que induce a la proliferación y diferenciación de los mismos. Una vez que los linfocitos TCD4+ vírgenes son activados, pueden diferenciarse hacia diferentes perfiles de células T colaboradoras, el cual va a depender del tipo de citocina que esté presente en el entorno al momento de su activación [174].

En 1986 Coffman y Mosmann demostraron la existencia de dos subpoblaciones de células Th: Th1 y Th2. Las cuales diferían en sus funciones efectoras y las citocinas que

producían. Las células Th1 productoras principalmente de IFN- γ , fundamental para la activación de M Φ , contribuyen a la eliminación de patógenos intracelulares y están involucradas en las respuestas mediadas por células y en las de hipersensibilidad retardada. Estas células también producen otras citocinas como TNF- α e IL-2 y diversas quemoquinas. Mientras que las Th2, productoras de IL-4, IL-5 e IL-13, están involucradas en las respuestas alérgicas y en la eliminación de patógenos extracelulares como los helmintos [124].

Es sabido que la RI protectora frente al *Mtb* es mediada por la inmunidad celular, y son las células Th1 efectoras y las citocinas que estas producen fundamentales frente a esta infección [175]. Por ejemplo la producción de IFN- γ por parte de este linaje es clave para la activación de los M Φ y la contención de la infección, aunque una respuesta Th1 exacerbada también está involucrada en la patología [176, 177]. La diferenciación de estos linfocitos hacia este perfil requiere de la presencia de citocinas como IL-12 e IL-18 y de la activación del factor de transcripción T-bet [178]. Las células Th2 también están presentes durante la infección con *Mtb*, estas producen citocinas como IL-4 que inhiben el perfil Th1 y de este modo contribuyen a un control de esta subpoblación. Los linfocitos vírgenes se diferencian a este perfil en presencia de IL-4 y de la activación del factor de transcripción GATA-3.

El balance entre una respuesta Th1/Th2 es fundamental para lograr el control de la infección de la micobacteria y evitar caer en situaciones inmunopatológicas. Diversos estudios demostraron que los pacientes con formas leves de TB se caracterizan por conservar una RI celular, y los individuos que presentan formas severas de la enfermedad presentan un deterioro de los parámetros inmunes mediados por células, junto con un aumento en la respuesta humoral [179, 180]. Es decir que los pacientes con las formas más leves de la enfermedad presentan una preponderante respuesta celular de tipo Th1, mientras que en los casos más severos hay un predominio del perfil Th2 [181, 182].

Además de estos perfiles, con el paso del tiempo se fueron descubriendo otros tipos de subpoblaciones de células T colaboradoras como son las Th17 y T-reg, entre otras. El linaje Th17 expresa el factor de transcripción ROR- γ t, es generado en presencia de IL-6 y

TGF- β , y requiere de la presencia de IL-23 para su supervivencia y mantenimiento [148, 132]. A su vez, estas células se caracterizan por la producción de citocinas tales como: IL-17, IL-6, IL-22 e IL-21 [183, 184].

El rol de este perfil en la TB es controversial, ya que la producción de IL-17 favorecería el reclutamiento de PMN los cuales en conjunción con los M Φ contribuirían a la eliminación de la micobacteria; además los PMN favorecerían la organización del granuloma. A su vez, recientemente se ha observado que proteínas liberadas por la degranulación de los PMN promueven la secreción de IL-12 por parte de los M Φ , favoreciendo el sesgo de la respuesta hacia un perfil Th1. Sin embargo, la liberación prolongada de IL-17 sería perjudicial para el control de la TB en una fase más tardía dado que continuaría reclutando PMN, los que activados generarían daño tisular [152, 185, 186].

El exceso de activación de cualquiera de los patrones de respuesta mencionados sostenido en el tiempo es perjudicial para el hospedero. Entre los diversos mecanismos de regulación intrínseca del SI, la activación de las células T reguladoras juega un papel fundamental, en el control de la RI frente a patógenos, en la tolerancia a los auto-antígenos y en el mantenimiento de la homeostasis del SI. Dentro de las células T reguladoras CD4⁺ se destacan aquellas que se caracterizan por la producción TGF- β , denominadas Th3; las Tr1, que ejercen su función inhibitoria mediante la liberación de IL-10 o IL-10 y TGF- β [154, 187], y las T CD4⁺CD25⁺ que expresan el factor de transcripción FoxP3⁺ (T-reg).

Con respecto a las células T-reg, estas pueden ser naturales, diferenciadas in timo o inducidas en la periferia durante una RI adaptativa [188]. En humanos las T-reg representan un 5-10% de los linfocitos TCD4⁺ circulantes, y sólo las que expresan niveles elevados de CD25 (cadena α del receptor para IL-2) exhiben una importante capacidad supresora [189]. En pacientes con TB se vio un incremento en la frecuencia de estas células en sangre periférica y en el sitio de la infección [189, 190, 191].

El efecto inhibitorio de estas células puede estar mediado por contacto célula-célula a través de CTL4, mediante la producción de citocinas antiinflamatorias, como IL- 10

y TGF- β , y mediante el “secuestro” de IL-2 [192]. En el caso particular de la TB, estas células pueden inhibir la producción de IFN- γ por parte de las células T a través de los mencionados mecanismos [193].

Como fue previamente mencionado, el equilibrio entre las respuestas efectoras y las respuestas reguladoras luego de la infección con *Mtb* puede determinar el desenlace y la progresión de la enfermedad activa [177]. Las células T-reg desempeñan una función importante en el balance entre la inmunopatología y la persistencia del patógeno. Por un lado estas células son capaces de evitar una respuesta inflamatoria excesiva disminuyendo el daño tisular en el hospedero, y por el otro pueden comprometer la eliminación del agente infeccioso, favoreciendo su persistencia y diseminación [189, 192]. La RI en la TB suele estar caracterizada por una inmunosupresión activa, particularmente en las formas más severas de la enfermedad, reflejado en una disminución en la producción de IL-2 e IFN- γ y en una anergia específica a preparaciones de PPD que se correlaciona con una expansión de las células T productoras de IL-10 [194]. Las citocinas inhibitorias como IL-10 y TGF- β pueden correlacionarse con susceptibilidad a la infección y a la enfermedad y, en simultáneo, sugieren una participación de las células T-reg en este proceso [192].

Linfocitos TCD8+. Las células TCD8+ reactivas al *Mtb* pueden encontrarse entre las células T alveolares y periféricas en personas sanas que dieron positivo para el test de tuberculina [195]. Estas células al ser activadas por el *Mtb* comienzan a producir IFN- γ , aunque en menor medida que las CD4+ y adquieren funciones citotóxicas sobre células infectadas con la micobacteria. En cuanto a la actividad citolítica, los linfocitos TCD8+ comienzan a expresar Fas-L y a liberar perforinas sobre las células target para permitir el ingreso de granulinas y granzimas que son las responsables de inducir apoptosis en las células infectadas con la bacteria [196, 197]. En estudios en ratones se vio que en la fase aguda de la infección hay un predominio de la función citotóxica por parte de estas células, y a medida que la infección cronifica los linfocitos TCD8+ comienzan a aumentar su producción de IFN- γ [198].

CD1. Las células T restringidas por esta molécula presentan diversas funciones efectoras y su papel en la infección humana por *Mtb* estaría relacionado con la secreción de IFN- γ y su capacidad citolítica frente a M Φ infectados vía perforina-granulicina [113, 151].

En resumen, la RI protectora frente a la infección por *Mtb*, que previene la progresión de la enfermedad activa puede ser atribuida al correcto equilibrio entre los mecanismos proinflamatorios e inmunoreguladores.

1-3 Interacción Neuroinmunoendócrina

La comunicación bidireccional existente entre los sistemas Neuroendócrino e Inmune, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis fisiológica y el estado de salud del individuo, actualmente es bien conocida [199]. Los linfocitos, monocitos y diversas células inmunes expresan receptores para diferentes hormonas y neuropéptidos; del mismo modo receptores para citocinas, quemoquinas y factores de crecimiento han sido identificados en células del Sistema Nervioso y de órganos endócrinos, tanto en situaciones fisiológicas normales como de estrés o enfermedad. Estos ligandos y receptores compartidos son utilizados como un lenguaje químico común para la interacción entre ambos sistemas [199, 200]. La comunicación entre el Sistema Nervioso Central (SNC) y el SI está dada por diferentes vías: noradrenérgica, dopaminérgica, peptidérgica, colinérgica y la del eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA), siendo ésta última una de las más estudiadas y la principal vía hormonal por la cual el SNC regula el SI [201].

1-3.1 Eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal

El eje HPA es un conjunto complejo de influencias directas e interacciones de retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales.

El núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina a la sangre portal hipofisaria y estimula la síntesis de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en la glándula pituitaria anterior. La ACTH circula por el torrente sanguíneo hacia la glándula adrenal donde induce la síntesis y liberación de hormonas esteroideas como glucocorticoides (GC) y dehidroepiandrosterona (DHEA), entre otras (Figura 5) [201]. El eje HPA puede ser regulado por retroalimentación negativa a través de los productos de su activación: ACTH y GC. Pero a su vez, el SI también regula al SNC por medio de la liberación de citocinas como: IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ , entre otras [202].

Las alteraciones a nivel del eje HPA o de la acción de los GC, llevan a un desequilibrio en las interacciones entre los Sistemas Neuroendócrino e Inmune, conduciendo a una mayor susceptibilidad a infecciones, enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Es así que una estimulación crónica del eje, acompañada de niveles elevados y sostenidos de GC produce supresión de la RI, hechos que se asocian con una mayor susceptibilidad a infecciones virales o bacterianas [201]. Mientras que la subestimulación resulta en bajos niveles circulantes de GC, con mayor riesgo a padecer procesos inflamatorios.

De lo expresado se desprende que las respuestas inmunológicas y endócrinas están muy relacionadas y trabajan en conjunto para lograr un control efectivo de la infección sin mayores consecuencias fisiopatológicas para el hospedero.

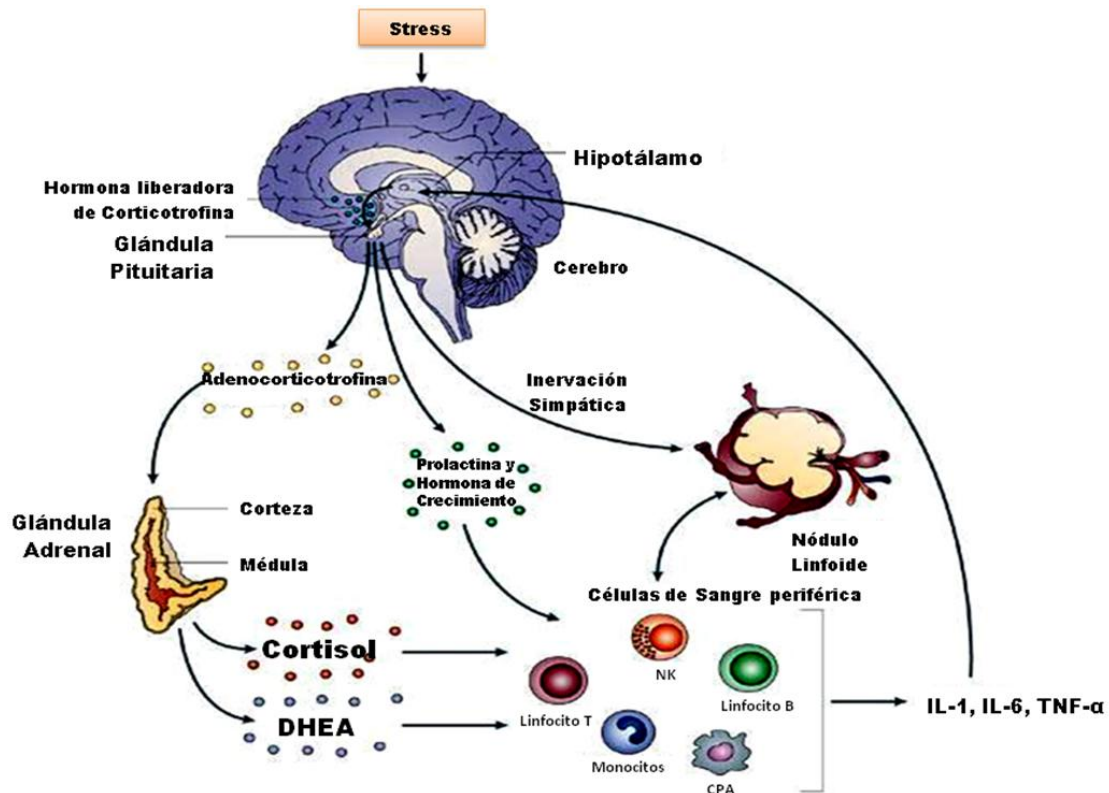


Figura 5. Regulación bidireccional entre los sistemas Neuroendócrino e Inmune. Adaptada de Glaser y colaboradores [203].

1-3.2 Glucocorticoides

Los GC son hormonas esteroideas sintetizadas en la zona fascicular de la corteza adrenal bajo el control del eje HPA. En el hombre el GC circulante más importante es el cortisol [204]. Debido a sus características lipofílicas, el cortisol circula en la sangre unido a transcortina o albúmina e ingresa a las células por difusión pasiva. La expresión del receptor de GC (GR) alfa es ubicua, y por consiguiente esta hormona ejerce una plétora de funciones a nivel metabólico, cardiovascular, cognitivo e inmunológico [205]. Los GC también pueden unirse con mayor afinidad al receptor de mineralocorticoides (MR), receptor específico para aldosterona (Ver ítem 1-3.2.1). En los sujetos normales hay un ritmo diurno de la producción de cortisol, alcanzando su máximo nivel durante la mañana y declina a través del día (ritmo circadiano). Debido a que los linfocitos T expresan casi

exclusivamente GR, alternan entre un estado de modulación debida al cortisol y un estado de no modulación por parte de este esteroide en cada ciclo de 24 horas. Se han documentado anomalías o pérdidas del ritmo circadiano en numerosas situaciones de depresión severa, estrés, o infecciones crónicas, con importantes modificaciones en las funciones del SI [206].

De lo expresado se evidencia que los GC actúan en prácticamente todas las células inmunológicas, ejerciendo sus funciones a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Sin embargo, no puede dejar de mencionarse que la disponibilidad de cortisol a nivel tisular no solo depende de la concentración circulante del esteroide, sino también de la expresión de las enzimas responsables de la interconversión cortisol↔cortisona [207].

1-3.2.1 Receptores de GC y mecanismos de acción

Como ya se expresó, el efecto del GC en los tejidos es mediado por el GR, y el gen que lo codifica en el hombre está ubicado en el cromosoma 5. En este receptor se distinguen tres regiones: el dominio N-terminal, involucrado en el proceso de transactivación; una sección media conocida como dominio de unión al ADN, que está implicada en la unión de ADN mediada a través de dos dedos de zinc; y un dominio C-terminal o dominio de unión al ligando. A través de una regulación post transcripcional del ARNm de GR, se produce el “*splicing*” alternativo del transcripto primario del receptor generando dos isoformas con alto grado de homología: GR α y GR β . Estas dos isoformas coinciden en los primeros 8 exones del gen, difiriendo sólo en la secuencia del último en la región 3': exón 9A (GR α) y 9B (GR β), esta región abarca parte del dominio de unión al ligando [205]. La isoforma GR α es la que media la función activa del GC, modulando la expresión de genes que responden a estos por medio de la unión a secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta específicos de glucocorticoides (GREs), o mediante el secuestro de factores de transcripción (transrepresión) [208]. En contraste,

GR β no se une a los GC y es transcripcionalmente inactivo, pero si se une a los sitios GRE y actuaría como inhibidor negativo de GR α . Lo que sugiere que su función es la de un inhibidor endógeno de la acción de los GC y actuaría como un regulador negativo que determina la sensibilidad de los tejidos target a los GC. Esta inhibición estaría mediada por su capacidad de formar heterodímeros con la isoforma activa GR α (GR α /GR β), impidiéndole ejercer sus funciones biológicas naturales y por ende inhibiendo los efectos característicos de los GC [209, 210, 211]. Los niveles elevados de GR β se han correlacionado positivamente con resistencia a los GC en diversas enfermedades como Asma, Artritis Reumatoidea y Colitis Ulcerosa [212, 213, 214]. Además este receptor tiene una vida media mayor que la isoforma GR α , y su expresión se ve incrementada en presencia de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 [215].

Retomando el accionar de los GC, los mismos ingresan al citoplasma por difusión pasiva. Allí se unen a los GR, que previo a la unión con su ligando, residen principalmente en el citoplasma asociados con proteínas del choque térmico de 90 kDa (hsp90) e inmunofilinas. Seguido de la activación por el ligando, el receptor experimenta una serie de alteraciones conformacionales, dando lugar a su disociación de las chaperonas citoplasmáticas y a la exposición de sus señales de localización nuclear. Estas, son reconocidas por un grupo de proteínas de translocación nuclear, que transportan activamente al receptor hacía el núcleo. Una vez dentro, los homodímeros del receptor reconocen e interactúan con regiones *cis* específicas conocidas como GREs, localizadas en promotores de los genes diana favoreciendo o reprimiendo su transcripción. Además el complejo receptor-hormona puede modificar las funciones de otros factores de transcripción como AP-1, NF- κ B y JAK-STAT, siendo estos últimos muy importantes en la RI [205, 216].

1-3.2.2 Glucocorticoides y su relación con el Sistema Inmune

Los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los GC se conocen desde hace más de 70 años. En monocitos y MΦ este esteroide influencia tanto el fenotipo como la supervivencia y sus funciones. Los GC estimulan la capacidad fagocítica frente a blancos potencialmente peligrosos como bacterias, células muertas, restos celulares, etc. Pero a su vez suprimen la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quemoquinas, RNS y ROS, a través de mecanismos genómicos y no genómicos [217]. Es así que promueven un fenotipo antiinflamatorio y favorecen la actividad migratoria y la supervivencia de estas células mieloides [218, 219]. El efecto de este esteroide sobre las CD es similar al observado en los monocitos y MΦ, y además modifica su capacidad inmunogénica ya que inhibe la expresión de moléculas co-estimuladoras como MHC II, CD86 y CD40, restringiendo de este modo la estimulación de las células T [217, 220, 221]. A su vez los GC promueven la expresión del factor de transcripción GILZ (*glucocorticoid-induce leucine zipper*), requerido para la inducción de CD tolerogénicas, las que a su vez favorecen la generación de células T-reg [222, 223].

Con respecto a los PMN, los GC producen neutrofilia al favorecer el egreso de estas células desde médula ósea e impidiendo la transmigración hacia el sitio de la infección [224]. A su vez concentraciones elevadas de la hormona reducen los niveles de células T circulantes ya que favorecerían su migración hacia médula ósea y los órganos linfáticos secundarios [225].

El cortisol también reprime la producción de citocinas proinflamatorias, específicamente aquellas que promueven la polarización Th1 y Th17 (IL-12 e IL-6 respectivamente) [224]. En concentraciones fisiológicas este esteroide inhibe la transcripción de algunas citocinas y favorece el sesgo de la respuesta de un perfil Th1 a Th2; en cambio en concentraciones farmacológicas reducen la síntesis de las citocinas IL-2 e IFN-γ, así como de IL-4 e IL-5 e inhibe la transcripción de STAT4 y T-bet, y GATA-3 respectivamente [226, 227]. Concentraciones farmacológicas de GC reducen el número de

linfocitos B en los órganos linfoides secundarios, atenúan la proliferación de precursores B y favorecen la producción de IgE en detrimento de IgG [227].

1-3.2.3 Regulación del metabolismo del Cortisol a nivel celular

La concentración tisular de cortisol no depende sólo de los niveles circulantes de la hormona, ya que a fin de satisfacer sus propias necesidades la mayoría de los tejidos deben regular la disponibilidad de este esteroide a nivel local. Las diferencias en el número de receptores, en la afinidad, o en las vías de señalización afectan la sensibilidad de cada célula al glucocorticoide; pero la habilidad de catabolizar el cortisol es otro factor muy importante a tener en cuenta. Las enzimas que tienen la capacidad de ajustar localmente la disponibilidad de cortisol son la 11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (11 β HSD) tipo 1 y 2 [206, 228].

La 11 β HSD1, localizada en el retículo endoplasmático celular, es una oxidoreductasa que está presente en casi todos los tejidos, y convierte la cortisona en cortisol [204]. Esta enzima es casi indetectable en monocitos sanguíneos humanos, pero está altamente expresada cuando estos se diferencian en CD o M Φ [229]. En una gran variedad de tipos celulares (llamativamente no en las células inmunes), la expresión de 11 β HSD1 se ve incrementada rápidamente en presencia de TNF- α e IL-1 [229].

Por su parte, la 11 β HSD2 está involucrada en la conversión del cortisol a cortisona. En adultos su distribución está anatómicamente restringida, con una alta expresión confinada a los órganos blanco de la aldosterona para favorecer la unión de esta hormona a su receptor específico, el MR [230]. Es así que se encuentra localizada en riñón [229], colon, glándulas salivales, además en ciertas regiones del cerebro, y con menor expresión en tejido vascular, adipocitos y algunas poblaciones de células inmunes [231].

1-3.3 Dehidroepiandrosterona

La DHEA es una hormona secretada fundamentalmente por la zona reticular de la corteza adrenal [232]. Es un precursor de los andrógenos y estrógenos, constituye un intermediario en la biosíntesis de la testosterona, el estradiol y androstenediol (AED) [233, 234]. La DHEA circula en sangre principalmente como éster conjugado bajo la forma de sulfato (DHEA-S) o prohormona [235]. Como hormona activa sólo se la puede encontrar en bajas concentraciones en circulación y a nivel tisular en aquellos tejidos que expresen sulfatasa, enzima distribuida heterogéneamente en los órganos linfoides [236]. Bajo circunstancias normales la DHEA es secretada sincrónicamente con el cortisol en respuesta a la hormona liberadora de corticotropina y a la ACTH. La dexametasona mengua la secreción adrenal de DHEA y de cortisol, sin embargo pudo observarse una disociación en la liberación de las mismas, la cual también es evidente en pacientes con Síndrome de Cushing. Tanto la DHEA como la DHEA-S muestran variaciones diurnas, sin embargo las de esta última son muy limitadas. La falta de variación se debe a que es secretada en gran cantidad en el plasma, posee una vida media más larga y la depuración es menor que para la DHEA. En humanos las concentraciones circulantes de DHEA se encuentran en un rango de 0,003-0,15 μ M, mientras que las de DHEA-S son de 250 a 500 veces mayores en mujeres y hombres respectivamente [237]. Los niveles de DHEA en suero alcanzan su pico máximo alrededor de los 20-30 años y luego disminuyen a lo largo de la vida del individuo [238]. En enfermedades de compromiso sistémico también se observan descendidos los niveles de DHEA y DHEA-S. Asimismo están disminuidas las concentraciones de testosterona y androstenediona, mientras que los niveles de GC se mantienen elevados [239]. En enfermedades inflamatorias crónicas como la Artritis Reumatoidea y Lupus Eritematoso se ha observado el mismo fenómeno, niveles bajos de DHEA y DHEA-S en presencia de concentraciones elevadas de cortisol [240].

1-3.3.1 DHEA como modulador de la respuesta inflamatoria e inmune

Trabajos realizados por Padgett y colaboradores en la década del 90, demostraron que la DHEA protegía a los ratones contra infecciones virales letales, como así también de las bacterianas [241, 242]. Asimismo, observaron que la DHEA inhibía la respuesta Th2 inducida por GC en un modelo murino, sugiriendo un efecto contra regulatorio de la DHEA a la acción de los GC sobre la RI [242]. El efecto contra regulatorio de la DHEA y de su metabolito AED también fue sugerido por Rook y colaboradores utilizando un modelo de infección con *Mtb* en ratones [206]. Además del efecto inmunomodulador de la DHEA en la respuesta Th2, pudo comprobarse que el tratamiento *in vitro* con esta hormona incrementaba la producción de IL-2 por parte de linfocitos TCD4+ humanos activados, y que además favorecía la acción citotóxica de las células TCD8+ [243]. Este sesgo hacia un incremento en la RI celular, también se observó al estimular CD humanas con antígenos de *Mtb*, donde el tratamiento con DHEA favoreció la producción de IL-12 por parte de estas células, así como el incremento en la síntesis de IFN- γ por linfocitos T autólogos cocultivados con las CD [244]. Esta modulación por parte de la DHEA hacia un perfil Th1 también fue evidenciada en modelos murinos [237].

La DHEA, además de favorecer la RI celular posee efectos antiinflamatorios, inhibiendo la producción de TNF- α e IL-6 [245, 246], evidenciando el rol modulador de esta hormona sobre la función macrófaga. En modelos *in vitro* se ha demostrado que DHEA inhibiría la expresión de moléculas involucradas en procesos inflamatorios, AP-1 y NF- κ B [247, 248]. Sin embargo, en situaciones patológicas con elevada producción de TGF- β e IL-10, DHEA inhibiría la síntesis de estos mediadores [249, 244].

Con la edad los niveles de DHEA y DHEA-S disminuyen, mientras que los de cortisol se mantienen constantes, lo que lleva a un incremento en la relación Cortisol/DHEA. Tanto en humanos como en modelos murinos se evidenció que este incremento en la relación Cortisol/DHEA, con el paso de los años, resulta en una disminución de la inmunidad celular [250, 251]. Además, se asoció con un dramático cambio en la expresión de citocinas por parte de los linfocitos T [252], donde los niveles de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) se ven

disminuidos, mientras que la producción de las del perfil Th2 (IL-4 e IL-5) se encuentran aumentadas. Trabajos en ratones viejos demostraron que la administración de DHEA restablece la producción de citocinas por parte de las células T a niveles equivalentes a aquellos encontrados en ratones adultos [250, 253].

Estudios realizados en nuestro laboratorio referidos a la relación entre los niveles de cortisol y DHEA en pacientes con TB, pusieron de manifiesto que todos los pacientes presentaban un aumento en los valores de cortisol, pero no de DHEA, cuyas concentraciones se ubicaron muy por debajo de los controles, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos [254]. Si bien las concentraciones de cortisol se encontraban aumentadas, las evidencias sugirieron que el curso de la RI anti-TB dependería de la relación entre los niveles plasmáticos de ambas hormonas: Cortisol/DHEA [255, 254].

En conjunto, los datos obtenidos plantean que la relación Cortisol/DHEA podría constituir una herramienta accesible y de utilidad para el monitoreo de los pacientes con TB, sea en el momento de la detección de la patología como en el seguimiento clínico tras la instauración del tratamiento. A su vez, el marcado incremento en los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (IL-6, IFN- γ) se halló asociado positivamente con la severidad de la TB mientras que los de cortisol aunque significativamente aumentados no se correspondían con la magnitud del proceso inflamatorio [254]. Por otro lado los pacientes con las formas más severas de la enfermedad presentaron una disminución en la relación de los transcriptos GR α /GR β y un incremento en los de la 11 β HSD1 lo que sugeriría la presencia de ciertos mecanismos de resistencia al esteroide [256].

Construcción de la Hipótesis de trabajo

2- Construcción de la Hipótesis de trabajo

La TB es una patología con un importante componente inflamatorio, y desregulación de la RI que se traduce en una producción excesiva de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ , entre otras. La inflamación induce a su vez la respuesta de fase aguda con los consiguientes cambios en la producción y concentración de proteínas de fase aguda como la CRP. Este mediador facilita la respuesta inflamatoria [257], y sus concentraciones plasmáticas se correlacionan con la magnitud y severidad de la inflamación [258].

La elevación en los niveles de citocinas que tiene lugar durante el montaje de la RI puede estimular el eje HPA, con la consiguiente producción de esteroides adrenales [259, 260]. Como fuera comentado ambas hormonas desempeñan un papel muy importante en la regulación de la RI en condiciones normales y patológicas. El descenso en los niveles de DHEA, así como el incremento en los de cortisol, modifica el balance Th1/Th2, sesgándolo hacia respuestas Th2 [261]. En paralelo, también podría afectar poblaciones de LT reguladores, y así influir sobre el desenlace de la enfermedad.

En trabajos previos de nuestro grupo se analizaron los niveles circulantes de IFN- γ , IL-10, IL-6, cortisol, DHEA, en pacientes con diagnóstico reciente de TB pulmonar de distinta severidad, libres de afecciones endócrinas, embarazo o tratamiento con corticoides o drogas inmunomoduladoras. Las mediciones indicaron que los enfermos presentaban mayores niveles de IFN- γ y cortisol respecto de los controles, sin diferencias significativas de acuerdo a la severidad. Por su parte, la IL-6 e IL-10 también estuvieron aumentadas entre los casos, mostrando una relación positiva y significativa entre concentración y severidad. Hecho que confirmaba nuestras observaciones previas acerca de una mayor actividad Th2 en la enfermedad avanzada [262]. Por su parte, los niveles de DHEA se ubicaron muy por debajo de los controles, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos. Hecho que se vio reflejado en un aumento de la relación cortisol/DHEA la cual mostró una asociación positiva y sustantiva con la magnitud de la enfermedad [254], así como con el deterioro de la RI específica *in vitro* [255]. Estos

resultados nos llevaron a pensar que la relación Cortisol/DHEA podría constituir una herramienta accesible y de utilidad para el monitoreo de los pacientes, sea en el momento de la detección de la patología como en el seguimiento clínico tras la instauración del tratamiento.

La evaluación de los niveles circulantes de DHEA y cortisol es en definitiva un reflejo de la interacción bidireccional entre los Sistemas Inmune y Neuroendócrino. Los aumentos en los niveles de GC tenderían a proteger al hospedero de los efectos deletéreos de las citocinas proinflamatorias y de otros factores [263], desempeñándose también como agentes inmunomoduladores [264]. Como previamente se comentó, estos esteroides ejercen la mayoría de sus funciones biológicas a través de la unión con la isoforma α del GR.

En la amplia gama de alteraciones inmunoendócrinas que presenta la TB, también nos interesó indagar en torno a las modificaciones a nivel de la modulación de los receptores para GC. Los estudios de nuestro grupo en pacientes con TB pulmonar al momento del diagnóstico, denotaron cierto grado de resistencia a los GC en los casos con enfermedad avanzada. Si bien estos pacientes presentaron niveles plasmáticos elevados de cortisol y de la expresión de la enzima 11β HSD1 (encargada de la conversión cortisona \rightarrow cortisol), la relación entre los niveles de los transcritos GR α /GR β fue similar a la de los controles sanos [256].

Esta variada gama de alteraciones seguramente guarda relación con los profundos cambios clínico-patológicos que denotan los pacientes al momento del diagnóstico. En este orden de razonamiento la mejoría que experimentan los enfermos tras la instauración de un tratamiento efectivo debería mostrar un correlato con el perfil de mediadores inmunoendócrinos circulantes, como así también en la RI celular específica, a la par de modificaciones en los procesos vinculados al accionar de los GC. La hipótesis subyacente estaría direccionada hacia un descenso de los niveles de citocinas proinflamatorias y en la relación Cortisol/DHEA, con aumento de los niveles plasmáticos de DHEA, sin manifestaciones de resistencia a la acción de los GC. Más allá del valor intrínseco de estas investigaciones, en términos fisiopatogénicos, la caracterización de los

cambios que puedan suscitarse durante la terapia específica es un conocimiento sustancial en esto de proveer herramientas para un mejor control y seguimiento de la enfermedad.

Objetivos

3-Objetivos

3-1 Objetivos generales

En el momento del diagnóstico el paciente con TB presenta un marcado desequilibrio Neuroinmunoendócrino, caracterizado por aumento plasmático de citocinas pro- y antiinflamatorias y deterioro de la RI celular, conjuntamente con un significativo descenso de los niveles plasmáticos de DHEA y el consecuente desequilibrio de la relación cortisol/DHEA, en asociación con la severidad de la patología. Ante este cuadro y atendiendo al rol estimulante de la DHEA sobre la RI celular protectora hacia patógenos intracelulares como el *M. tuberculosis*, se consideró esencial:

- Investigar la respuesta inmunoendócrina en pacientes, desde su diagnóstico hasta la culminación del tratamiento, a fin de establecer el correlato entre los parámetros clínicos y de laboratorio (hormonas, citocinas, proteínas de fase aguda, modificaciones de las distintas poblaciones linfocitarias -T reguladoras-).
- Determinar si alguno(s) de los parámetros inmunoendócrinos bajo análisis se desempeñan como predictores de la posterior evolución de la enfermedad.

3-2 Objetivos específicos

- ☞ Conocer las variaciones producidas, desde el diagnóstico de Tuberculosis y hasta finalizado el tratamiento antibiótico y posterior recuperación, de las concentraciones séricas de Cortisol, DHEA y DHEA-S; TNF- α , IL-6, CRP, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10, TGF- β .

- ☞ Investigar las modificaciones producidas en las subpoblaciones linfoides y capacidad funcional de las mismas frente a *Mtb* irradiado, a partir de las muestras de sangre de pacientes con TB desde el diagnóstico, durante el tratamiento y posterior recuperación.

- ☞ Explorar si la severidad de la TB pulmonar se relaciona con mecanismos de resistencia a los GC. Para ello se cuantificaron las expresiones de los ARNm para las isoformas α y β de los receptores para GC, y aquellas correspondientes a las enzimas 11 β HSD 1 y 2 responsables de la interconversión cortisol \leftrightarrow cortisona.

- ☞ Analizar la interrelación entre los parámetros inmunológicos, endócrinos, y su correspondencia con la clínica, y reconocer si dentro de las variables analizadas, existe algún(os) componente(s) capaz de desempeñarse como predictor(es) de la evolución de la enfermedad.

Materiales y Métodos

4- Materiales y Métodos

4-1 Grupos de Estudio

4-1.1 Pacientes con tuberculosis pulmonar (TB)

Los pacientes se seleccionaron entre enfermos adultos (18 a 65 años) que no recibieron previamente fármacos antibacilares. Los mismos fueron seleccionados por médicos especialistas de entre los enfermos que concurrieron a los Servicios de Neumología del Hospital Provincial del Centenario, del Hospital Provincial Eva Perón de Granadero Baigorria y al Servicio de Tisioneumonología del Policlínico Intendente Carrasco de Rosario.

Todos fueron pacientes con serología negativa para HIV, y el diagnóstico de TB pulmonar se realizó sobre la base de criterios clínicos y radiológicos sumado a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo y/o cultivo del mismo. Se excluyeron del estudio aquellos sujetos que habían iniciado tratamiento para la TB, 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 medicadas con corticosteroides, inmunosupresores o inmunomoduladores.

La primera muestra de sangre se obtuvo antes del inicio del tratamiento específico. En todos los pacientes con TB se tuvo en cuenta el grado de compromiso pulmonar (según la extensión y tipo de lesión radiológica) y se incluyeron pacientes con enfermedad **leve** (pacientes con único lóbulo pulmonar involucrado, sin cavidades visibles), enfermedad **moderada** (pacientes con compromiso unilateral de 2 o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, que no excedan un diámetro total de 4 cm) y avanzada o **severa** (enfermedad bilateral con afectación masiva y cavidades múltiples).

El tratamiento específico tuvo una duración de 6 meses, se basó en el empleo de 4 drogas: isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), y etambutol (EMB). Durante los dos primeros meses se administraron las 4 drogas (fase intensiva) luego se prosiguió con INH y RMP por otros cuatro meses (fase de continuación). El seguimiento de

los pacientes fue de 9 meses, post-iniciación del tratamiento específico. Los controles se realizaron cada 4 semanas hasta completar el tratamiento (6to mes) y se tomó una muestra más al noveno mes (tres meses post- finalización del tratamiento específico). En cada visita se realizó un examen físico y se tomaron muestras de esputo para examen directo y cultivo. La radiografía de tórax fue tomada al comienzo y al final del tratamiento, y a los 9 meses de haberse iniciado el mismo.

Las muestras de sangre tanto para los estudios específicos como para el laboratorio clínico se obtuvieron en ayunas entre las 7:30 y 9:00 hs. De cada paciente se procesaron 5 muestras, que correspondieron al:

- 1- momento del diagnóstico (**T0**) y antes de comenzar el tratamiento específico,
- 2- segundo mes de tratamiento (**T2**) ininterrumpido,
- 3- cuarto mes de tratamiento (**T4**) ininterrumpido,
- 4- sexto mes de tratamiento (**T6**) ininterrumpido (momento donde finaliza el tratamiento específico),
- 5- tres meses luego de finalizado el tratamiento (9 meses del diagnóstico e iniciado el tratamiento, el que finalizó al sexto mes- **T9**).

4-1.2 Controles sanos (HCo)

Este grupo lo conformaron voluntarios sanos similares en sexo y edad al grupo de pacientes, vacunados con BCG, que no registraron contactos con pacientes con TB, enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos. También se excluyeron del estudio mujeres embarazadas y menores de 18 años.

A los voluntarios sanos se les extrajo una única muestra de sangre venosa.

En todos los voluntarios (HCo y pacientes) además de los parámetros inmunoendócrinos, se recabaron datos sobre índice de masa corporal, tabaquismo, enfermedad obstructiva crónica, alcoholismo, uso de drogas no permitidas, uso de

medicamentos, así como parámetros del laboratorio clínico a cargo del Laboratorio Central del Hospital del Centenario: hemograma completo con recuento de plaquetas, glicemia, uremia, uricemia, proteínas totales, albúmina, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, colinesterasa, GOT, GTP y velocidad de eritrosedimentación.

La incorporación de los voluntarios se efectuó luego de que otorgaran su libre consentimiento a participar por escrito. Todos ellos fueron previamente informados de los objetivos del estudio, el cual se ajustó a las normas éticas nacionales e internacionales que regulan la investigación en seres humanos y fue aprobado por el Comité de Ética, Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (Res C.D. Nº 3002/2005 FCM, UNR).

4-2 Recolección de muestras y separación de células mononucleares

A primera hora de la mañana, se obtuvo una muestra de sangre (50 ml) anticoagulada con EDTA (Wiener Lab. Rosario, Argentina) en una proporción de 100µl cada 10ml de sangre. Una alícuota de la misma se utilizó para obtener los resultados del laboratorio clínico y hemograma.

En el Área de cultivo del Instituto las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 rpm, se retiró el plasma al cual se le adicionó Trasylol (Bayer Pharmaceuticals Corporation, Alemania) para una mejor conservación de las proteínas y se fraccionó y conservó a -20º C hasta su utilización. Luego se extrajo la capa de leucocitos ubicados en la interfase del paquete de glóbulos rojos y el plasma, la cual se resuspendió en igual volumen de solución salina de *buffer* fosfato (PBS, pH=7,4) adicionado con penicilina-estreptomicina (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria, 500µl/100ml de PBS) el que se designó como PBS*. Estas suspensiones celulares se agregaron en una proporción 2:1 a tubos que contenían Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA. $\delta=1.077\text{g/ml}$), los mismos se centrifugaron durante 30 minutos a 1800 rpm. El aislamiento de las células mononucleares (CM) de sangre periférica (CMP) se realizó

teniendo en cuenta la diferencia de densidades que existe entre los elementos figurados de la sangre. A tal efecto, que sólo se retiraron las células mononucleares que permanecían en la interfase entre el Ficoll-Paque y el plasma diluido con PBS*.

Las CMP se lavaron 3 veces con PBS*, centrifugando durante 15 minutos a 1200 rpm. Por último, el paquete celular se resuspendió en PBS*, asegurando una buena dispersión por agitación y se realizó el conteo y evaluación de la viabilidad de las CMP mediante el colorante de exclusión azul Tripán.

Una parte de las CMP se diluyeron en medio de cultivo completo [MCC: RPMI 1640 adicionado con ATB y 5 % de suero humano AB (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), inactivado en baño de agua a 56°C durante 30 minutos con agitación constante] hasta obtener una suspensión de 2×10^6 Células/ml, las que se utilizaron en cultivos celulares. El resto de las CMP se preservaron en TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a -80°C en una concentración de entre 5 a 8×10^6 Células/ml de TRIzol® hasta su utilización.

Una fracción de la muestra de sangre a utilizar en los cultivos fue procesada para la identificación y cuantificación de monocitos y de las distintas subpoblaciones linfocitarias incluyendo células T-reg CD4+CD25+FoxP3+, por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos y controles de isotipo.

4-2.1 Análisis de la capacidad proliferativa de las CMP de pacientes con TB pulmonar

A fin de analizar la capacidad de respuesta frente al estímulo específico con *M. tuberculosis* cepa H37Rv muerto por radiación gamma (Mtbi, 8µg/ml, Colorado University, Co, USA), las CMP obtenidas de los diferentes grupos de estudio se sembraron, por cuadruplicado y en microplacas de fondo plano de 96 pocillos, 100µl de las células resuspendidas en MCC (2×10^5 células) y se estimularon con Mtbi. Como control positivo de proliferación se utilizó Concanavalina A (ConA, 2,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Al finalizar las siembras, las placas conteniendo un volumen final de 200 µl/pocillo, se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera de aire humidificada con 5% de CO₂.

Dieciocho horas previas a la finalización del cultivo se agregó 1 μ 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 Índice de Estimulación (IE: cuentas por minuto -cpm- promedio de cultivo estimulado/ cpm promedio de cultivo sin estimular).

4-2.2 Determinación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo

Se utilizan los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de superficie de leucocitos humanos: CD4- PhycoEritrina (PE), CD8-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD45-FITC/CD14-PE (Simultest LeucoGATE, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y CD3-FITC/CD19-PE (Simultest CD3/CD19, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). La inmunotinción de los antígenos de superficie se realizó tomando 50 μ l de sangre entera a la que se le adicionaron los anticuerpos monoclonales correspondientes y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Luego se procedió a la lisis de los eritrocitos mediante una solución de NaHCO₃/NH₄Cl. Tras dos lavados con el buffer de corrida (BD FACSflow, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSDiva II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) utilizando el programa Cellquest (version 3.1).

4-2.3 Aislamiento de las células mononucleares y determinación de células T reguladoras

Una fracción de las CPM fue reservada para la determinación de la población de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+). Para ello se procedió a la inmunotinción de los antígenos de superficie CD4 y CD25 (CD4-PEcyc5.5 y CD25-PE, Caltag, Invitrogen, Buckingham, UK), incubando las células con los anticuerpos monoclonales

correspondientes durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras ello las células fueron lavadas con el buffer de corrida FACSflow y se procedió con la inmunotinción intracelular de FoxP3. Para ello las células fueron permeabilizadas y fijadas (buffer de permeabilización eBioscience, San Diego, CA, USA) según indicación del fabricante. Se realizó entonces la incubación con el anticuerpo monoclonal anti FoxP3-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA) en oscuridad y 4°C durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados y se procedió a la adquisición de los datos en un citómetro de flujo FACSDiva II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) utilizando el programa Cellquest (version 3.1).

4-3 Cuantificación plasmática de citocinas, hormonas y otros factores

La cuantificación de la concentración plasmática de las citocinas IFN- γ (BD optEIA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, Límite de detección -LD-: 4,7 pg/ml), IL-6 (ELISA-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, LD: 0,07 pg/ml), IL-4 (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, LD: 7,8 pg/ml), IL-17 (Cytoscreen, BioSource Europe, LD: 2 pg/ml), TGF- β (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, LD: 125 pg/ml) y de las hormonas cortisol, DHEA y DHEAS (EIA, DRG Systems, Alemania, LD: 2,5; 0,1 y 44 ng/ml respectivamente) se realizó utilizando Kits de ELISAs comerciales y siguiendo las indicaciones del fabricante. Los niveles plasmáticos de Proteína C Reactiva se cuantificaron mediante CRP ultrasensible Turbitest, (Wiener Lab., Rosario, Argentina, LD: 2,5 mg/l).

Nota: Dado que la gran mayoría de los Laboratorios de Análisis Clínicos en los Centros de Salud Pública poseen equipos automatizados para la determinación de hormonas por electroquimioluminiscencia (EQ), que utilizan kits que según las recomendaciones del fabricante requieren de suero, los niveles de los mencionados esteroides también se cuantificaron por esta técnica. El objetivo fue comparar los resultados por ambos métodos.

4-3.1 Cuantificación sérica de Cortisol y DHEA-S

La cuantificación de la concentración sérica de las hormonas cortisol y DHEA-S se realizaron por EQ (Cobas e411, Roche, Alemania).

4-4 Detección de citocinas de los patrones Th1/Th2/Th17 por citometría de flujo

El Kit CBA (Cytometric Bead Array) Humano Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), se utilizó para la cuantificación en simultáneo de: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A (LD: 2,6; 4,9; 2,4; 4,5; 3,8; 3,7 y 18,9 pg/ml respectivamente). Para el procesamiento de las muestras se siguieron las indicaciones del fabricante. Los niveles de las citocinas fueron calculados utilizando el Software para CBA de BD (versión 4.0, BD Biosciences).

4-5 Cuantificación en tiempo real de los ARNm de GR α , GR β , 11 β HSD1 Y 11 β HSD2

La expresión de los mencionados transcritos en CMP se determinó por transcripción reversa del ARN total seguido por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCRq). Una vez extraído, cuantificado y analizado el ARNm, se realizó la síntesis de los ADNc a través de la extensión de oligos dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por medio de la transcriptasa reversa del virus de leucemia mamaria de ratón (MMuLV, Fermentas, Pittsburgh, PA, USA), el protocolo se describe en la sección Condiciones de reacción de la RT-PCR **4-5.2**. Como control interno [265] para efectuar la cuantificación y normalización de los resultados se utilizó la peptidilpropil isomerasa A (cyclophilin A, CycA), cuyo ARNm fue retrotranscrito y amplificado para cada muestra. La amplificación en tiempo real de los transcritos de interés (GR α , GR β , 11 β HSD1, 11 β HSD2 y CycA) se llevó a cabo en un *Real Time Mx3000P qPCR System* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,

USA), monitoreada mediante la determinación del colorante fluorescente SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemania). El método permitió cuantificar los niveles relativos de expresión de los ARNm. En cada corrida se incluyeron curvas externas constituidas por diluciones seriadas de ADNc del transcripto a cuantificar, obtenido a partir de las líneas celulares Jurkat y NCI-H295R que expresan los mencionados transcriptos [266, 267]. La homogeneidad y especificidad de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) obtenidos en cada muestra se confirmó mediante el análisis de curvas de “*melting*” luego de finalizada la amplificación, y siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo.

El análisis de los resultados obtenidos en la cuantificación de los transcriptos se realizó mediante el “Método de Curva Estándar Relativa” (*Relative Standard Curve Method. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR –Applied Biosystems-*).

4.5.1 Diseño de cebadores

Los cebadores o *primers* utilizados fueron los mismos que en trabajos previos [268, 256, 269) los cuales fueron diseñados utilizando el software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) en base a las secuencias disponibles *on line* en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. La lista de los cebadores utilizados se describe en la Tabla 1.

Transcripto	Cebador Directo (Forward)	Cebador Reverso (Reverse)	Tamaño del amplicón
CycA PPIA GenID: 5478	<i>CycA-F</i> 5'-gca tac ggg tcc tgg catc ttg-3'	<i>CycA-R</i> 5'-tgc cat cca acc act cag tct tg-3'	101pb
GR α NR3C1 , GenID: 2908 Transcript variant 1	<i>GR-F</i> 5'-gaa gga aac tcc agc cag aac-3'	<i>GRα-R</i> 5'-gat gat ttc agc taa cat ctcg-3'	159bp
GR β NR3C1 , GenID: 2908 Transcript variant 6	<i>GR-F</i> 5'-gaa gga aac tcc agc cag aac-3'	<i>GRβ-R</i> 5'-tga gcg cca aga ttg ttg g-3'	144 bp
11 β HSD1 HSD11 1 , GenID:3290	<i>11βHSD1 F</i> 5'- atg ata ttc acc atg tgc gca -3'	<i>11βHSD1 R</i> 5'-ata ggc agc aac cat tgg ata ag-3'	158pb
11 β HSD2 HSD11B1 , GenID:3291	<i>11βHSD2 F</i> 5'-tcg cgc ggt gct cat cac-3'	<i>11βHSD2 R</i> 5'- gta cgc agc tcg atg gca cc-3'	132pb

Tabla 1: Cebadores seleccionados para la amplificación de los transcritos de GR α y GR β , de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 y de la Ciclofilina A. GR α : gen del receptor para glucocorticoides alfa; GR β : gen del receptor para glucocorticoide beta; 11 β HSD: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; CycA: ciclofilina A; pb: pares de bases

4-5.2 Condiciones de reacción de la RT-PCR

Las retrotranscripciones se realizaron utilizando un termociclador **TC-5000 Techne** (Techne Inc., Burlington, USA).

Mezcla de reacción de cada tubo: 1 mM dNTP (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); 1 μ g oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 4 μ g ARNtotal; 10 μ l solución tampón 5X; 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); 200 U RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); H₂O (volumen final =50 μ l).

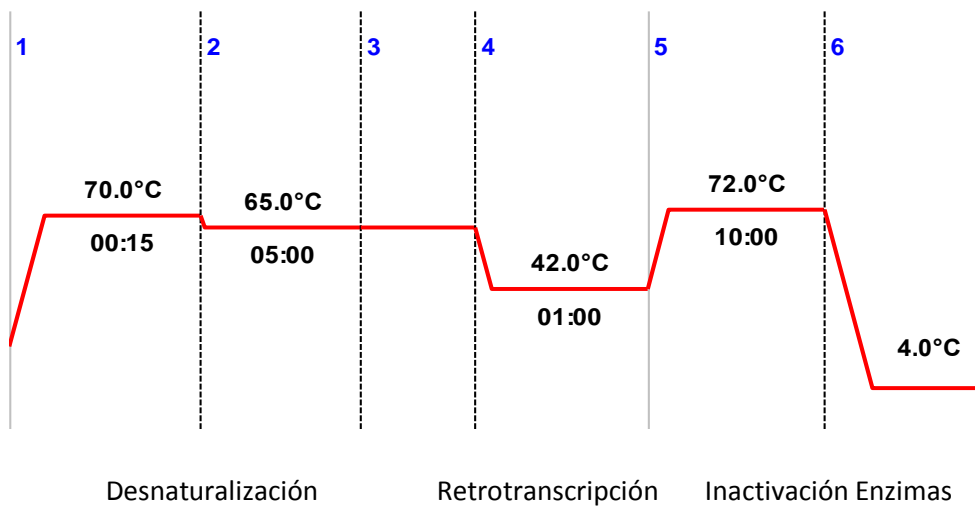


Figura 6: Perfil térmico de Retrotranscripción.

En el paso 3 (Figura 6) se coloca el equipo en pausa y se adiciona la retrotranscriptasa a la mezcla de reacción para evitar disminución de su actividad enzimática por calor.

El ADNc es guardado a -70°C hasta la realización de la PCR.

4-5.3 Condiciones de reacción de la PCR en tiempo real (PCRq) para la cuantificación relativa de los ARNm de GR α , GR β , 11 β HSD 1 y 2 en CMP

Las PCRq se realizaron utilizando un equipo Real Time Mx3000P qPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Cada reacción de PCRq consistió de 5 μl de la dilución correspondiente de ADNc; 0,6-0,4 μM de cada juego de *primers*; 2mM de MgCl_2 , 2,5 μl de Buffer 10X 0,2mM; 0,5 μl SYBER green I 10X (Roche, Mannheim, Alemania); 0,8mM total de dNTP (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); 1,25U de Taq DNA Polimerasa recombinante (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA) y H_2O (25 μl de volumen final).

El perfil térmico utilizado para todos los transcritos presentó un esquema similar detallado en la Figura 6, sin embargo cada transcritos presentó una temperatura de anillado y lectura particular detallados en la Tabla 2. Los datos se expresaron como

Unidades Arbitrarias (UA), donde 1 UA equivale a 1µg de ARN estándar utilizado en la síntesis del ADNc de las curvas relativas de expresión.

Transcripto	Temperaturas de anillado	Temperaturas de lectura
CycA	60°C	84°C
GR α	60°C	81°C
GR β	62°C	82°C
11 β HSD1	59°C	86°C
11 β HSD2	60°C	82°C

Tabla 2: Temperaturas de anillado y de lectura de los perfiles térmicos utilizados en las PCRq de los transcritos en estudio. CycA: cyclofilina A; **GR α :** receptor para glucocorticoides alfa; **GR β :** receptor para glucocorticoide beta; **11 β HSD:** 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

En las Figuras 7, 8, 9 y 10 de manera representativa se detallan: la curva estándar, el perfil térmico utilizado, las curvas de *melting* y las de amplificación, obtenidas en uno de los ensayo de PCRq (CycA). Cabe destacar que la cuantificación relativa de los transcritos fue puesta a punto en una Tesis anterior del grupo de investigación dirigido por la Dra. Bay [268].

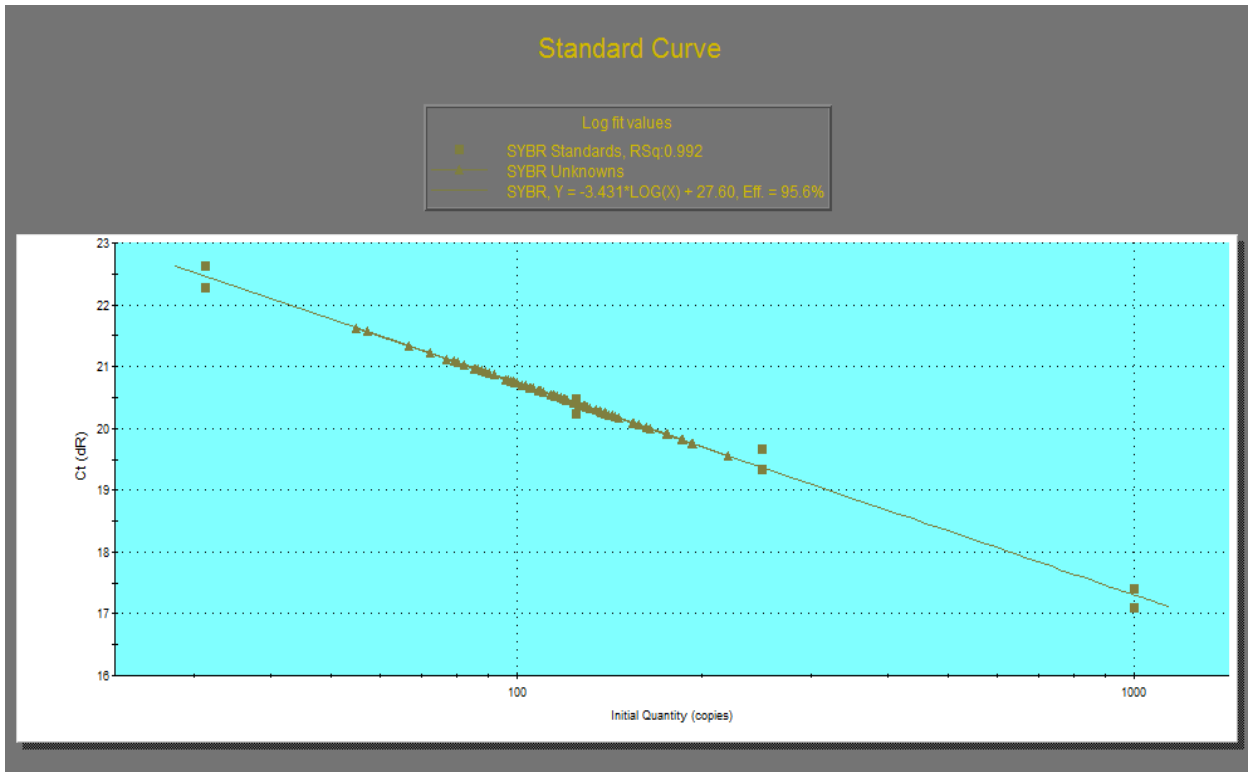


Figura 7: Curva estándar obtenida en la cuantificación del transcrito de CycA.

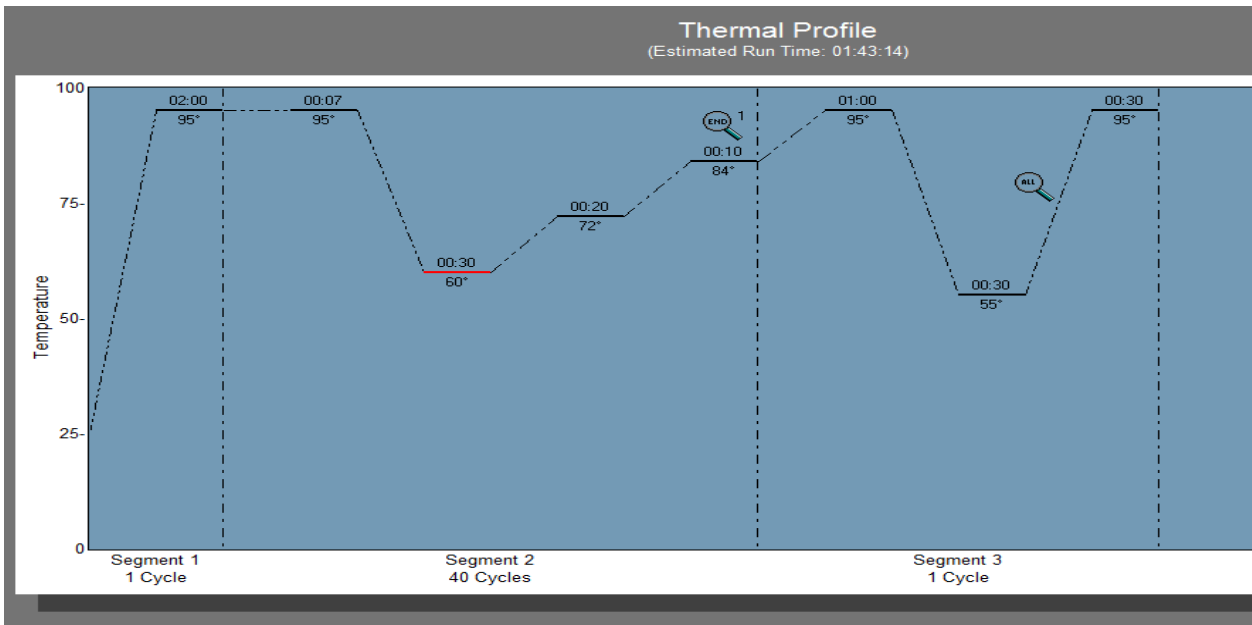


Figura 8: Perfil térmico utilizado en las PCRq de CycA.

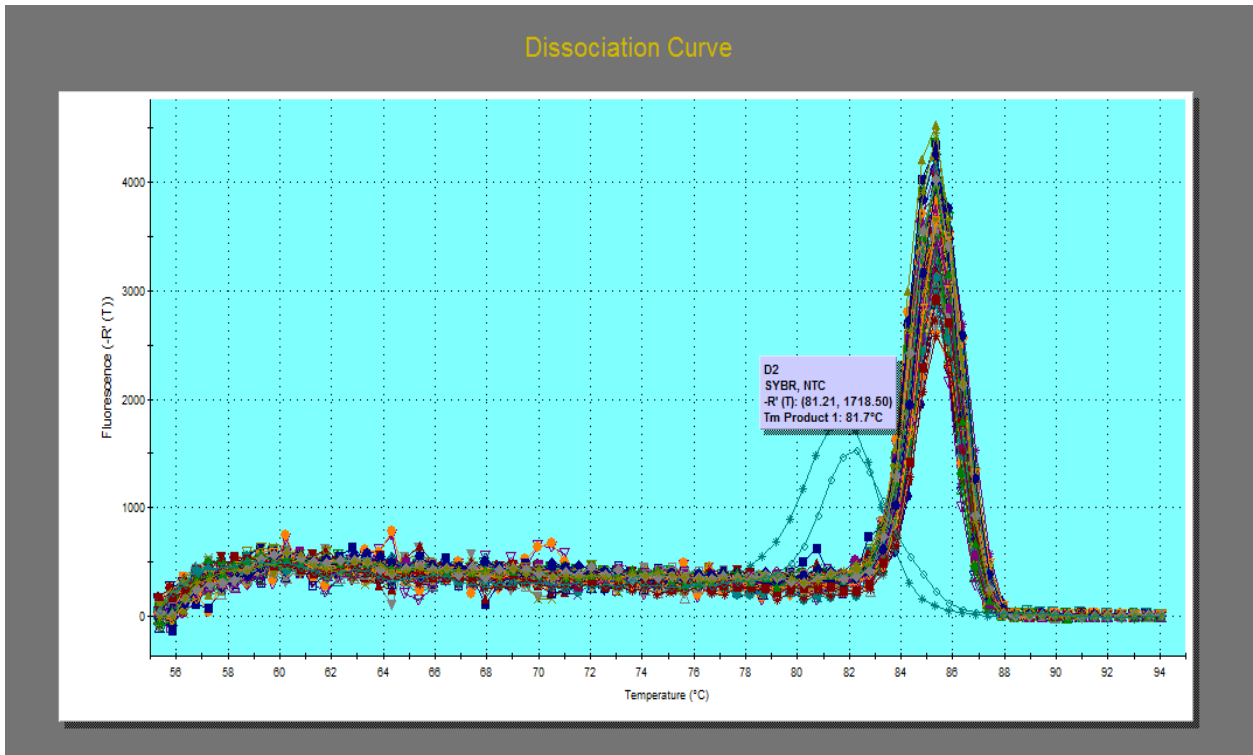


Figura 9: Curvas de *melting* obtenidas durante la PCRq de CycA.

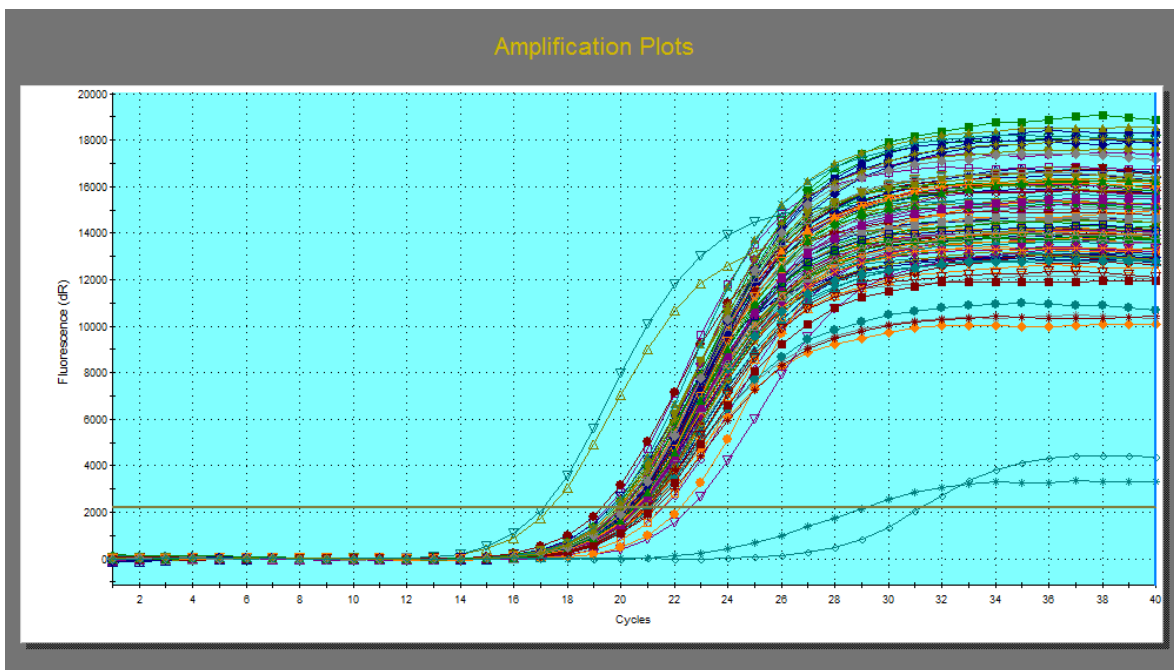


Figura 10: Curvas de amplificación obtenidas durante la PCRq de CycA.

4-6 Análisis estadísticos

Las comparaciones entre grupos (TB vs. HCo) se efectuaron por medio de pruebas no paramétricas, utilizando la U de Mann-Whitney. Para el caso de muestras relacionadas como las obtenidas durante el tratamiento contra la TB, las comparaciones se realizaron mediante la Prueba de Friedman y la de Wilcoxon. Las correlaciones entre dos variables se efectuaron aplicando el método de correlación de Spearman. Los mencionados análisis estadísticos se realizaron por medio del programa Graphpad prism 4. A fin de analizar las variables en su conjunto para cada uno de los tiempos establecidos, se realizó el análisis multivariado de componentes principales, utilizando el programa SAS versión 9.2. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando presentaron un nivel de $p < 0,05$.

Resultados

5- Resultados

5-1 Descripción de la población en estudio

La secuencia de la confección de la muestra en estudio se expresa en la Figura 11. De los 74 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar, sólo 24 completaron de manera estricta el esquema de seguimiento propuesto. Con respecto a los sujetos sanos de los 39 voluntarios incorporados, solo 26 se correspondieron en edad y sexo con los 24 pacientes que completaron el estudio¹.

La Tabla 3 muestra algunas de las características de los grupos de estudio. Como puede observarse pacientes y controles no difirieron en edad ni en distribución de sexo. También se tuvo en cuenta la vacunación con BCG, la cual no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Al analizar la severidad de la TB, teniendo en cuenta los criterios descritos en materiales y métodos (Ver página 67), dos de los pacientes presentaron TB leve, trece TB moderada y nueve TB severa.

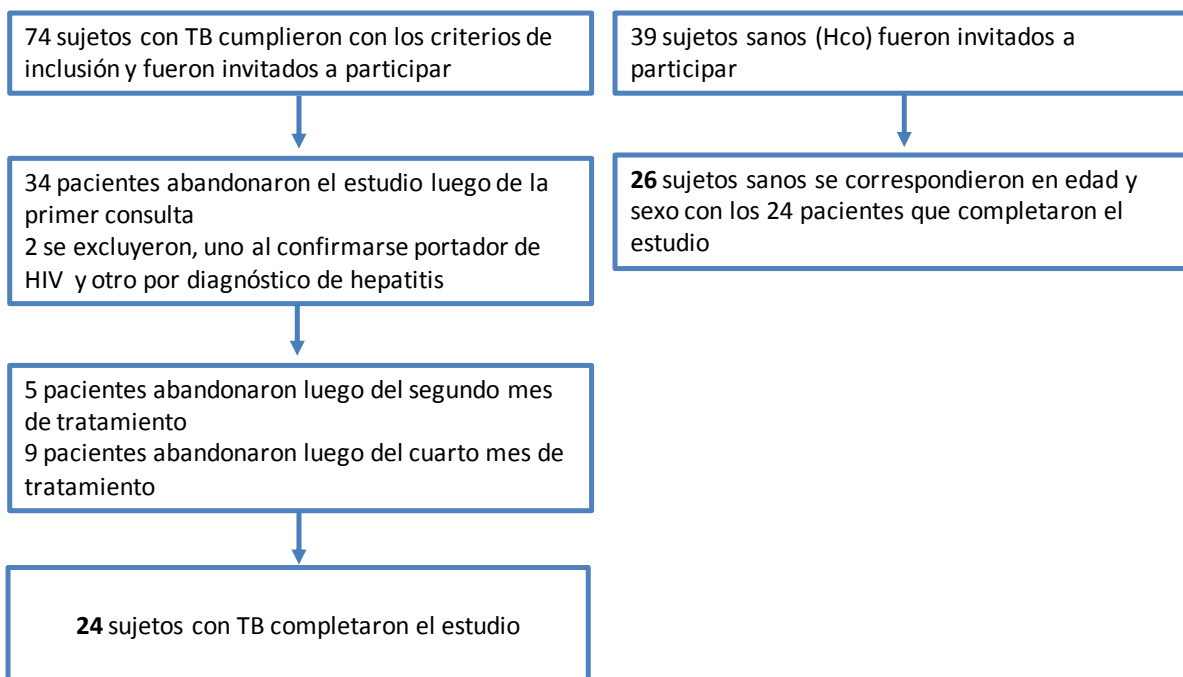


Figura 11: Diagrama de participación en el estudio.

¹ Cuando el número muestral de la variable bajo análisis difirió del número de voluntarios incorporados al estudio, éste se especificó en el texto y/o en la leyenda de la figura correspondiente.

	HCo (n=26)	TB (n=24)	P
Edad	50,5 (25,8 - 57,3)	45 (21,5 - 54,8)	Ns
Sexo (M/F)	24/02	22/02	Ns
IMC	27,4 (25,1 - 30,8)	19,9 (18,3 - 23,8)	p<0,001
BCG (%)	95%	80%	Ns

Tabla 3: Características de los grupos bajo estudio. Los datos fueron expresados como mediana y rango intercuartil. **IMC:** índice de masa corporal; **BCG:** vacunados con Bacilo de Calmette Guérin; **HCo:** controles sanos; **TB:** pacientes con tuberculosis pulmonar; **Ns:** no significativo.

Como todos los pacientes refirieron pérdida de peso al momento de la consulta, se realizó el cálculo del IMC, observándose que este fue significativamente menor en el grupo de pacientes respecto de los controles (Figura 12). El 75% de los controles, presentaron valores de IMC considerados de sobrepeso para la población de acuerdo a la WHO [270]. En contraposición, el grupo de pacientes mostro el 75% de los valores comprendidos entre normo y bajo peso. Al analizar esta variable durante el seguimiento, se vio que la misma aumentaba significativamente a partir del segundo mes de tratamiento específico respecto de los valores presentados al T0, alcanzando el valor más alto luego de finalizado el tratamiento -T9- (Figura 13). Si bien los pacientes incrementaron el IMC, estos valores nunca alcanzaron los obtenidos por el grupo control.

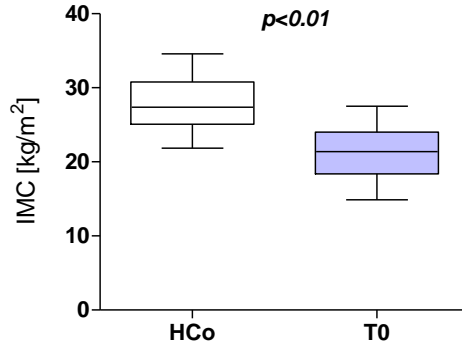
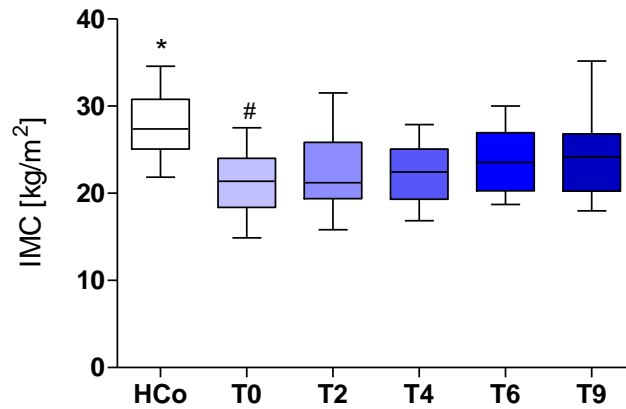


Figura 12: índice de masa corporal de pacientes con TB al momento del diagnóstico y controles sanos. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **IMC:** Índice de Masa Corporal (Kg/m²). **HCo:** controles sanos. **T0:** pacientes al momento del diagnóstico.



* diferente de los pacientes con TB en todos los tiempos analizados ($p < 0,01$)
 # diferente de cada uno de los tiempos analizados ($p < 0,01$)

Figura 13: índice de masa corporal de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **IMC:** Índice de Masa Corporal (Kg/m²); **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

En cuanto a los parámetros considerados en el laboratorio, en la Tabla 4 se muestran los resultados de la cuantificación de eritrocitos, hemoglobina, porcentaje de hematocrito, plaquetas, leucocitos, fórmula leucocitaria y ERS en pacientes con TB y controles sanos. Los pacientes no difirieron de los controles en cuanto a la concentración eritrocitaria, pero si se evidenció una disminución en los niveles de hemoglobina y el porcentaje de hematocrito en el grupo de pacientes al momento del diagnóstico respecto del grupo control. Los niveles de los glóbulos blancos se encontraron aumentados al T0 ($p < 0,05$), sin modificaciones durante el seguimiento con respecto al de los HCo. En cuanto a la fórmula leucocitaria los pacientes mostraron mayor porcentaje de neutrófilos ($p < 0,05$) con disminución significativa en el porcentaje de linfocitos ($p < 0,05$) al T0 respecto de los controles, ambas variables tienden a recuperar las proporciones de los HCo durante el tratamiento específico. Los porcentajes de monocitos y basófilos no difirieron entre los grupos bajo estudio, ni en los diferentes tiempos de los pacientes analizados. Mientras que los eosinófilos se vieron aumentados durante el tratamiento específico y se mantuvieron altos aún una vez finalizado el mismo, tanto respecto del momento del diagnóstico como del grupo control. Si bien este incremento fue significativo los valores se encontraron dentro de los considerados de referencia. Además al T0 los pacientes presentaron concentraciones elevadas de plaquetas respecto del grupo control ($p < 0,05$), estas diferencias se pierden con el inicio del tratamiento específico. Al evaluar la ERS, encontramos un aumento significativo al T0 y T2 respecto de los controles; a partir del cuarto mes de tratamiento específico esta disminuye asemejándose a la de los HCo. Esta variable (que refleja en alguna medida la respuesta de fase aguda) se encontró asociada positivamente al T0 con el grado de severidad de la TB [$r = 0,50$; $p < 0,05$] y negativamente con el IMC [$r = -0,50$; $p < 0,05$] y con los niveles de albúmina [$r = -0,52$; $p < 0,05$]. Esta última constituye un reactante negativo de la respuesta de fase aguda.

En la Tabla 5 se exponen los resultados obtenidos de los principales parámetros del laboratorio clínico en las muestras de sangre de los pacientes con TB y controles sanos. Los sujetos con TB evidenciaron al momento del diagnóstico una disminución en los

niveles de uricemia, albúmina, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, colinesterasa y GPT, y un incremento en los de proteínas totales.

	HCo (n=26)	T0	T2	TB (n=24)		
				T4	T6	T9
Glóbulos Rojos (10 ⁶ /μl) [vr: 3,5-5,5]	5,1 (4,9-5,2)	4,9 (4,5-5,6)	5,1 (4,9-5,6)	5,0 (4,7-5,3)	5,0 (4,6-5,3)	5,1 (4,7-5,5)
HGB (g/dl) [vr: 11-16]	14,8 (14,3-15,5)	13,7 * (11,9-14,5)	14,6 # (13,8-15,3)	14,5 # (12,9-15,1)	14,7 (13,5-15,3)	15,1 # (14,1-15,5)
Hto (%) [vr: 35-50]	44,1 (42,3-44,9)	41,7 * (37,5-44,8)	44,0 # (41,8-45,8)	43,1 (39,7-44,9)	43,5 (40,5-45,9)	44,5 # (41,6-47,1)
Glóbulos Blancos (10 ³ /μl) [vr: 4-9]	7,2 (5,4-8,1)	7,9 * (6,8-10,6)	5,7 # (4,8-7,2)	5,6 # (4,8-8,9)	7,4 # (5,2-8,0)	7,2 # (5,6-8,9)
Neutrófilos (%) [vr: 45-65]	57,8 (52,0-63,3)	71,1 * (56,0-73,9)	57,5 # (51,5-62,7)	53,0 # (44,9-61,2)	58,6 # (46,3-60,6)	58,7 # (47,1-62,9)
Eosinófilos (%) [vr: 0-4]	2,6 (2,0-3,5)	2,0 (0,7-3,5)	3,2 # (2,3-6,5)	4,0 *# (2,4-5,7)	4,0 *# (2,2-5,4)	4,0 *# (2,7-6,3)
Basófilos (%) [vr: 0-1]	0,8 (0,4-1,0)	0,5 (0,0-1,0)	0,8 (0,6-1,4)	0,9 (0,4-1,3)	0,9 (0,5-1,4)	1,0 (0,7-1,3)
Linfocitos (%) [vr: 25-35]	28,1 (25,0-35,2)	16,5 * (13,7-25,3)	25,6 # (19,2-33,0)	30,1 # (24,7-37,4)	27,4 # (23,3-34,8)	25,6 # (22,6-34,8)
Monocitos (%) [vr: 0-12]	8,1 (6,8-10,0)	9,8 (7,2-13,0)	9,5 (7,4-11,6)	9,1 (8,1-12,6)	9,4 (6,9-11,2)	9,5 (8,2-10,5)
Plaquetas (10³/μl) [vr: 150-400]	236,5 (207,8-289,5)	323,0 * (259,0-417,0)	253,0 # (224,0-352,0)	220,5 # (202,5-307,5)	215,0 # (190,5-277,0)	248,0 # (199,0-275,0)
ERS (mm/1^{ra}h) [vr: 1-15]	5,0 (2,0-11,0)	44,0 * (17,3-75,8)	11,0 *# (4,5-21,5)	5,0 # (4,0-18,0)	6,0 # (3,0-13,0)	6,0 # (2,8-10,5)

Tabla 4: Cuantificación de eritrocitos, hemoglobina, porcentaje de hematocrito, plaquetas, leucocitos, fórmula leucocitaria y velocidad de eritrosedimentación de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Los datos se expresan como mediana (línea) y rango intercuartil. **HCo:** controles sanos; **HGB:** hemoglobina; **Hto:** hematocrito; **ERS:** velocidad de eritrosedimentación; **vr:** valor de referencia correspondiente a adultos de ambos sexos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento. *p<0,05 vs. HCo; #p<0,05 vs. T0.

	HCo (n=26)	TB (n=24)				
		T0	T2	T4	T6	T9
Glicemia (mg/dl) [vr:70-100]	89,0 (83,0-97,5)	95,5 (82,0-104,0)	93,0 (86,3-101,5)	88,0 (85,0-99,0)	86,0 # (78,0-93,0)	82,0 # (78,5-92,5)
Uremia (mg/dl) [vr: 16-49]	32,0 (27,5-39,8)	29,5 (23,75-32,7)	32,5 (23,8-38,8)	32,0 (21,0-39,8)	31,0 (21,5-40,0)	31,5 # (27,5-40,0)
Uricemia (mg/dl) [vr: 3,4-7,0]	5,6 (4,9-6,5)	4,3 * (3,1-5,0)	6,8 # (5,0-8,4)	4,7 (4,5-5,5)	4,6 (4,3-5,4)	4,3 (3,8-5,4)
Proteínas totales (g/dl) [vr: 6,6-8,7]	7,6 (7,2-7,7)	8,4 * (7,5-9,4)	8,1 * (7,7-8,7)	7,7 # (7,4-8,6)	7,6 # (7,1-8,1)	7,6 # (7,2-8,0)
Albúmina (g/dl) [vr: 3,4-4,8]	4,5 (4,2-4,6)	3,9 * (3,4-4,3)	4,4 # (4,0-4,7)	4,4 # (4,2-4,6)	4,4 # (4,3-4,7)	4,6 # (4,3-4,8)
Colesterol total (mg/dl) [vr: 130-200]	172,0 (147,0-185,5)	147,0 * (126,0-172,0)	188,5 # (139,5-220,5)	196,0 # (133,0-204,0)	184,0 # (150,5-207,5)	174,0 # (136,0-203,0)
Colesterol HDL (mg/dl) [vr: 40-80]	46,5 (44,3-55,5)	33,0 * (28,0-47,0)	56,0 # (43,0-59,75)	53,0 # (45,0-60,5)	55,0 # (42,0-61,5)	47,0 # (42,0-59,0)
Triglicéridos (mg/dl) [vr: < 200]	120,0 (87,0-138,0)	94,0 * (62,0-128,0)	89,0 * (77,0-116,0)	102,5 (82,7-131,5)	97,5 (66,2-125,5)	100,0 (66,0-160,0)
Colinesterasa (UI/L) [vr: 6400-15500]	9668,0 (8745,0-10393,0)	5472,0 * (2671,0-6738,0)	8442,0 # (7305,0-10126,0)	8167,0 # (7461,0-9469,0)	8432,0 # (8153,0-10363,0)	7523,0 # (6817,0-9011,0)
GOT (UI/L) [vr: 10-38]	20,5 (18,0-24,3)	18,5 (15,8-28,8)	21,5 (15,8-40,0)	22,0 (19,3-23,8)	23,5 (19,3-28,5)	20,5 (16,8-33,5)
GPT (UI/L) [vr:10-41]	21,0 (17,5-27,5)	14,0 * (10,0-24,5)	12,0 * (10,0-21,0)	14,0 * (12,0-19,0)	15,5 (12,0-25,8)	15,0 * (11,0-21,5)

Tabla 5: Principales parámetros del laboratorio clínico de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Los datos se expresan como mediana (línea) y rango intercuartil. **vr:** valor de referencia correspondiente a adultos de ambos sexos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento. *p<0,05 vs. HCo; #p<0,05 vs. T0.

5-2 Ensayo de linfoproliferación

Con el propósito de conocer la capacidad de respuesta de las CMP *in vitro* frente al Mtb, se realizaron cultivos de las CMP de pacientes con TB pulmonar y HCo estimulados específicamente. Los resultados obtenidos fueron expresados como Índice de Estimulación. Como se muestra en la Figura 14, y al igual que lo observado en trabajos previos, al momento del diagnóstico los pacientes presentaron una disminución en la proliferación específica en comparación con los controles (p<0,01). Esta diferencia entre

grupos se pierde con el inicio del tratamiento específico, dado que los pacientes mostraron un incremento significativo de la respuesta linfoproliferativa (Figura 15).

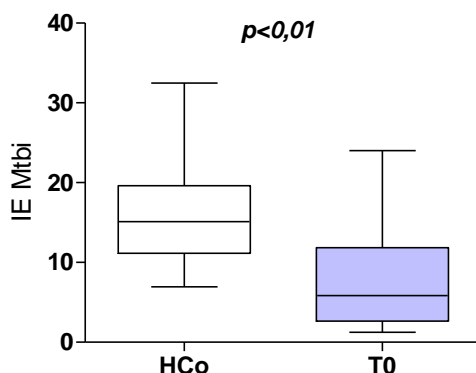


Figura 14: Respuesta linfoproliferativa de pacientes con TB al momento del diagnóstico y controles sanos. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. IE: Índice de estimulación (promedio de las cuentas por minuto –cpm- de cultivos estimulados/ promedio de cpm de cultivos sin estimulación); **Mtbi**: *M. tuberculosis* muerto por radiación; **HCo**: controles sanos; **T0**: pacientes al momento del diagnóstico.

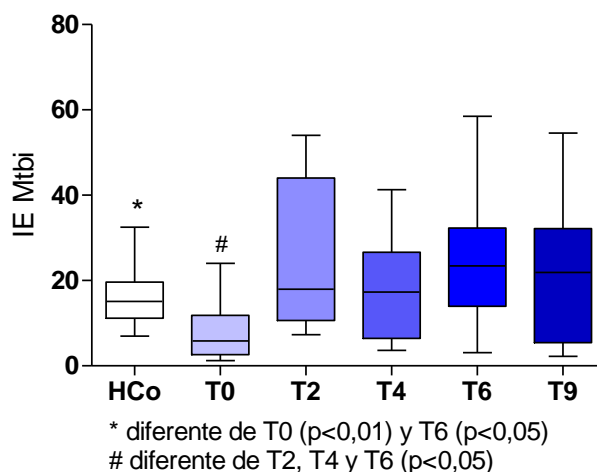


Figura 15: Respuesta linfoproliferativa de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. IE: Índice de estimulación (promedio de las cuentas por minuto –cpm- de cultivos estimulados/ promedio de cpm de cultivos sin estimulación); **Mtbi**: *M. tuberculosis* muerto por radiación; **HCo**: controles sanos; **T0**: momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6**: 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9**: tres meses luego de finalizado el tratamiento.

5-3 Subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TB durante el tratamiento específico

Al analizar la población linfocitaria por citometría de flujo encontramos, en coincidencia con los resultados del laboratorio, una linfopenia significativa en los pacientes con TB al momento del diagnóstico respecto del grupo control (Figura 16). Con el inicio del tratamiento específico el porcentaje de linfocitos aumentó significativamente en comparación con los observados al T0 ($p < 0,05$), estos valores permanecieron similares a los obtenidos por los controles durante todo el tratamiento. Tres meses luego de finalizado el tratamiento específico el porcentaje de linfocitos aumento significativamente con respecto a los controles y al T0 ($p < 0,05$) (Figura 17).

Al analizar las poblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+, observamos que los individuos con TB presentaron una disminución en el porcentaje de ambas poblaciones al T0 en comparación con los HCo (Figura 18 A y B). A este tiempo, el porcentaje de linfocitos TCD4+ se vio correlacionado positivamente con el índice de estimulación ($r = 0,63$; $p < 0,05$). Durante el tratamiento específico ambas poblaciones aumentaron significativamente alcanzado valores similares al de los controles, en el caso de los LTCD4+ al T9 el porcentaje alcanzado fue mayor que el de los HCo (Figura 19 A y B).

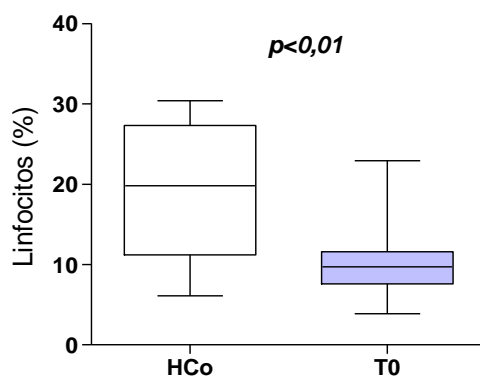


Figura 16: Porcentaje de Linfocitos de pacientes con TB al momento del diagnóstico y controles sanos. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** pacientes al momento del diagnóstico.

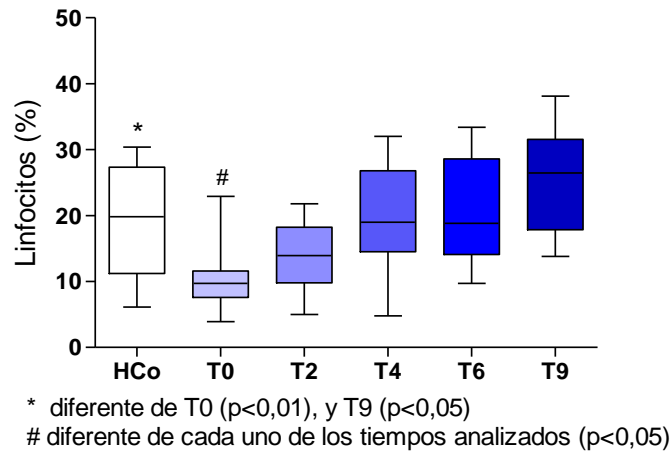


Figura 17: Porcentaje de Linfocitos de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos. **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

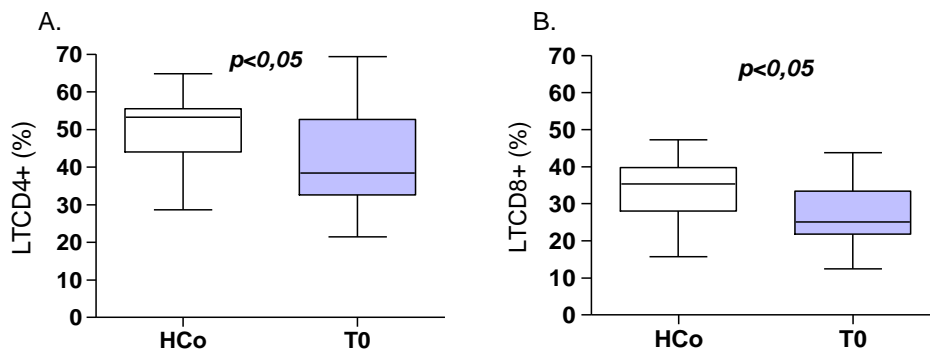


Figura 18: Porcentaje de Linfocitos TCD4+ (A) y TCD8+ (B) de pacientes con TB al momento del diagnóstico y controles sanos. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** pacientes al momento del diagnóstico.

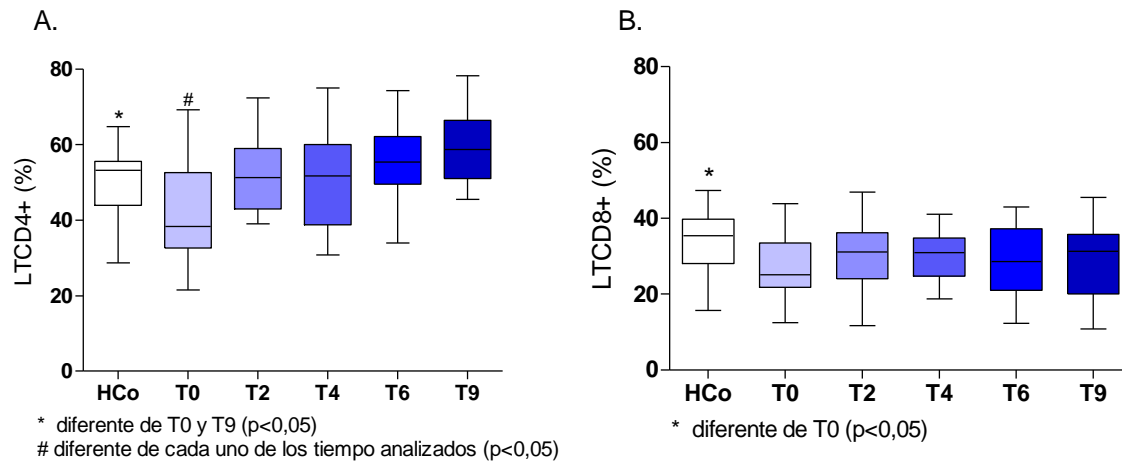


Figura 19: Porcentaje de Linfocitos TCD4+ (A) y TCD8+ (B) de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

Las células T CD4+CD25+FoxP3+ (T-reg) juegan un papel fundamental en la regulación intrínseca de la RI y en la homeostasis del sistema inmune. Su correcto accionar frente a la infección por *Mtb* evitaría caer en situaciones inmunopatológicas o de persistencia del patógeno. En la Figura 20 se muestran los datos obtenidos, mediante citometría para una muestra representativa de un paciente al momento del diagnóstico. Al comparar los porcentajes de las células T-reg en muestras de sangre de pacientes al T0, se observó que estos presentaban un incremento en el porcentaje de estas células respecto de los controles (Figura 21 A). Como puede verse en la Figura 21 B al separar a los pacientes según el grado de compromiso pulmonar, fue el grupo de moderados quien presentó los mayores porcentajes de células T-reg y el único que difirió de los controles (p<0,05). En aquellos pacientes que completaron el estudio y pudo cuantificarse el porcentaje de T-reg, también se observó un aumento en los valores de estas células al T0 (Figura 22). Este incremento fue aún mayor al segundo y cuarto mes de tratamiento específico, respecto de los controles y del momento del diagnóstico, obteniéndose al T4 los mayores valores relativos. Tres meses luego de finalizado el tratamiento, los

porcentajes de las T-reg disminuyeron dejando de diferir de los presentados por los HCo (Figura 23).

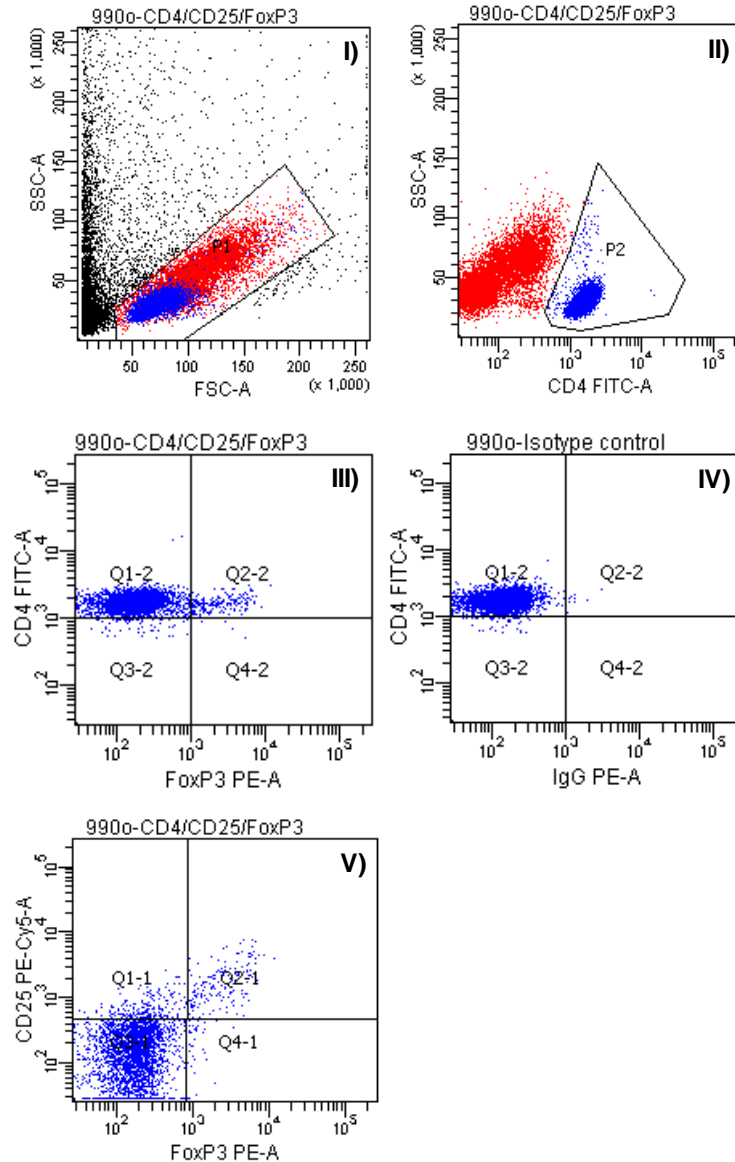


Figura 20: Esquema del análisis por citometría de una muestra de paciente representativa. I) FSC y SSC para identificar células mononucleares, II) células CD4+ dentro de la región de linfocitos, III) se determinaron las células FoxP3+ dentro de la región CD4+ seleccionada en el punto II, IV) control de isotipo de la misma muestra, V) control adicional para asegurar que la población CD4+FoxP3+ seleccionada es también CD25^{high}.

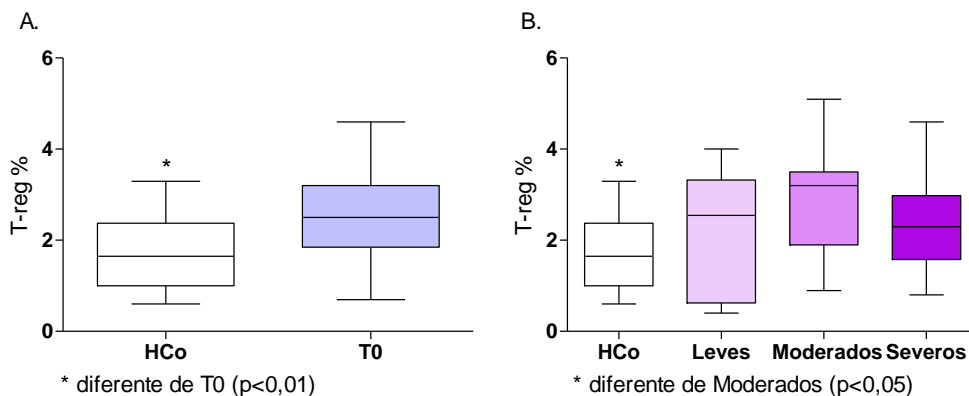


Figura 21: Porcentaje de células T CD4+ FoxP3+ (T-reg) de pacientes con TB al momento del diagnóstico. Comparación de la frecuencia de las células T-reg de pacientes con TB al momento del diagnóstico (n=41) y controles sanos (A), y según el grado de compromiso pulmonar de los pacientes (Leves n=7, Moderados n=16 y Severos n=18) (B). Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo**: controles sanos; **T0**: pacientes al momento del diagnóstico.

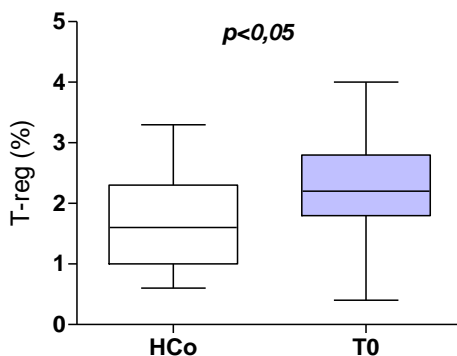


Figura 22: Porcentaje de células T CD4+ FoxP3+ (T-reg) de pacientes con TB al momento del diagnóstico y controles sanos. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo**: controles sanos; **T0**: pacientes al momento del diagnóstico (n=20).

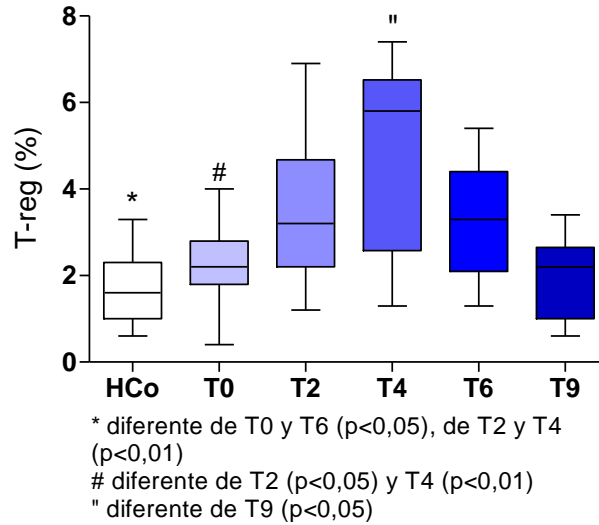


Figura 23: Porcentaje de células T CD4+ FoxP3+ (T-reg) de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico (n=20); **T2** (n=18), **T4** (n=16) y **T6** (n=17): 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento (n=17).

5-4 Mediadores inmunológicos en plasma de pacientes con TB durante el tratamiento específico

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de la concentración plasmática de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4, IL-17, IL-10, TGF- β y de la CRP. El IFN- γ es una citocina fundamental para el control de la infección con *Mtb*, favorece la presentación antigénica y la diferenciación de los linfocitos TCD4+ vírgenes en la subpoblación Th1, y juega un rol clave en la activación de los M Φ . En los pacientes con TB, las concentraciones de esta citocina se encontraron aumentadas al T0 respecto de los controles ($p < 0,05$) y comenzaron a disminuir durante el tratamiento específico alcanzando niveles similares al grupo control a partir del T6 (Figura 24 A). Al momento del diagnóstico, los niveles de IFN- γ se encontraron asociados negativamente con el IMC ($r = -0,55$; $p < 0,05$) y con los linfocitos TCD4+ ($r = -0,54$; $p < 0,05$). A su vez, a los dos meses de tratamiento las concentraciones de este mediador se correlacionaron positivamente con los porcentajes

de las células Treg ($r=0,61$; $p<0,05$; $n=18$); sin embargo, al T4 la asociación entre ellas fue negativa ($r=-0,79$; $p<0,02$; $n=16$), si bien los valores de ambas variables aún permanecían elevados.

En cuanto a la IL-6, los niveles de esta citocina en circulación son muy bajos o indetectables en condiciones fisiológicas y aumentan dramáticamente en respuesta a condiciones inflamatorias, frecuentemente relacionadas con la respuesta de fase aguda. Es una citocina con funciones pleiotrópicas que regula múltiples procesos biológicos los cuales incluyen el desarrollo de la respuesta de fase aguda, la respuesta inmune y la inflamación. En nuestros pacientes la IL-6 se encontró muy aumentada al T0 difiriendo significativamente de los controles ($p<0,01$). A partir del segundo mes de tratamiento específico los niveles de esta citocina comenzaron a disminuir, alcanzando al T6 concentraciones semejantes a la de los HCo (Figura 24 B). Los valores elevados de este mediador al momento del diagnóstico, se asociaron negativamente con el IMC ($r=-0,65$; $p<0,03$; $n=17$) y la respuesta linfoproliferativa ($r=-0,90$; $p<0,01$; $n=17$), y positivamente con los niveles de IFN- γ ($r=0,80$; $p<0,02$; $n=17$), manteniéndose esta última correlación significativa al T2 ($r=0,55$; $p<0,05$; $n=17$).

Respecto de la CRP, una proteína de fase aguda cuyos niveles aumentan durante procesos inflamatorios y que está asociada a incrementos de IL-6, se observó que los pacientes presentaban niveles plasmáticos elevados de este mediador solo al T0 ($p<0,01$) en comparación con los valores obtenidos en los controles (Figura 24 C). Como era de esperarse IL-6 se asoció positivamente con este mediador ($r=0,75$; $p<0,02$; $n=17$).

En el caso del TGF- β , citocina inmunomoduladora que tiene la capacidad de suprimir la inmunidad celular, el grupo de TB difirió de los controles sólo al momento del diagnóstico ($p<0,05$) presentando niveles elevados de esta citocina (Figura 24 D). Con el inicio del tratamiento específico estos valores disminuyeron alcanzando concentraciones similares a la de los HCo (Figura 24 D).

Al analizar los niveles plasmáticos del TNF- α , citocina que actúa en sinergia con el IFN- γ , no obtuvimos valores detectables en ninguno de los grupos bajo estudio. Lo mismo

ocurrió para la IL-2, IL-4 e IL-17, citocinas características de los patrones Th1, Th2 y Th17 respectivamente, y para la citocina antiinflamatoria IL-10.

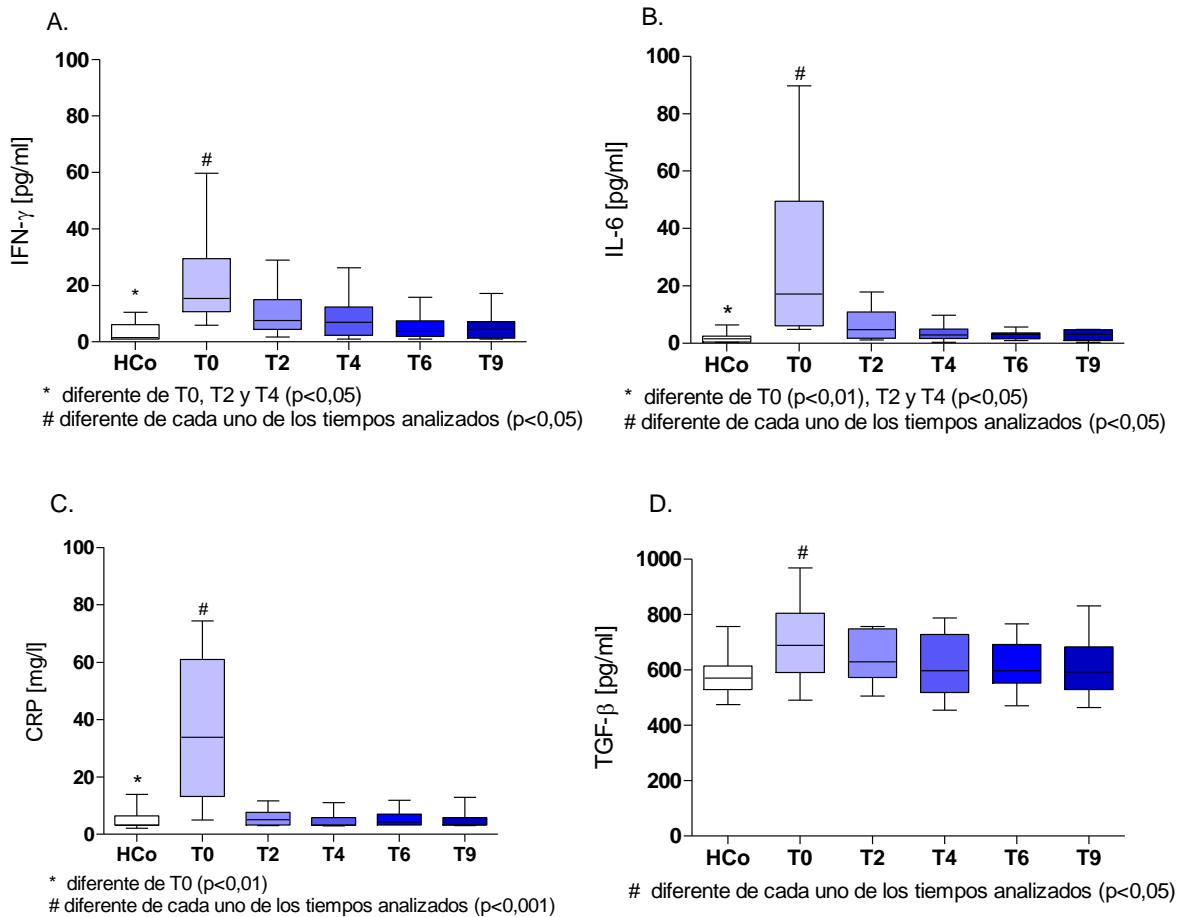


Figura 24: Niveles plasmáticos de mediadores pro- y antiinflamatorios en pacientes con TB durante el tratamiento específico. IFN- γ (A), IL-6 (B), proteína C reactiva (C) y TGF- β (D). Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento. Se muestran los resultados de IFN- γ e IL-6 cuantificados por enzimoimmunoanálisis, de alta sensibilidad para IL-6 (HCo, n=20; TB, n=17). TGF- β (HCo, n=16; TB, n=14).

5-5 Modificaciones en los niveles de Cortisol, DHEA y DHEA-S en pacientes con TB durante el tratamiento específico

En continuidad con los objetivos, también se analizaron los niveles plasmáticos circulantes de esteroides adrenales de relevancia: cortisol, DHEA Y DHEA-S. El Cortisol presenta funciones inmunomoduladoras importantes, regula una amplia variedad de funciones de las células inmunes, inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias a la vez que favorece la producción de las antiinflamatorias. Al analizar las concentraciones de este esteroide en nuestros pacientes, observamos que el grupo con TB mostró al T0 un marcado incremento en los niveles de cortisol respecto del grupo control ($p < 0,05$), manteniéndose estos elevados durante todo el tratamiento específico. Al T9 las concentraciones del esteroide disminuyeron, alcanzando valores similares a los presentados por los HCo (Figura 25 A). Al momento del diagnóstico, se observó que los niveles plasmáticos de IL-6 se correlacionaban positivamente con los del cortisol ($r = 0,54$; $p < 0,05$; $n = 17$), mientras que al T4 la asociación entre estos mediadores fue negativa ($r = -0,8$; $p < 0,01$; $n = 17$).

A partir de estos resultados se contrastaron los niveles de cortisol teniendo en cuenta la severidad de la enfermedad. Como los voluntarios diagnosticados con TB leve fueron solamente dos, estos se excluyeron del análisis. En la Figura 26 correspondiente al T0, se ve un aumento significativo de cortisol en los pacientes con TB moderada y severa, con valores levemente superiores en este último grupo. Durante el tratamiento específico los niveles de este esteroide se mantuvieron aumentados en el grupo de moderados, dejando de diferir de los HCo al T9; mientras que los pacientes con la forma severa de la enfermedad presentaron valores elevados de cortisol sólo hasta el T2, alcanzando concentraciones similares a los controles a partir del T4 (Figura 27).

Los niveles de DHEA (Figura 25 B), andrógeno activo a nivel tisular que favorece el perfil Th1, se observaron disminuidos respecto de los HCo al momento del diagnóstico ($p < 0,001$). El marcado descenso en las concentraciones de la hormona además se vio asociado con el grado de compromiso pulmonar ($r = -0,49$; $p < 0,03$), presentando los valores

más bajos los voluntarios con la forma severa de la enfermedad (Figura 28). Durante el tratamiento específico las concentraciones de DHEA (Figura 25 B) aumentaron significativamente alcanzando valores semejantes a los del grupo control; sin embargo, al T9 los niveles fueron inferiores a los de los HCo ($p < 0,05$). Cuando se analizaron las concentraciones plasmáticas de DHEA por severidad, durante el tratamiento específico y una vez finalizado el mismo, se observó que los pacientes con TB moderada presentaban un comportamiento similar al mencionado previamente (Figura 29 A). Mientras que los severos si bien incrementaron significativamente sus niveles de DHEA a partir de T2 (T0 diferente de T2, T4 y T6 $p < 0,05$), estos fueron siempre inferiores al de los controles (Figura 29 B). Cabe mencionar que el porcentaje de incremento del esteroide en ambos grupos fue similar [Por ejemplo al T2, moderados: 82,8% (49,9-129,4) $n=13$; severos: 103,3% (45,3-189,0) $n=9$]. Cuando se analizó la asociación entre los niveles plasmáticos de DHEA con distintos parámetros inmunoendócrinos, se constató correlación negativa y significativa con las concentraciones plasmáticas de IL-6, tanto al momento del diagnóstico ($r=-0,62$; $p < 0,03$; $n=17$), como a los dos meses de tratamiento ($r=-0,40$; $p < 0,05$; $n=17$).

Por su parte la DHEA-S, precursor inactivo de la DHEA, presentó valores plasmáticos por debajo de aquellos observados en los HCo al momento del diagnóstico y durante todo el tratamiento específico; y sólo tras la finalización del tratamiento las concentraciones fueron similares a las del grupo control (Figura 25 C), sin evidenciarse diferencias relacionadas con el grado de compromiso pulmonar en los tiempos estudiados (resultados no presentados). Como era de esperar y al igual que lo observado en los controles ($r=0,77$; $p < 0,01$), en todos los tiempos analizados los pacientes con TB mostraron correlación significativa y positiva entre las concentraciones de DHEA y DHEA-S (como ejemplo, T2: $r=0,8$; $p < 0,001$).

En similitud con trabajos previos [255, 254], el incremento de las concentraciones de cortisol y el descenso de las de DHEA y DHEA-S, condujeron a aumentos significativos de las relaciones Cortisol/DHEA y Cortisol/DHEA-S (Figura 25 D y E) en los pacientes al momento del diagnóstico, respecto de los HCo. La relación Cortisol/DHEA se asoció

positivamente con el grado de compromiso pulmonar de la TB al T0 ($r=0,65$; $p<0,02$) y al T2 ($r= 0,57$; $p<0,02$). Al momento del diagnóstico tanto los pacientes con TB moderada como severa presentaron valores elevados de la relación Cortisol/DHEA, más aún en los del último grupo que difirieron de los moderados (Figura 30 A). Luego de dos meses de tratamiento sólo los pacientes con TB severa mantuvieron esta relación incrementada (Figura 30 B) alcanzando valores semejantes al grupo control a partir del cuarto mes de tratamiento específico (Figura 31).

En cuanto a la relación Cortisol/DHEA-S, los valores se mantuvieron elevados durante el tratamiento antibacilar, disminuyendo a los tres meses de finalizado el mismo (Figura 25 E).

Además, se analizaron las correlaciones entre los esteroides del eje HPA. En los controles los niveles plasmáticos de cortisol y DHEA se vieron asociados positivamente ($r=0,63$; $p<0,04$), mientras que en los pacientes con TB esta asociación fue significativa sólo a los tres meses luego de finalizado el tratamiento ($r=0,55$; $p <0,05$).

Con respecto a las poblaciones linfocitarias, la correlación entre los niveles de cortisol y el porcentaje de LTCD4+ fue inversa tanto al T0 ($r=-0,54$; $p<0,05$), como al T2 ($r=-0,50$; $p<0,05$). En lo concerniente a las células T-reg, sólo se observó asociación negativa en el grupo de pacientes con cortisol ($r=-0,61$; $p<0,04$; $n=16$) y DHEA ($r=-0,74$; $p<0,01$; $n=16$) al T4.

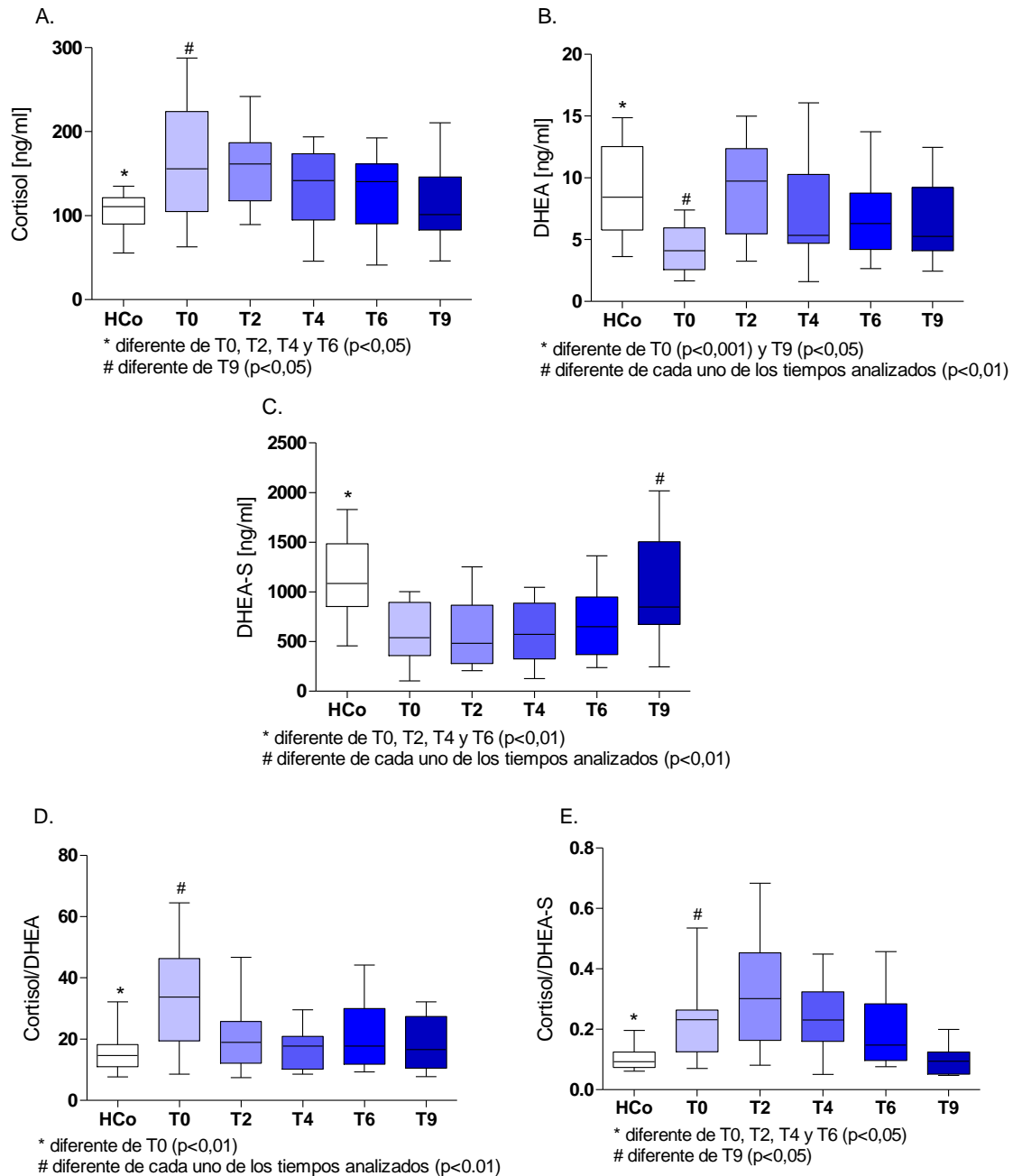


Figura 25: Niveles plasmáticos de Cortisol (A), DHEA (B), DHEAS (C) y relaciones Cortisol/DHEA (D) y Cortisol/DHEAS (E) en pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos. **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

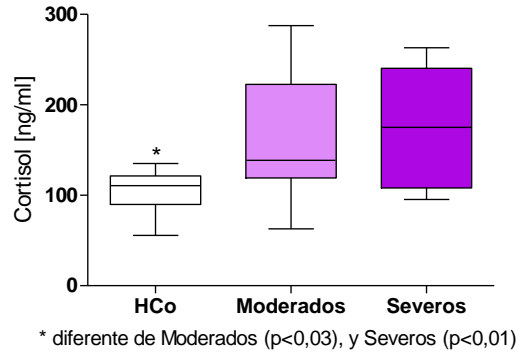


Figura 26: Niveles plasmáticos de Cortisol de pacientes con TB moderada y severa al momento del diagnóstico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos.

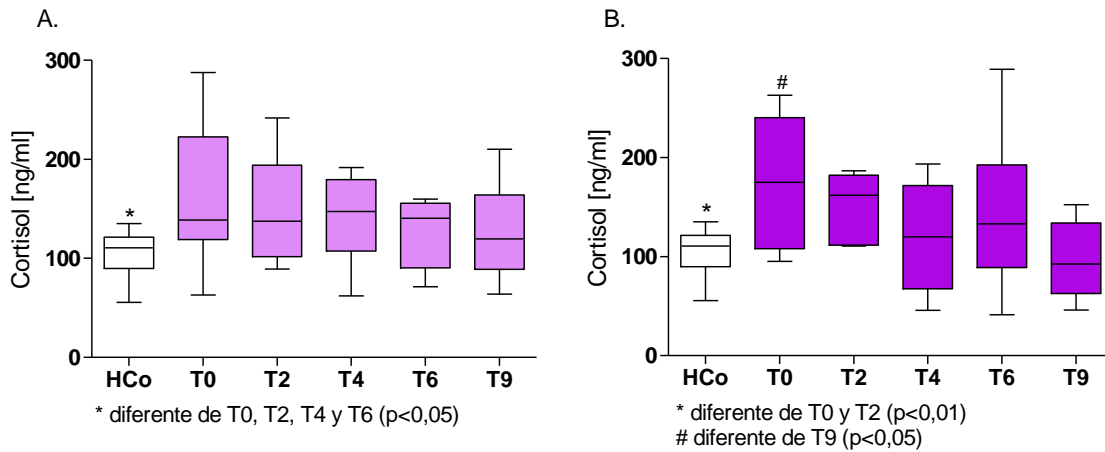


Figura 27: Niveles plasmáticos de Cortisol en pacientes con TB moderada (A) y severa (B) durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

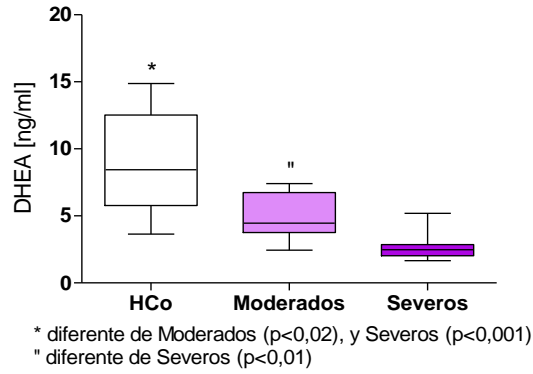


Figura 28: Niveles plasmáticos de DHEA de pacientes con TB moderada y severa al momento del diagnóstico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos.

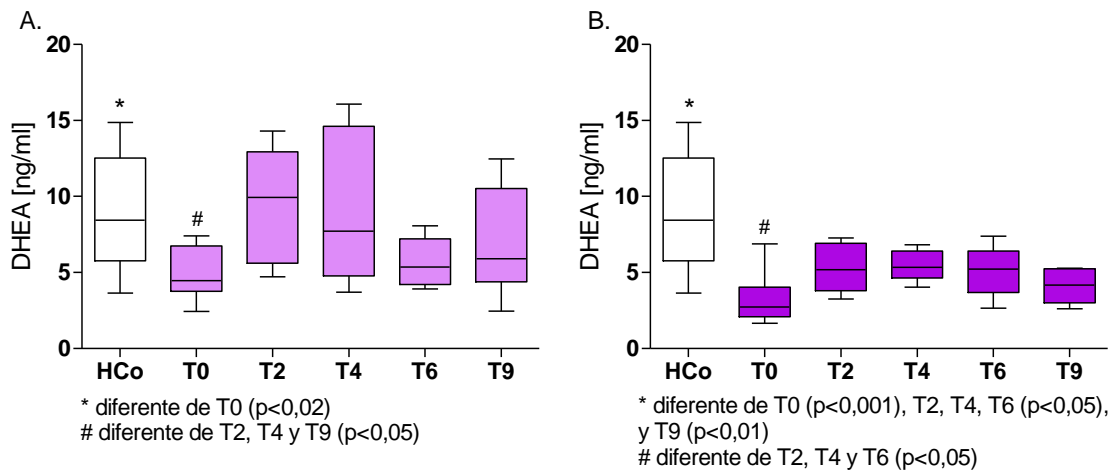


Figura 29: Niveles plasmáticos de DHEA en pacientes con TB moderada (A) y severa (B) durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

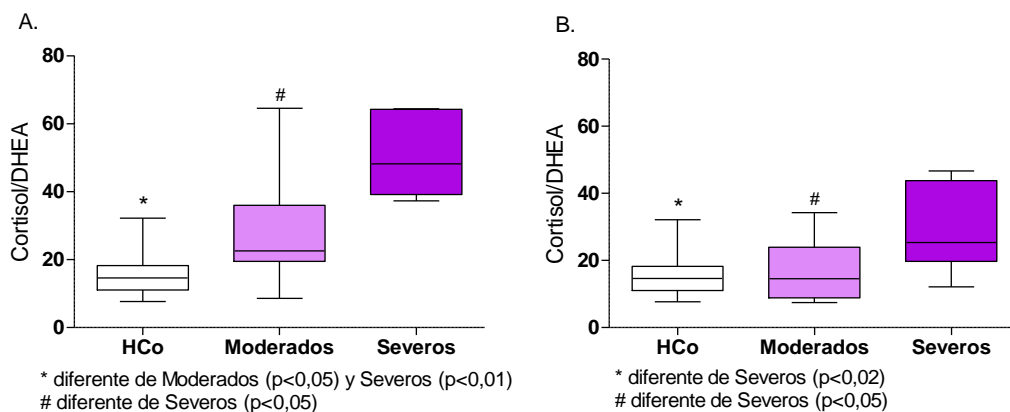


Figura 30: Relación Cortisol/DHEA de pacientes con TB moderada y severa al momento del diagnóstico (A) y a los dos meses de tratamiento específico (B). Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos.

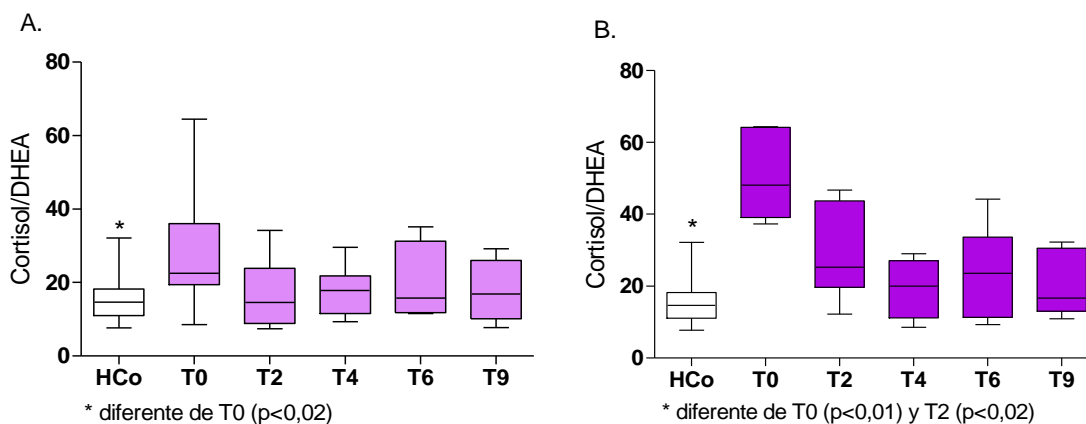


Figura 31: Relación Cortisol/DHEA de pacientes con TB moderada (A) y severa (B). Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

5-6 Determinaciones séricas de Cortisol y DHEA-S

Hasta el momento todos los estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre la modulación del eje HPA en TB se efectuaron cuantificando los niveles plasmáticos de cortisol, DHEA y DHEA-S por EIA. De determinarse que la medición de estas hormonas y sus respectivas relaciones, podrían utilizarse como posibles marcadores de rutina de

evolución de la TB, nos enfrentaríamos con el inconveniente de que en el laboratorio clínico en general se utiliza la electroquimioluminiscencia -EQ- como método de cuantificación. Los reactivos existentes en el mercado permiten la determinación sérica, por la mencionada técnica, de Cortisol y DHEA-S y no de la forma activa DHEA. Ante estos hechos y frente a la potencial transferencia de resultados a la práctica médica, se torna imprescindible que para cada paciente se cuantifiquen además de los niveles plasmáticos de las tres hormonas por EIA, las concentraciones séricas de cortisol y DHEA-S por EQ, con el fin de determinar si los resultados obtenidos por ambas técnicas son o no comparables.

Al analizar las concentraciones séricas de cortisol y DHEA-S por EQ (Figura 32 A y B respectivamente) los resultados fueron similares a aquellos hallados en el plasma de los voluntarios utilizando la técnica de EIA. El cortisol se vio aumentado al T0 y T2 respecto de los HCo, dejando de diferir a partir de los cuatro meses de tratamiento específico. Mientras que los niveles de DHEA-S se ubicaron por debajo de los valores presentados por los HCo al diagnóstico, y durante todo el tratamiento específico. Un comportamiento similar presentó la relación Cortisol/DHEA-S, que se vio disminuida en todos los tiempos bajo estudio y sólo dejó de diferir de los HCo al T9 (Figura 32 C).

Para corroborar el grado de asociación entre las concentraciones de las hormonas cuantificadas por ambas técnicas, se analizaron en conjunto los resultados correspondientes a voluntarios sanos y pacientes al T0. Observándose una correlación significativa y positiva tanto para cortisol ($r=0,96$; $n=39$; $p<0,001$), como para DHEA-S ($r=0,89$; $n=45$; $p<0,001$). (Figura 33 A y B). Reflejando reciprocidad entre los valores obtenidos por ambos métodos. Estas asociaciones también se constataron en las muestras obtenidas de los pacientes para cada uno de los tiempos estudiados (Por ejemplo, T2: $r=0,78$; $p<0,001$).

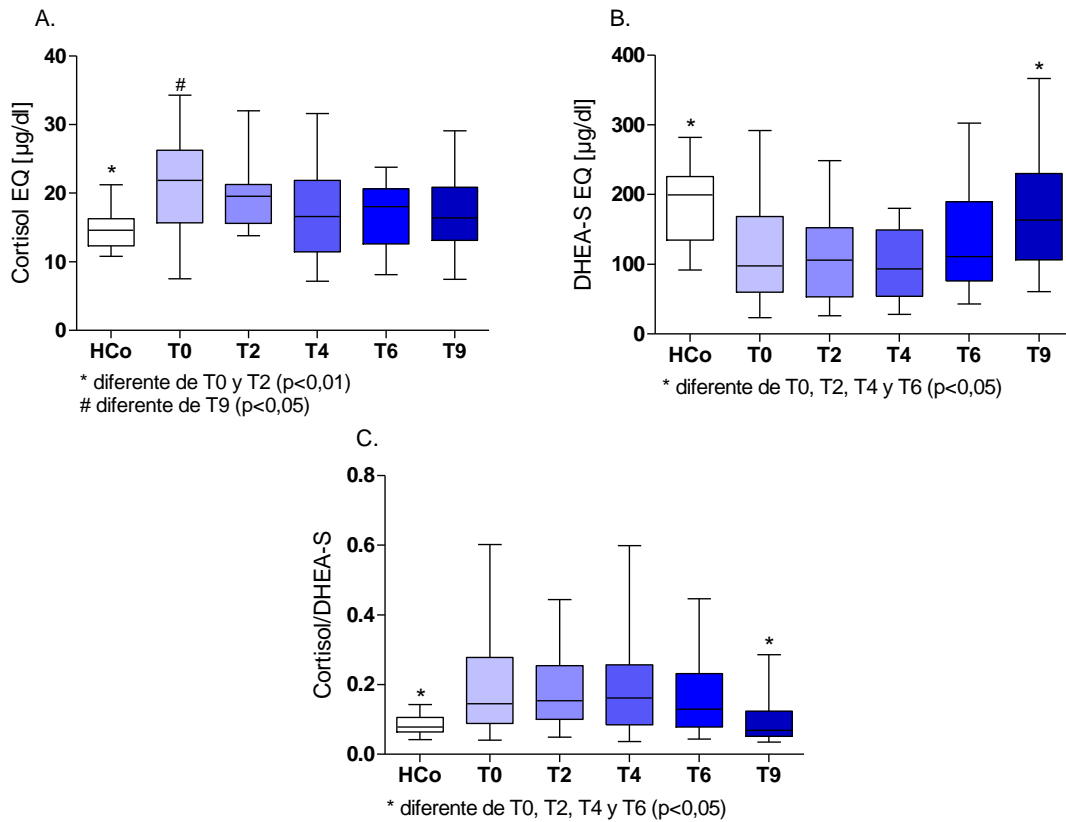


Figura 32: Niveles séricos de Cortisol (A), DHEA-S (B) y relación Cortisol/DHEA-S (C) de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos; **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento.

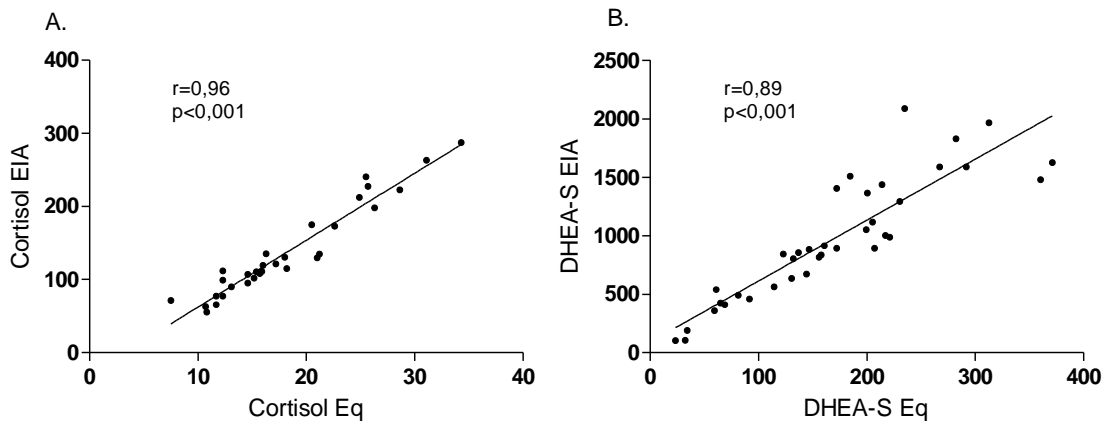


Figura 33: Correlación de Spearman entre las concentraciones plasmáticas (EIA: enzimoimmunoanálisis) y séricas (Eq: electroquimioluminiscencia) de Cortisol (A) y DHEA-S (B) de pacientes con TB y controles sanos. Coeficiente de correlación de Pearson.

5-7 Niveles relativos de expresión de los ARNm de GR α , GR β y de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en CMP de pacientes con TB pulmonar

Como se expresó anteriormente (ver introducción, ítem 1-3.2.1), la función biológica del cortisol depende de su interacción con el receptor para glucocorticoides formado por el dímero GR α , mientras que el heterodímero GR α -GR β actuaría como dominante negativo. En trabajos previos del grupo se evidenció que los pacientes con TB severa presentaban cierto grado de resistencia a la acción de los GC. Lo que nos indujo a analizar el nivel de expresión de ambas isoformas del receptor y de las enzimas responsables de la interconversión Cortisol-Cortisona (11 β HSD1 y 11 β HSD2) en CMP de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Así como su relación con la respuesta inmunoendocrina.

En la Tabla 6 se muestran los niveles relativos de expresión de las variables estudiadas. En los pacientes los niveles del transcripto GR α fueron similares a los presentados por el grupo control, excepto al cuarto mes de tratamiento donde se observó un incremento significativo respecto del T0 ($p < 0,05$). En cambio los niveles de GR β , aumentados al diagnóstico, descendieron durante el tratamiento a valores similares al de los HCo, difiriendo de aquellos obtenidos al T0.

La expresión de ambos transcriptos se vio asociada positivamente en las CMP provenientes de controles sanos ($r = 0,73$; $p < 0,01$), mientras que en los pacientes, esta correlación sólo fue evidente luego de tres meses de finalizado el tratamiento ($r = 0,50$; $p < 0,05$). En el grupo de pacientes, se constató que los niveles del transcripto GR α se correlacionaban inversamente con las concentraciones circulantes de IL-6 tanto al diagnóstico ($r = -0,62$; $p < 0,04$; $n = 17$) como luego de dos meses de tratamiento ($r = -0,56$; $p < 0,05$; $n = 17$). En T2 los niveles de expresión del transcripto GR α también se correlacionaron negativamente con los de otra citocina proinflamatoria, el IFN- γ ($r = -0,63$; $p < 0,03$).

Al analizar la relación entre la expresión de ambos transcriptos (Figura 34), la misma se encontró disminuida sólo al momento del diagnóstico respecto del grupo

control. Ello apunta a que la resistencia al cortisol observada al T0 se perdería en los pacientes sometidos al tratamiento antibacilar.

En cuanto a la cuantificación del transcripto de la enzima 11 β HSD2, este no se expresó en la mayoría de las muestras (aún con las condiciones de reacción optimizadas). En cambio, el transcripto de la enzima 11 β HSD1 pudo cuantificarse exitosamente. Al comparar los niveles del mismo en las CMP de ambos grupos de estudio, se observó un aumento significativo al T0 respecto de los niveles de expresión tanto en T2, T4, T6 y T9, como en HCo (Tabla 6). Además, en este último grupo, la expresión del transcripto de 11 β HSD1 se correlacionó positivamente con la de GR α ($r=0,57$; $p<0,04$),

	HCo (n=26)	TB (n=24)				
		T0	T2	T4	T6	T9
GR α	29,5 (22,6-31,1)	25,6 (24,4-36,1)	32,3 (25,6-35,4)	32,7 # (29,5-37,6)	27,9 (23,8-35,6)	25,7 (23,3-31,8)
GR β	0,4 (0,4-1,0)	1,7 * (1,0-2,2)	0,6 # (0,4-1,3)	1,3 (0,4-2,0)	0,6 # (0,4-1,6)	0,4 # (0,4-1,1)
11 β HSD1	0,5 (0,4-0,8)	0,7 * (0,6-1,1)	0,5 # (0,3-0,8)	0,6 # (0,2-0,8)	0,5 # (0,2-0,7)	0,5 # (0,1-0,7)

Tabla 6: Niveles relativos de expresión de los ARNm de los receptores para glucocorticoides (GR) GR α , GR β y de la enzima 11 β HSD1 de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Los datos se expresan como mediana (línea) y rango intercuartil. **HCo:** controles sanos. **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento. **UA:** Unidades Arbitrarias, 1 UA =1 μ g de ARN estándar utilizado en la síntesis del ADNc de las curvas relativas de expresión. **11 β HSD1:** 11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 1. * $p<0,05$ diferente de HCo; # $p<0,05$ diferente de TB T0.

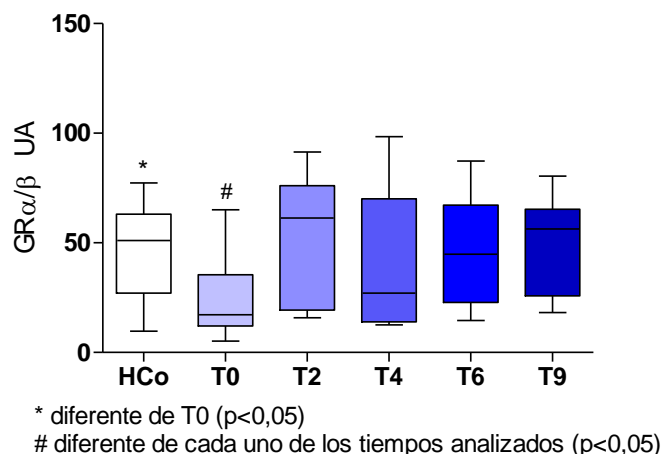


Figura 34: Niveles relativos de expresión de la relación de los ARNm de los receptores para glucocorticoides (GR) GR α y GR β de pacientes con TB durante el tratamiento específico. Las cajas representan mediana (línea) y rango intercuartil, con valores máximos y mínimos. **HCo:** controles sanos. **T0:** momento del diagnóstico; **T2, T4 y T6:** 2, 4 y 6 meses de iniciado el tratamiento antibacilar; **T9:** tres meses luego de finalizado el tratamiento. **UA:** Unidades Arbitrarias, 1 UA =1 μ g de ARN estándar utilizado en la síntesis del ADNc de las curvas relativas de expresión.

5-8 Análisis multivariado de componentes principales

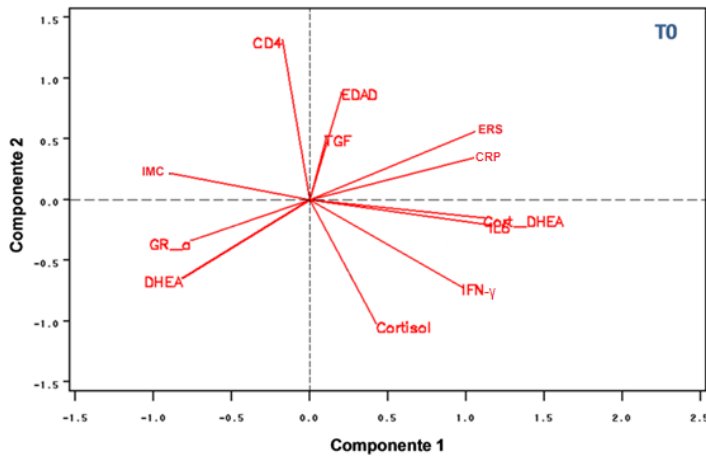
Con el propósito de vislumbrar variables o grupos de variables dentro de las estudiadas que más diferencien a los individuos, se aplicó un análisis multivariado de componentes principales. Las variables incluidas fueron: Edad, IMC, ERS, LTCD4+, IFN- γ , IL-6, CRP, TGF- β , Cortisol, DHEA, relación Cortisol/DHEA, y GR- α . Es necesario informar que el número de variables incluidas está en estrecha relación con el total de voluntarios enfermos que completaron el estudio. Además estas variables debieron encontrarse cuantificadas en todos los tiempos analizados. Esta es la razón por la cual el número muestral se redujo a 14.

A continuación se presentan los gráficos biplot obtenidos del análisis multivariado de componentes principales. En ellos se resume la información de las dos primeras componentes que explican aproximadamente el 65-70% de la varianza observada para las variables seleccionadas, en cada uno de los tiempos bajo estudio.

En cada gráfico se visualiza como se agrupan las variables. Aquellas que se localizan conformando ángulos inferiores a 90° y a mayor distancia del origen, deberían ser las que presentan mayor asociación positiva. Mientras que las que se localizan conformando ángulos mayores a 90° y ubicadas distante del origen se encontrarán inversamente asociadas. Es de notar que la separación en cuadrantes no interviene en la interpretación del gráfico.

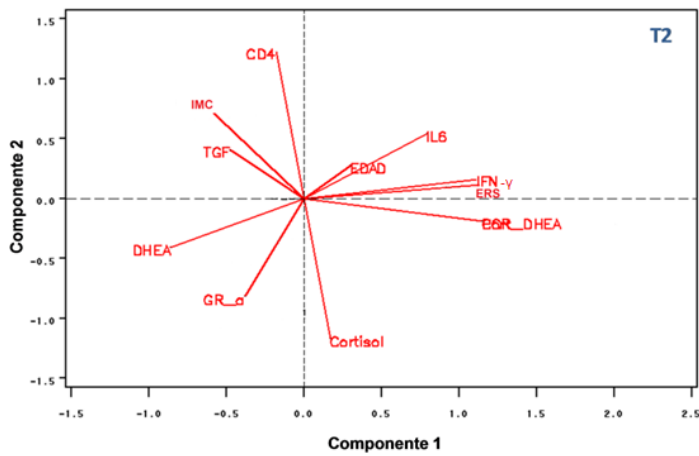
Como se pone de manifiesto en la Figura 35 A, al momento del diagnóstico las variables relacionadas con la respuesta proinflamatoria se encuentran positivamente asociadas entre sí y con la relación Cortisol/DHEA, mientras que se correlacionan negativamente con el IMC (Tabla figura 35 A). Si bien las concentraciones plasmáticas de DHEA se encuentran marcadamente disminuidas, se observa una correlación negativa entre los valores de esta hormona y los niveles de CRP y ESR. Con el inicio del tratamiento específico se pierde la correlación entre los parámetros proinflamatorios (IL-6, CRP, ESR, IFN- γ), la relación Cortisol/DHEA y el IMC (Tabla figura 35 B). Llamativamente la relación Cortisol/DHEA continúa asociada con algunos de los parámetros proinflamatorios al T2 y T4 (Tabla figura 35 B y C). Al sexto mes de tratamiento específico sólo se vio asociación positiva entre la velocidad de ESR y los mediadores proinflamatorios CRP e IL-6 (Tabla figura 35 D). La correlación con esta última citocina se mantuvo al T9, donde también se observó una asociación positiva entre CRP y la relación Cortisol/DHEA (Tabla figura 35 E). Además a este tiempo, donde el voluntario cuenta con el alta médica desde al menos dos meses, se evidenció correlación positiva entre DHEA y cortisol (Tabla figura 35 E) tal como se observó en los controles sanos ($r=0,63$; $p<0,04$; ver página 99).

A.



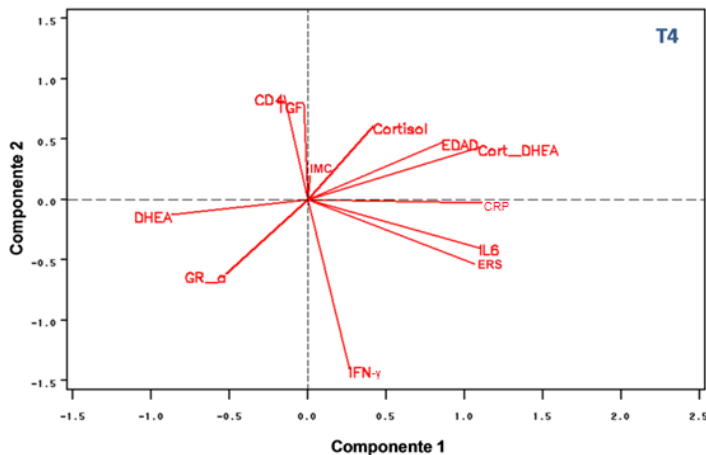
Correlaciones	T0	p
IL-6 vs. CRP	r= 0,80	<0,01
IL-6 vs. ERS	r= 0,82	<0,01
IL-6 vs. IFN- γ	r= 0,82	<0,01
IL-6 vs. Cortisol/DHEA	r= 0,87	<0,01
CRP vs. ERS	r= 0,81	<0,01
CRP vs. IFN- γ	r= 0,59	<0,05
Cortisol/DHEA vs. CRP	r= 0,71	<0,01
Cortisol/DHEA vs. IFN- γ	r= 0,78	<0,01
Cortisol/DHEA vs. ERS	r= 0,73	<0,01
DHEA vs. CRP	r= -0,63	<0,05
DHEA vs. ERS	r= -0,68	<0,05
IL-6 vs. IMC	r= -0,59	<0,05
CRP vs. IMC	r= -0,56	<0,05
IFN- γ vs. IMC	r= -0,58	<0,05
Cortisol/DHEA vs. IMC	r= -0,59	<0,05

B.



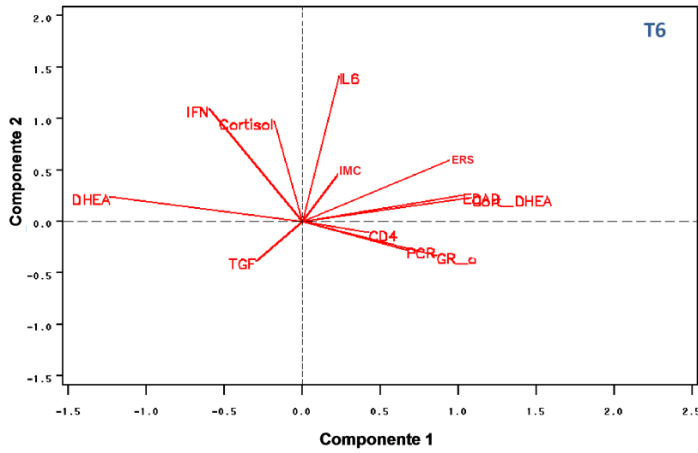
Correlaciones	T2	p
IL-6 vs. IFN- γ	r= 0,68	<0,05
CRP vs. ERS	r= 0,91	<0,01
CRP vs. IFN- γ	r= 0,82	<0,01
IFN- γ vs. ERS	r= 0,74	<0,01
Cortisol/DHEA vs. CRP	r= 0,89	<0,01
Cortisol/DHEA vs. IFN- γ	r= 0,67	<0,05
Cortisol/DHEA vs. ERS	r= 0,82	<0,01

C.



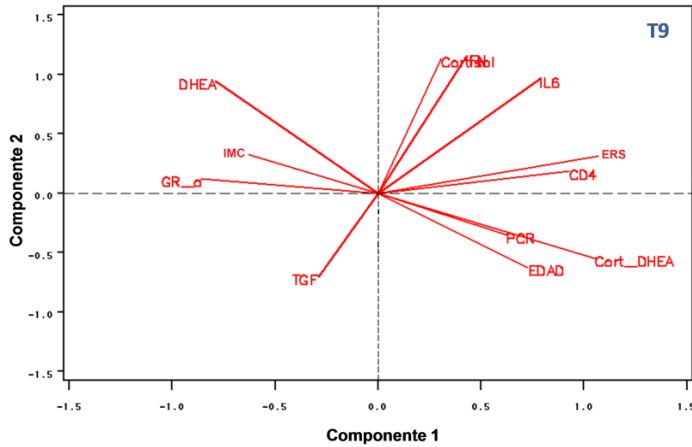
Correlaciones	T4	p
IL-6 vs. CRP	r= 0,76	<0,01
IL-6 vs. ERS	r= 0,66	<0,05
PCR vs. ERS	r= 0,76	<0,01
Cortisol/DHEA vs. CRP	r= 0,64	<0,05
Cortisol/DHEA vs. ERS	r= 0,58	<0,05

D.



Correlaciones	T6	p
IL-6 vs. ERS	r= 0,57	<0,05
CRP vs. ERS	r= 0,65	<0,05

E.



Correlaciones	T9	p
IL-6 vs. ERS	r= 0,68	<0,01
Cortisol/DHEA vs. CRP	r= 0,69	<0,01
DHEA vs. Cortisol	r= 0,56	<0,05

Figura 35: Análisis multivariado de componentes principales y correlaciones entre parámetros clínicos, citocinas, hormonas y transcritos de pacientes con TB durante el tratamiento específico. T0: momento del diagnóstico (A); T2, T4 y T6: 2 (B), 4 (C) y 6 (D) meses de iniciado el tratamiento antibacilar; T9: tres meses luego de finalizado el tratamiento (E). ERS: velocidad de eritrosedimentación; IMC: índice de masa corporal. Coeficiente de correlación de Pearson.

Discusión

6- Discusión

El control de un proceso infeccioso dependerá del tipo y de la magnitud de la respuesta defensiva que monte el hospedero, la cual involucra cambios en las funciones nerviosas, endocrinas, inmunes y metabólicas destinadas a eliminar o inhibir el crecimiento del patógeno. Estos cambios adaptativos serían beneficiosos para el hospedero al menos durante la fase inicial de la infección, pero pueden llegar a ser perjudiciales si se prolongan, por ejemplo por persistencia del patógeno como en el caso de la TB [271, 272]. Algunos de los mediadores inmunes liberados durante las infecciones inducirían modificaciones neuroendócrinas importantes que resultan en marcados cambios en la homeostasis del hospedero y en los mecanismos de defensa, dando lugar a distintas manifestaciones clínicas, por ejemplo, significativas pérdidas de peso, como se evidencia en muchas enfermedades crónicas incluida la TB [273, 274, 275, 276].

Los enfermos de TB al momento de su incorporación al estudio presentaron una marcada disminución en el IMC [274], la cual podría estar relacionada con la excesiva respuesta proinflamatoria, que además de aumentar la demanda energética influiría sobre el apetito, con la consiguiente pérdida de peso [277]. En consonancia con lo expresado se observó una correlación inversa y significativa entre los valores del IMC y las concentraciones plasmáticas de los mediadores proinflamatorios IL-6 ($r = -0,65$; $p < 0,03$; $n = 17$); CRP ($r = -0,56$; $p < 0,05$; $n = 14$) e IFN- γ ($r = -0,55$; $p < 0,05$).

No puede dejar de mencionarse que la malnutrición influye en el desarrollo de la TB [277]. Estudios en humanos y animales demostraron que la predisposición a la progresión de la infección hacia la forma activa de la enfermedad, podría relacionarse con deficiencias de macro- y micronutrientes capaces de inducir un deterioro de la inmunidad celular (por ejemplo alterando la función linfocitaria y de los fagocitos) [278] y cambios en el balance de las citocinas pro- y antiinflamatorias, afectando de este modo la defensa del hospedero contra el *Mtb* [276, 279, 280]. A su vez, el grado de malnutrición del sujeto agravaría las manifestaciones clínicas de la enfermedad [277, 281, 282]. Sin embargo, en nuestros pacientes no se vio asociación entre el IMC y la severidad de la TB pulmonar, lo

que podría atribuirse a que la mayoría de los pacientes presentaron un IMC que si bien fue bajo, no había llegado a los niveles de marcada consunción. En consonancia con este resultado, los parámetros del Laboratorio Clínico aunque presentaron modificaciones respecto de los controles, oscilaron dentro de los valores de referencia provistos por el laboratorio (Tabla 5). Durante el tratamiento contra la TB la mejoría clínica de los pacientes se vio acompañada por un aumento significativo del IMC, el cual se mantuvo por debajo de los valores presentados por el grupo control aún a los tres meses luego de finalizado el mismo. Con respecto al Laboratorio Clínico, no se vieron signos de toxicidad hepática atribuibles al tratamiento, y a partir de T2 los restantes parámetros analizados no difirieron de los valores obtenidos en el grupo control.

El grupo de pacientes presentó al momento del diagnóstico concentraciones eritrocitarias similares a la de los controles, pero con disminución significativa en los niveles de hemoglobina y el porcentaje de hematocrito, diferencias que se pierden con el inicio del tratamiento, estos resultados coincidieron con los observados por otros autores [283]. Sin embargo, no puede dejar de mencionarse que el espectro de variación de los parámetros siempre se mantuvo dentro del rango de los valores de referencia del laboratorio.

Como era de esperarse, al T0, las concentraciones de leucocitos se vieron aumentadas, con un marcado incremento en el porcentaje de PMN, a expensas del observado para los linfocitos. Este efecto podría asociarse al aumento en los niveles de cortisol puesto de manifiesto en los pacientes. Al respecto se conoce que la administración de GC incrementa el número de PMN circulantes promoviendo su egreso de medula ósea hacia el torrente sanguíneo, y de manera simultánea obstaculiza la transmigración de estas células al sitio de la infección al disminuir la expresión de moléculas de adhesión [284, 285, 286]. A su vez las concentraciones elevadas de la hormona reducen los niveles de células T circulantes ya que favorecerían su migración hacia medula ósea y los órganos linfáticos secundarios [225]. Los GC, además, promoverían la apoptosis de los linfocitos T incrementando la expresión de la proteína BIM (*BCL-2 interacting mediator*) [287, 288]. Con respecto a nuestros resultados, el GC

endógeno se mantuvo elevado durante el tratamiento, sin embargo, las concentraciones de PMN y linfocitos a partir de T2 alcanzaron valores similares a los controles; indicando que múltiples factores de la RI estarían interviniendo en este proceso [289, 290].

En los pacientes con TB siempre se observó un aumento significativo en las concentraciones de plaquetas previo al inicio del tratamiento lo que podría atribuirse, entre otros factores, a los elevados niveles plasmáticos de IL-6 [291, 292]. En la clínica los indicadores de respuesta de fase aguda más ampliamente utilizados son la CRP y la ERS (que constituye un marcador indirecto de las concentraciones plasmáticas de proteínas de fase aguda) [293]. Como era de esperarse estos pacientes al T0 mostraron valores aumentados de ambas variables, con marcado descenso de CRP a partir del segundo mes de tratamiento, en cambio la ERS se mantuvo elevada respecto del grupo control aún al T2. Además la ERS se correlacionó positivamente con el grado de severidad de la TB al diagnóstico ($r= 0,50$; $p<0,05$), y como era de esperarse, inversamente con los niveles de albúmina ($r=-0,052$; $p<0,05$), dado que esta proteína se considera un reactante negativo de la respuesta de fase aguda [293].

La RI celular es fundamental para el control de la TB, entre las distintas poblaciones linfocitarias involucradas en esta respuesta los LTCD4+ juegan un rol central. Su importancia se hizo evidente en modelos murinos donde deficiencias en el número o funcionamiento de estas células, en ratones infectados con *Mtb*, se asociaron con un incremento en la carga bacilar y mortalidad de los mismos [294, 295]. Mientras que en humanos, se vio que sujetos HIV+ que sufrían una disminución en el número y funcionamiento de los linfocitos TCD4+ presentaban mayor riesgo a desarrollar la TB [172, 296, 297]. Por su parte, los LTCD8+ también contribuyen a la inmunidad anti-TB y se han encontrado presentes en gran número en el sitio de la infección [298, 299]. Algunos grupos reportaron niveles circulantes bajos sólo de la población TCD4+ en los sujetos con TB pulmonar [300, 301], por su parte Al-Aska y colaboradores observaron una disminución en ambas poblaciones celulares, cuyos valores se recuperaban con el tratamiento específico [302]. En coincidencia con este último estudio, nuestro grupo de pacientes presentó una disminución en el porcentaje de ambas poblaciones linfocitarias respecto de

la evidenciada por los controles, estas diferencias se perdieron con el inicio del tratamiento específico. En concordancia con estos resultados, también se vio disminuida la capacidad funcional linfocitaria al momento del diagnóstico, donde además el índice de estimulación se vio correlacionado positivamente con el porcentaje de linfocitos TCD4+ ($r=0,63$; $p<0,05$). A los dos meses de tratamiento la respuesta blastogénica dejó de diferir de aquella del grupo control. Se han postulado diversas hipótesis acerca de las causas que generarían la disminución de estas poblaciones en la TB, como aumento en los niveles de apoptosis, modificaciones en el *homing*, entre otras [301]. Este efecto podría relacionarse con el desbalance inmunoendócrino presente en los pacientes, ya que además del incremento en la proporción de células T-reg y de citocinas proinflamatorias con capacidad proapoptótica (por ejemplo, IFN- γ) [303], como se ha comentado previamente, las concentraciones elevadas de cortisol afectarían la recirculación, la capacidad funcional y sobrevivencia de los linfocitos [225]. Relativo a lo expresado, al T0 los porcentajes disminuidos de la población TCD4+ se vieron asociados negativamente tanto con los niveles de cortisol ($r=-0,54$; $p<0,05$), como de IFN- γ ($r=-0,54$; $p<0,05$).

La TB se caracteriza por una RI celular exacerbada, con gran liberación de mediadores inflamatorios, que en pos de desembarazarse del patógeno genera importante daño tisular [304]. Es por esto que diversos mecanismos de regulación se activarían para controlar dicha respuesta con el objeto de salvaguardar al órgano afectado, aún a expensas de alguna interferencia con la completa eliminación de los patógenos. Uno de los mecanismos regulatorios intrínsecos del SI involucraría a las células T-reg [188]. Diversos estudios evidenciaron niveles elevados de células T CD4+CD25+FoxP3+ en pacientes con TB, y demostraron que las mismas eran capaces de disminuir la producción *in vitro* de IFN- γ mediada por células T en esos pacientes [304, 305, 177]. En este trabajo demostramos que los sujetos con TB, al momento del diagnóstico, presentaban frecuencias elevadas de células T-reg CD4+CD25+Foxp3+ en comparación con el grupo control, a expensas de los sujetos con las formas más avanzadas de la enfermedad [(TB Moderados + TB Severos) vs. HCo $p<0,01$]. En las muestras de pacientes que completaron el estudio, se vio aún más aumentado el porcentaje de T-reg a

los dos y cuatro meses de iniciado el tratamiento específico, alcanzando valores comparables a los HCo una vez finalizado el mismo. Si bien estas células regulatorias son conocidas por mediar una amplia variedad de efectos inmunológicos en cuanto a la modulación de la respuesta antimicrobiana y de daño tisular [306, 191], el incremento de T-reg observado en estos pacientes parece ser más compatible con un intento de disminuir el daño inmunológico, considerando los resultados presentados en trabajos previos [254, 307] así como en este, donde se demuestra que la TB avanzada coexiste con un aumento en los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias. De hecho, el papel de las células T-reg en TB no está bien definido, y no es claro si su expansión es una causa o una consecuencia de la enfermedad. Probablemente se expandan como parte de una respuesta adaptativa del hospedero con el objeto de limitar la reacción inflamatoria y el subsecuente daño tisular. La expansión de estas células en respuesta a la infección por *Mtb*, mediante el reconocimiento de antígenos bacterianos específicos, se lograría por la presencia en el entorno de IL-10 y TGF- β , citocinas que son producidas localmente en grandes cantidades en pacientes con TB activa [254, 145, 308]. Algunos estudios reportaron una mayor capacidad supresora de las T-reg sobre las células productoras de IFN- γ respecto de las que producen IL-17, lo que favorecería la persistencia de estas últimas en los tejidos inflamados y la perpetuación o recrudecimiento de la inflamación [189, 309, 310]. Los resultados sobre una correlación positiva significativa entre las células T-reg y los niveles plasmáticos de IFN- γ a los dos meses de tratamiento ($r=0,61$; $p<0,05$; $n=18$), sugieren que el aumento de estos linfocitos no lograría, en esta etapa, dominar el proceso inflamatorio. Sin embargo, al T4 cuando la mejoría clínica de los pacientes fue evidente, esta correlación resultó ser negativa ($r=-0,79$; $p<0,02$; $n=16$). De estos resultados se desprende que el cuarto mes de tratamiento específico representaría el mejor momento donde tendría lugar un balance adecuado entre el funcionamiento de las T-reg y la respuesta clínica.

En cuanto a la relación entre estas células y las hormonas esteroideas, Xiang y colaboradores demostraron que luego de cultivar CMP con dexametasona (10^{-8} M) por 24 hs, los niveles de expresión del ARNm para FoxP3 disminuían significativamente,

sugiriendo una rápida sensibilidad de las células T-reg al efecto de los corticoides [311]. En el mismo sentido, también se demostró que DHEA inhibía la expresión de este factor de transcripción en pacientes con TB co-infectados con HIV [312]. En coincidencia con estos hallazgos *in vitro*, en los pacientes al T4 los porcentajes de células T-reg se asociaron negativamente con los niveles plasmáticos de cortisol ($r=-0,61$; $p<0,04$; $n=16$) y DHEA ($r=-0,74$; $p<0,01$; $n=16$); sugiriendo una modulación de la población T-reg por factores externos al SI.

Continuando con el análisis de las modificaciones producidas en la respuesta inmunoendócrina durante el tratamiento antibacilar, se cuantificaron los niveles de citocinas pro- y antiinflamatorias, y aquellas de los patrones de respuesta Th1/Th2/Th17, así como las concentraciones de los esteroides adrenales, cortisol, DHEA y DHEA-S. En lo referente a los mediadores proinflamatorios, al igual que en trabajos previos, al momento del diagnóstico los niveles de IL-6, CRP e IFN- γ se vieron aumentados, así como los del mediador antiinflamatorio TGF- β . La activación del M Φ por parte del IFN- γ es esencial para destruir o confinar al *Mtb*, así como para favorecer la presentación antigénica y la RI celular. Sin embargo, un exceso de IL-6 podría contrarrestar los efectos activadores del IFN- γ [313]. IL-6 es una citocina pleiotrópica con funciones inhibitorias y activadoras sobre la RI. Al respecto, ante la infección por *Mtb*, se vio que la presencia de IL-6 es esencial para la producción de IFN- γ por parte de las células de la inmunidad innata [144]. Nuestros resultados revelaron correlación positiva y significativa entre IL-6 e IFN- γ tanto al diagnóstico de la TB como a T2, lo que indicaría que IL-6 podría estar afectando positivamente la producción de IFN- γ . TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ son citocinas que inducen la producción de proteínas de fase aguda, siendo IL-6 la principal estimuladora de la mayoría de ellas. Los pacientes, al momento del diagnóstico, mostraron asociación positiva entre IL-6 y CRP ($r= 0,75$; $p<0,02$; $n=17$), tiempo donde la concentración de ambas proteínas fue máxima. Durante el tratamiento antibacilar los niveles de CRP descendieron abruptamente a valores similares a los de los controles (Figura 24 C). Pero siempre se mantuvieron asociados con los niveles de otro indicador de proceso inflamatorio como la ERS (Por ejemplo T2, $r=0,91$; $p<0,01$; $n=14$. Ver Figura 35 B). Si bien a la CRP se la

considera un mediador proinflamatorio, esta proteína ejerce efectos pleiotrópicos ya que mediante la unión a sus ligandos (fosfocolina, cromatina, histona, fibronectina, etc.) o a través de agregados de la misma proteína, activa la vía clásica del complemento. Interactuando con los receptores FCγR I y II también favorecería la fagocitosis bacteriana, a la vez que incrementa la expresión de las moléculas de adhesión, y estimula la liberación de IL-8, IL-1, IL-6, IL-18 y de TNF-α [160]. Sin embargo, en modelos animales se ha observado que CRP podría: regular la activación del complemento favoreciendo la expresión celular de factores inhibidores (factor acelerador de decaimiento, proteína cofactora de membrana y CD59), inducir la síntesis del antagonista del receptor de IL-1, de IL-10 y reprimir la de IFN-γ. En el grupo de pacientes, no observamos un efecto inhibitorio de este mediador sobre el IFN-γ, ya que ambas proteínas se correlacionaron positivamente tanto al T0 ($r= 0,59$; $p<0,05$; $n=14$) como a T2 ($r= 0,82$; $p<0,01$; $n=14$) (Figura 35 A y B respectivamente).

Chowdhury y colaboradores en un trabajo de seguimiento (*follow up*) de pacientes con TB pulmonar, en base a la utilización de enzimoimmunoensayos en su mayoría de alta sensibilidad, observaron que estos al momento del diagnóstico presentaban niveles séricos elevados de IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 y TGF-β respecto de controles, sin modificaciones en los valores de IL-4 [314]. En los pacientes del presente estudio, las concentraciones plasmáticas de TNF-α, IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10 no pudieron cuantificarse ya que los valores hallados fueron inferiores a los límites de detección de los ensayos utilizados (Ver materiales y métodos, páginas 72 y 73). IL-17 aún con enzimoimmunoensayo de alta sensibilidad no pudo detectarse. Lo que si se evidenció fue un incremento en el patrón de respuesta Th1 al cuantificarse valores elevados de IFN-γ al T0. Niveles que descendieron durante el tratamiento antibacilar dejando de diferir de los controles al T6. Si bien este tipo de respuesta es esencial para la eliminación o contención de la micobacteria, al coexistir con una exacerbada respuesta proinflamatoria (IL-6, CRP) contribuiría al daño tisular. Durante el tratamiento la mejoría clínica del paciente, se vio acompañada por la disminución de estos mediadores, coincidiendo con lo observado por otros autores [314, 315].

Con respecto a TGF- β , mediador con funciones supresoras sobre la RI celular y la activación de M Φ , sus niveles se vieron aumentados al momento del diagnóstico, dejando de diferir de los controles a partir del segundo mes de tratamiento. El TGF- β no sólo modula la RI [166], sino también la síntesis de hormonas adrenales [316, 317, 318]. En trabajos previos, Mahuad y colaboradores, y D'Attilio y colaboradores, demostraron que los productos de la RI antimicrobiana inhibían la síntesis de DHEA por células adrenales humanas, siendo el TGF- β uno de los mediadores responsables de este efecto [239, 254, 319]. Cabe mencionar que la DHEA es una hormona antiinflamatoria y a su vez favorece la RI celular.

Si bien el TGF- β podría contribuir directa o indirectamente a la modulación del exacerbado proceso inflamatorio, por lo expresado y al encontrarse este mediador ya disminuido al segundo mes de tratamiento, su incremento al diagnóstico estaría en gran parte asociado al proceso infeccioso.

Como era de esperarse y confirmando estudios previos, el diagnóstico de TB activa se caracterizó por bajos niveles de DHEA y DHEA-S, junto con incrementos en las concentraciones de cortisol [254, 307]. Estas variaciones también se observaron en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas [264, 320]. Lo que reflejaría alteraciones en la función adrenal a fin de mantener la producción de cortisol, como un intento de contrarrestar la respuesta inflamatoria que acompaña a la enfermedad activa.

Del análisis de los resultados expuestos se puede inferir que a los tres meses luego de finalizado el tratamiento, el aumento de DHEA y DHEA-S, la disminución de la relación Cortisol/DHEA, junto con los niveles descendidos de cortisol a valores semejantes a los presentados por los controles, estaría reflejando un mejor funcionamiento de la adrenal, probablemente vinculado a la desaparición de compuestos endógenos potencialmente nocivos sintetizados en respuesta a la infección [321] y a un ambiente menos inflamatorio. Sin embargo, hay que destacar que los pacientes con **TB pulmonar severa**, si bien incrementaron las concentraciones de DHEA con el inicio del tratamiento antibacilar, nunca alcanzaron los valores presentados por los HCo. Mientras que los pacientes con **TB**

pulmonar moderada, a partir del segundo mes de tratamiento mostraron concentraciones de DHEA similares a las del grupo control.

El incremento de los niveles de DHEA podría contribuir con la mejoría clínica y el estado inmune del hospedero, ya que como fue mencionado previamente, DHEA posee efecto antiinflamatorio, e inmunoestimulante sobre la respuesta Th1 [240]. No puede dejar de mencionarse que a T9 las concentraciones de DHEA mostraron un descenso (Figura 25 B), más evidente en los pacientes con las formas severas de la enfermedad. Sin embargo, las concentraciones de DHEA-S estaban preservadas a ese tiempo. DHEA y su ester sulfato, son esteroides derivados de la adrenal, que pueden ser interconvertidos; DHEA-S pasa a DHEA utilizando la DHEA-S sulfatasa, mientras que la conversión inversa es mediada por la DHEA sulfotransferasa. DHEA-S es el reservorio natural de la DHEA, no es bioactivo, y constituye un marcador estable de la disponibilidad de DHEA. Luego de su conversión a la forma biológicamente activa en los tejidos periféricos, DHEA es procesada intracelularmente para generar metabolitos activos [322]. Una inhibición en la actividad de la DHEA-S sulfatasa podría estar involucrada en la reducción de la disponibilidad de DHEA, y por consiguiente en la disminución de los niveles plasmáticos del andrógeno, tal como se observó en el grupo de pacientes. Citocinas como TNF- α e IL-6 son capaces de inhibir la actividad de la DHEA-S sulfatasa en las células periféricas [323]. Esta inhibición no estaría presente durante los 6 meses de tratamiento específico donde se utilizan fármacos como rifampicina e isoniazida. Además, es probable que la rifampicina afecte el metabolismo de los esteroides adrenales en el hígado debido a su efecto sobre el complejo enzimático CYP3A4 [324]. Estudios de las funciones adrenocorticales en pacientes con TB activa que recibían tratamientos basados en la toma de rifampicina o ciprofloxacina, revelaron que estos no presentaban compromiso de las funciones adrenales [325]; dado que estas evaluaciones fueron realizadas dentro de los primeros 5 días de tratamiento, el efecto potencial de la toma prolongada requiere ser evaluado. También debe establecerse si la reducción de la conversión de DHEA-S a DHEA constituye una característica particular de los pacientes con TB, más aún en aquellos con TB pulmonar severa.

La coexistencia de concentraciones elevadas de mediadores proinflamatorios y de cortisol en los pacientes con TB al diagnóstico, nos indujo a pensar no sólo en una relativa deficiencia en la producción de cortisol, sino también en la presencia de un estado de resistencia a la acción del andrógeno [254]. Los mecanismos de resistencia a los GC pueden involucrar modificaciones en la expresión de alguna (o ambas) de las isoformas del receptor para glucocorticoides (GR α y/o GR β), así como alteraciones en la interconversión cortisol \leftrightarrow cortisona (a cargo de las enzimas 11 β HSD 1 y 2), entre otros [326, 327]. Del análisis de la expresión de los transcritos de las isoformas del GR, se demostró que al momento del diagnóstico los pacientes con las formas más avanzadas de la enfermedad, presentaban cierto grado de resistencia a la acción de los GC [256], reconfirmado en este estudio al observarse la relación entre los transcritos GR α /GR β disminuida, con expresión aumentada de 11 β HSD1. Durante el tratamiento antibacilar se perdería este estado de resistencia, el cortisol podría ejercer su acción biológica reflejado, en cierta manera, por la correlación inversa entre la hormona y los niveles de IL-6 ($r=-0,80$; $p<0,01$; $n=17$) al T4.

La relación GR α /GR β al T0 se encuentra disminuida a expensa de un incremento de la isoforma GR β , receptor que al formar heterodímero con GR α inhibiría la unión al ligando, y como consecuencia la hormona no podría ejercer su acción biológica. En patologías inflamatorias como Colitis Ulcerosa, entre otras, también se han observado incrementos importantes en la expresión de esta isoforma del receptor [214], estos incrementos podrían deberse a que la expresión de este transcrito estaría favorecida por citocinas inflamatorias [215].

En enfermedades crónicas como Asma y Artritis Reumatoidea, con desregulación de la RI adaptativa e importante proceso inflamatorio, se ha propuesto que la 11 β HSD1 podría estar involucrada en la resolución de la inflamación [328]. 11 β HSD1, pero no 11 β HSD2, se encuentra expresada en células diferenciadas de la RI, CD, Linfocitos T y B [329, 330, 331]. Los M Φ deficientes en 11 β HSD1 son menos capaces de ingerir y remover PMN *in vivo* e *in vitro*, sugiriendo que deficiencias en este enzima podrían contribuir en la persistencia de la inflamación [332]. Las citocinas IL-1, IL-6, TNF- α estimulan la actividad

11 β HSD1 de estas células inmunes, así como de las de médula ósea, piel y adipocitos. De esta manera se generaría un mecanismo de *feedback* donde los estímulos inflamatorios colaborarían en la regeneración de GC activo, en un intento de minimizar cualquier tendencia de prolongar la inflamación. La regulación de la regeneración de GC activos mediada por 11 β HSD1 en las células inmunocompetentes, actuaría como un mecanismo de regulación autocrino. Las CD estimuladas por señales de la RI innata, aumentan la actividad de la cortisona reductasa, mientras que cuando son activadas por la RI adaptativa (unión CD40) su capacidad de generar cortisol activo disminuye. Actividad 11 β HSD1 también se ha demostrado en los linfocitos TCD4+, TCD8+ y B220, sugiriendo un mecanismo de regulación intrínseca de su viabilidad. La regulación de esta enzima es tejido específica y la inhibición dependería directa o indirectamente de los niveles de insulina, hormona de crecimiento, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), receptores activadores de la proliferación de peroxisomas gamma (PPAR γ), inhibidores de proteasas y DHEA [333].

La disminución de la 11 β HSD1 durante el tratamiento, lleva a pensar que el GC en los niveles existentes estaría modulando eficientemente la RI contra el *Mtb*.

En los procesos inflamatorios crónicos, diversos grupos de trabajo, al igual que el nuestro, han observado que en estos procesos de desregulación de la RI, la relación entre los niveles de cortisol y DHEA, más que las concentraciones individuales de cada una de las hormonas, es la que se asociaría a la severidad de la patología [334]. Esto también se observó en este grupo de pacientes al diagnóstico [254, 272]. Con el tratamiento antibacilar, los valores de esta relación descendieron significativamente a partir de T2, donde ya se evidenció la mejoría clínica en el paciente.

En miras a encontrar posibles marcadores de la respuesta neuroendócrina, que pudiesen actuar como indicadores de pronóstico, se realizó un análisis multivariado. Dado que este tipo de análisis requiere del seguimiento de un importante número de pacientes, en esta etapa se seleccionaron variables consideradas relevantes a fin de realizar un análisis de componentes principales orientado a vislumbrar aquellos parámetros que pudieran definir grupos de pacientes en las distintas etapas del estudio. Si bien no se

podieron establecer variables que diferenciaron grupos de pacientes, se observó que la relación Cortisol/DHEA se asociaba positivamente con mediadores inflamatorios como IL-6, IFN- γ , CRP y ERS (Figura 35 A). A partir de T2, los pacientes estarían mostrando una mejoría clínica y marcado descenso de los mediadores inflamatorios, sin embargo la relación Cortisol/DHEA continuó correlacionada con CRP y ERS. Esta asociación aún se observó a lo largo del seguimiento, si bien los valores de los distintos parámetros no difirieron de los del grupo control. Estos resultados sugieren que la relación Cortisol/DHEA podría utilizarse como marcador del proceso inflamatorio. Los valores de esta relación dependen fundamentalmente de los niveles plasmáticos de DHEA muy disminuidos al diagnóstico y asociados a la gravedad de la TB pulmonar, lo que da pie para pensar en una terapia coadyuvante al tratamiento antibacilar con DHEA como moduladora de la respuesta inmunoendócrina, favoreciendo la depuración bacteriana y la mejoría clínica del paciente en un período menos prolongado de tratamiento.

La valoración de mediadores sistémicos es una estrategia que en definitiva intenta determinar si las variaciones de tal o cual compuesto se hallan relacionadas con la situación clínica del paciente. Esta apreciación que es un tanto menos consistente cuando se trata de una única medición (tanto predictor como fenómeno de interés son ponderados en una sola instancia) cobra mucho más valor al efectuarse en forma secuencial como en la presente investigación. Desde esta óptica y con miras a un enfoque más integrador, los resultados apuntan a que el tratamiento antibacilar involucra una serie de cambios cualitativos en el perfil inmunoendócrino, que guardan un correlato con la evolución favorable de la enfermedad y por ende su vinculación con los procesos subyacentes implicados en la resolución del cuadro nosológico.

Conclusiones

7- Conclusiones

- ☞ En consonancia con estudios previos, se observó un incremento en los niveles plasmáticos de IL-6, CRP, IFN- γ y TGF- β en los pacientes con TB al momento del diagnóstico. Sin embargo, durante el tratamiento antibacilar, los pacientes mostraron una marcada disminución de estos mediadores conjuntamente a un aumento en la linfoproliferación (disminuida en los pacientes con TB al momento del reclutamiento) a la par de la significativa mejoría clínica. Estos pacientes mostraron incremento en el IMC, disminución en los valores de ERS, modificaciones tanto en el hemograma como en el Laboratorio de Bioquímica Clínica, a valores semejantes a los de los controles sanos.

- ☞ El aumento de la respuesta inflamatoria al diagnosticarse la enfermedad coexistió con un porcentaje elevado de células T reguladoras. Esta población se vio aún más incrementada al segundo y cuarto mes de tratamiento específico, para luego descender a valores similares al de los HCo. Si bien estas células regulatorias son conocidas por mediar una amplia variedad de efectos inmunológicos en cuanto a la modulación de la respuesta antimicrobiana y de daño tisular, el incremento de T-reg observado en estos pacientes parece ser más compatible con un intento de disminuir el daño inmunológico. De hecho, el papel de las células T-reg en TB no está bien definido, y no es claro si su expansión es una causa o una consecuencia de la enfermedad. Probablemente se expandan como parte de una respuesta adaptativa del hospedero con el objeto de limitar la reacción inflamatoria y la subsecuente destrucción tisular. Se requerirían al menos cuatro meses de tratamiento para lograr un balance adecuado entre el funcionamiento de las T-reg y la respuesta clínica.

- ☞ En este proyecto se estudió por primera vez la modulación de la respuesta del eje HPA durante el tratamiento antibacilar, mediante la cuantificación de los niveles plasmáticos de cortisol, DHEA y DHEA-S. Se corroboraron hallazgos previos en donde la

TB activa se caracteriza por bajos niveles de DHEA y DHEA-S, y valores elevados de cortisol. Estas alteraciones probablemente reflejan una redistribución del flujo de esteroides con el fin de mantener la producción de cortisol, a pesar de una función adrenal alterada, como un intento de contrarrestar la respuesta inflamatoria que acompaña a la enfermedad activa. Asimismo, los pacientes presentaron una relación entre los transcritos de GR α y GR β desfavorable para que el cortisol ejerza sus funciones biológicas, sugiriendo cierto grado de resistencia al esteroide, puesto de manifiesto además por incrementos en la expresión del transcrito 11BHS1 en un intento de aumentar la disponibilidad del cortisol intracelular.

Durante el tratamiento antibacilar:

- ⌘ El incremento en los niveles plasmáticos de DHEA junto con niveles moderadamente elevados y sostenidos de cortisol, podría reflejar una mejoría en la función suprarrenal. Tres meses luego de finalizado el tratamiento se observa correlación entre ambas hormonas, como se evidencia en los controles sanos.
- ⌘ La relación Cortisol/DHEA significativamente aumentada al diagnóstico, asociada a la severidad de la TB pulmonar y al deterioro de la RI específica, disminuye durante el tratamiento a expensas del incremento en los niveles de DHEA; hormona con actividad antiinflamatoria que además podría inducir una adecuada RI anti-micobacteriana.
- ⌘ El incremento de la relación entre los transcritos de GR α y GR β , con marcada disminución de GR β , isoforma biológicamente inactiva del receptor, favorecería la acción de los GC contribuyendo a la modulación de la respuesta proinflamatoria.

Desde una visión integradora y más allá de los mecanismos subyacentes, los resultados sugieren que el tratamiento antibacilar también involucraría cambios

cualitativos en el perfil inmunoendócrino, que en su conjunto harían a la mejoría clínica del paciente. La recuperación en los niveles de DHEA durante el tratamiento específico asociada a la severidad de la TB pulmonar, conjuntamente con un descenso de la respuesta proinflamatoria permitiría presuponer que la incorporación de la DHEA al tratamiento convencional antibacilar, contribuiría a acortar los tiempos requeridos para lograr la mejoría clínica del paciente. Asimismo, se ha podido vislumbrar el rol de la variable Cortisol/DHEA como un potencial marcador proinflamatorio. Ante el eventual uso de DHEA como coadyuvante de la terapia antibacilar, esta relación podría ser una herramienta útil como marcador de pronóstico. Más está decir, que debe profundizarse en los mecanismos que subyacen a las modificaciones de la respuesta inmunoendócrina, incrementar el número de pacientes bajo estudio a fin de confirmar los supuestos planteados, y afianzar las tendencias observadas en torno a la utilidad de algunas determinaciones de laboratorio como biomarcadores de la evolución de la enfermedad tras la instauración del tratamiento específico.

8- Resumen

La tuberculosis (TB) constituye un importante problema de Salud Pública, es la segunda causa de muerte a nivel mundial producida por un agente infeccioso, el *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). La respuesta inmune (RI) celular es esencial para el control de esta enfermedad, aunque también está involucrada en la generación de patología. En trabajos previos se observó que al momento del diagnóstico los pacientes con TB presentaban un marcado desequilibrio Neuroinmunoendócrino caracterizado por aumento plasmático de citocinas pro- y antiinflamatorias y deterioro de la RI celular, conjuntamente con incrementos en los niveles de cortisol y marcado descenso de los de dehidroepiandrosterona (DHEA), y el consecuente desequilibrio de la relación Cortisol/DHEA en asociación con la severidad de la patología. Con respecto a las funciones de las hormonas del eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal como reguladores extrínsecos de la RI, el cortisol inhibe la RI celular y la producción de citocinas proinflamatorias, mientras que DHEA por su parte posee efecto antiinflamatorio, e inmunoestimulante sobre la respuesta Th1. Ante lo previamente expuesto y atendiendo al rol estimulante de la DHEA sobre la RI celular protectora hacia patógenos intracelulares como el *Mtb*, se consideró esencial: Investigar la respuesta inmunoendócrina en pacientes, desde su diagnóstico hasta la culminación del tratamiento, a fin de establecer el correlato entre los parámetros clínicos y de laboratorio (hormonas, citocinas, proteínas de fase aguda, modificaciones de las distintas poblaciones linfocitarias -T reguladoras-). Al mismo tiempo, determinar si alguno(s) de los parámetros inmunoendócrinos bajo análisis se desempeñan como predictores de la posterior evolución de la enfermedad. Es así que se obtuvieron muestras de sangre de 26 controles sanos (HCo) y 24 sujetos con TB, HIV negativos, similares en sexo y edad. En los pacientes las extracciones se realizaron al diagnóstico (T0) y a los 2 (T2), 4 (T4) y 6 meses (T6) de iniciado el tratamiento antibacilar, y a los 3 meses de finalizado el mismo (T9). Al T0 en los enfermos se observó un incremento en los niveles plasmáticos de IL-6, CRP, IFN- γ y TGF- β . Durante el tratamiento específico estos mediadores descendieron hasta alcanzar valores similares a los presentados por los HCo. Conjuntamente se observó aumento en la respuesta linfoproliferativa a la par de una significativa mejoría clínica, caracterizada por el incremento en el índice de masa corporal (IMC). La proporción de células T-reg, elevada al diagnóstico se vio aún más incrementada al T2 y T4, donde se correlacionó negativamente con los niveles plasmáticos de INF- γ , para luego descender a valores similares al de los HCo. Al igual que en trabajos previos, al diagnóstico los voluntarios enfermos mostraron niveles bajos de DHEA y DHEA-S y valores elevados de cortisol así como de la relación Cortisol/DHEA, los últimos asociados a la severidad de la TB pulmonar. Además, presentaron una relación entre los transcritos de las isoformas α y β del receptor para glucocorticoides (GR) disminuida (GR α es la isoforma biológicamente activa, no así GR β), sugiriendo cierto grado de resistencia a la acción del

esteroide; puesto de manifiesto también por el incremento en la expresión del transcrito de la enzima 11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1), en un intento de aumentar la disponibilidad del cortisol intracelular. Durante el tratamiento específico se vio un incremento en los niveles plasmáticos de DHEA junto con niveles moderadamente elevados y sostenidos de cortisol y una disminución en la relación Cortisol/DHEA, lo que podría reflejar un mejor funcionamiento suprarrenal. Además el aumento a partir de T2 de la relación entre los transcritos GR α /GR β , con marcada disminución de GR β , favorecería la acción de los GC contribuyendo a la modulación de la respuesta proinflamatoria. De lo expuesto se desprende que el tratamiento antibacilar involucraría cambios cualitativos en el perfil inmunoendócrino que en su conjunto contribuirían a la mejoría clínica del paciente. Como perspectivas futuras los resultados permiten presuponer que la incorporación de DHEA al tratamiento convencional antibacilar contribuiría a acortar los tiempos requeridos para lograr la mejoría clínica del paciente. Asimismo, se ha podido vislumbrar el rol de la variable Cortisol/DHEA como un potencial marcador proinflamatorio. Ante el eventual uso de DHEA como coadyuvante de la terapia antibacilar, esta relación podría ser una herramienta útil como marcador de pronóstico.

Bibliografía

9- Bibliografía

- ¹ World Health Organization. Global tuberculosis report. WHO report **2014**. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1
- ² Báguena Cervellera, M.J. **1992**. La Tuberculosis y su historia. Fund Uriach. ISBN 84-8745212-4.
- ³ Nerlich, A.G., Haas, C.J., Zink, A., Szeimies, U., Hagedorn, H.G. **1997**. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*. 350(9088):1404.
- ⁴ Crubézy, É., Ludes, B., Poveda, J.D., Clayton, J., Crouau-Roy, B., Montagnon, D. **1998**. Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *C R Acad Sci Paris*. 321:941–51.
- ⁵ Palomino, J.P., Cardoso Leão S., Ritacco, V. **2007**. Tuberculosis. From basic science to patient care. Disponible en: <http://www.pneumo-iasi.ro/student/tuberculosis2007.pdf>
- ⁶ Daniel, T.M. **2006**. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 100(11):1862-70.
- ⁷ Riva, M.A. **2014**. From milk to rifampicin and back again: history of failures and successes in the treatment for tuberculosis. *J Antibiot (Tokyo)*. 67(9):661-5.
- ⁸ Keshavjee, S., Farmer, P.E. **2012**. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med*. 367(10):931-6.
- ⁹ Kaufmann, S.H. **2013**. Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. *Semin Immunol*. 25(2):172-81.
- ¹⁰ Dietrich, J., Doherty, T.M. **2009**. Interaction of Mycobacterium tuberculosis with the host: consequences for vaccine development. *APMIS*. 117(5-6):440-57.
- ¹¹ Bjune, G. **2005**. Tuberculosis in the 21st century: an emerging pandemic?. *Norsk Epidemiologi*. 15 (2): 133-139.
- ¹² Abbate, E., Ballester, D., Barrera, L., Brian, M.C., Echazarreta, A. **2009**. Consenso Argentino de Tuberculosis. *Revista Argentina de Medicina Respiratoria*. págs. 61-99.
- ¹³ Djoba Siawaya, J.F., Beyers, N., van Helden, P., Walzl, G. **2009**. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 156(1):69-77.
- ¹⁴ Bloom, B.R., Murray, C.J.L. **1992**. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 257(5073):1055-64.
- ¹⁵ Ferraz, J.C., Melo, F.B.S., Albuquerque, M.F.P.M., Montenegro, S.M.L. y Abath, F.G.C. **2006**. Immune Factors and Immunoregulation in Tuberculosis. *Braz J Med Biol Res*. 39(11):1387-97.
- ¹⁶ Fattorini, L., Piccaro, G., Mustazzolu, A., Giannoni, F. **2013**. Tarrgeting Dormant Bacilli to Fight Tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 5(1):e2013072.
- ¹⁷ Flynn, J.L., Chan, L., Lin, P.L. **2011**. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 4(3): 271–278.
- ¹⁸ Fernández, H.R, Arias, S.J., Garcilazo, D.A. **2012**. Situación de la Tuberculosis en Argentina. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dr. Emilio Coni. Disponible en: http://www.anlis.gov.ar/iner/wp-content/uploads/2014/05/Situaci%C3%B3nTb_2012_Web.pdf
- ¹⁹ Comas, I., Gagneux, S. **2009**. The Past and Future of Tuberculosis Research. *PLoS Pathog*. 5(10):e1000600.

-
- ²⁰ Ducati, R.G., Ruffino-Netto, A., Basso, L. y Santos D. **2006**. The resumption of Consumption – A Review on Tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101(7):697-714.
- ²¹ Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa **2014**. Nota descriptiva n° 104. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- ²² Enfermedades infecciosas, Tuberculosis. **2009**. Guía para el equipo de salud Nro. 3. Ministerio de salud, Presidencia de la Nación. ISSN 1852-1819 / ISSN 1852-219X
- ²³ Abubakar, I., Zignol, M., Falzon, D., Raviglione, M., Ditiu, L., Masham, S., Adetifa, I., Ford, N., Cox, H., Lawn, S.D., Marais, B.J., McHugh, T.D., Mwaba, P., Bates, M., Lipman, M., Zijenah, L., Logan, S., McNerney, R., Zumla, A., Sarda, K., Nahid, P., Hoelscher, M., Pletschette, M., Memish, Z.A., Kim, P., Hafner, R., Cole, S., Migliori, G.B., Maeurer, M., Schito, M., Zumla, A. **2013**. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership. Lancet Infect Dis. 13(6):529-39.
- ²⁴ Enfermedades Infecciosas, Tuberculosis. Guía para el equipo de salud. **2009**. Ministerio de Salud. Guía N°3. ISSN 1852-1819. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia_tuberculosis.pdf
- ²⁵ Zerbini, E., Darmaud, R.M., Prieto, V., Sequeira, M.D., Dato, M.I., Bossio, J.V. **2008**. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dr. Emilio Coni. Disponible en: <http://www.anlis.gov.ar/inst/INER/Normas2008.pdf>
- ²⁶ Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrel, B.G. **1998**. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature. 393(6685):537-44.
- ²⁷ Rodríguez, G. **2006**. Temas de bacteriología y virología médica. Mycobacterias. Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Segunda edición. Pag. 381-399
- ²⁸ Brennan, P.J., Nikaido, H. **1995**. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 64: 29-63.
- ²⁹ Jarlier, V., Nikaido, H. **1994**. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett. 123(1-2):11-8.
- ³⁰ 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.
- ³¹ Mstrom, P., Gordon, M., Sola, C., Ridell, M., Rastogi, N. **2002**. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 8(11):694-704.
- ³² Mostowy, S., Behr, M.A. **2005**. The origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. Clin Chest Med. 26(2):207-16, v-vi.
- ³³ Gagneux, S. **2012**. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 367(1590):850-9.
- ³⁴ Raupach, B., Kaufmann, S. H. **2001**. Immune responses to intracellular bacteria. Curr Opin Immunol. 13 (4): 417-428.
- ³⁵ Glickman, M.S., Jacobs, Jr W.R. **2001**. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell. 104:477-485.

-
- ³⁶ Zuñiga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodriguez-Reyna, T.S., Granados, J., Yunis, E.J. **2012**. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 193923.
- ³⁷ Richeldi L. **2006**. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 174(7):736-42.
- ³⁸ Zerbini, E.V., Darnaud R.M.H., Prieto, V.G. **2008**. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis: Normas Técnicas 2008. 3ra ed. Santa Fe: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Dr. Emilio Coni.
- ³⁹ O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J. and Berry M.P.R. **2013**. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 31:475–527
- ⁴⁰ Paige, C., Bishai, W.R. **2010**. Penitentiary or penthouse condo: the tuberculous granuloma from the microbe's point of view. *Cell Microbiol*. 12(3):301-9.
- ⁴¹ Russell, D.G., Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S., Altare, F. **2009**. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol*. 10(9):943-8.
- ⁴² Ahmad, S. **2011**. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Clin and Devel Imm*. 814943.
- ⁴³ Gonzalez-Juarrero, M., Turner, O.C., Turner, J., Marietta, P., Brooks, J.V., Orme, I.M. **2001**. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 69(3):1722-8.
- ⁴⁴ Shaler, C.R., Horvath, C.N., Jeyanathan, M., Xing, Z. **2013**. Within the Enemy's Camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol*. 14,4:30.
- ⁴⁵ Ulrichs, T., Kosmiadi, G. A., Jorg, S., Pradl, L., Titukhina, M., Mishenko, V., Gushina, N., Kaufmann, S. H. **2005**. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J Infect Dis*. 192(1):89-97.
- ⁴⁶ Korf, J., Stoltz, A., Verschoor, J., De Baetselier, P., Grooten, J. **2005**. The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen associated host innate immune responses. *Eur J Immunol*. 35(3):890-900.
- ⁴⁷ Abbas, A., Lichtman, A., Shiv, P. 2008. *Celular and molecular immunology* 6° Edº ed. ELSEVIER
- ⁴⁸ Hossain, M.M., Norazmi, M.N. **2013**. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword?. *Biomed Res Int*. 179174.
- ⁴⁹ van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., van der Meer, J.W. **2002**. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 15(2):294-309.
- ⁵⁰ Saiga, H., Shimada, Y. y Takeda K. **2011**. Innate Immune Effectors in *Mycobacterial* Infection. *Clin Dev Immunol*. 347594.
- ⁵¹ Janeway, C. A., Medzhitov, R. **2002**. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*. 20:197-216.
- ⁵² Velasco-Velázquez, M.A., Barrera, D., González-Arenas, A., Rosales, C., Agramonte-Hevia, J. **2003**. Macrophage--*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb Pathog*. 35(3):125-31.

-
- ⁵³ Gerold, G., Zychlinsky, A., de Diego, J. L. **2007**. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections?. *Semin Immunol.* 19(1):41-7.
- ⁵⁴ Ito, T., Connett, J.M., Kunkel, S.L., Matsukawa A. **2013**. The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. *Front Immunol.* 31:4:10.
- ⁵⁵ Saraav, I., Singh, S., Sharma, S. **2014**. Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion?. *Immunol Cell Biol.* 92(9):741-6.
- ⁵⁶ Berrington, W.R., Hawn, T.R. **2007**. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?. *Immunol Rev.* 219:167-86.
- ⁵⁷ Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A., Netea, M.G., Van Crevel R. **2011**. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Dev Immunol.* 405310.
- ⁵⁸ Bai, W., Liu, H., Ji, Q., Zhou, Y., Liang, L., Zheng, R., Chen, J., Liu, Z., Yang, H., Zhang, P., Kaufmann, S.H., Ge B. **2014**. TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K/AKT signaling pathway. *Cell Signal.* 26(5):942-50.
- ⁵⁹ Yang, Y., Yin, C., Pandey, A., Abbott, D., Sasseti, C., Kelliher, M.A. **2007**. NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J Biol Chem.* 282(50):36223-9.
- ⁶⁰ Juárez, E., Carranza, C., Hernández-Sánchez, F., León-Contreras, J.C., Hernández-Pando, R., Escobedo, D., Torres, M., Sada, E. **2012**. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Eur J Immunol.* 42(4):880-9.
- ⁶¹ Kleinnijenhuis, J., Joosten, L. A. B., van de Veerdonk, F. L., Savage, N., van Crevel, R., Kullberg, B. J., van der Ven, A., Ottenhoff, T. H. M., Dinarello, C. A., van der Meer, J. W. M., Netea, M. G. **2009**. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1B production by Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Immunol.* 39(7):1914-22.
- ⁶² Briken, V., Ahlbrand, S.E., Shah, S. **2013**. Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:62.
- ⁶³ Master, S.S., Davis A.S., Rampini, S.K., Keller, C., Ehlers, S., Springer, B., Sander, P., Deretic, V. **2008**. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe.* 3(4):224-32.
- ⁶⁴ Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Geijtenbeek, T.B. **2009**. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat Immunol.* 10(10):1081-8.
- ⁶⁵ Dorhoj, A., Kaufmann, S.H. **2014**. Perspectives on host adaptation in response to Mycobacterium tuberculosis: Modulation of inflammation. *Semin Immunol.* 26(6):533-542.
- ⁶⁶ Zimmerli, S., Edwards, S., Ernst, J.D. **1996**. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15(6):760-70.
- ⁶⁷ Court, N., Vasseur, V., Vacher, R., Fremont, C., Shebzukhov, Y., Yeremeev, V.V., Maillet, I., Nedospasov, S.A., Gordon, S., Fallon, P.G. **2010**. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol.* 184(12):7057-70.

-
- ⁶⁸ Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmek, B., Van Kooyk, Y. **2003**. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*. 197(1):7-17.
- ⁶⁹ Lugo-Villarino, G., Hudrisier, D., Tanne, A., Neyrolles, O. **2011**. C-type lectins with a sweet spot for *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 1(1):25-40.
- ⁷⁰ Rothfuchs, A.G., Bafica, A., Feng C. G., Egen, J.G., Williams, D.L., Brown, G.D., Sher, A. **2007**. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol*. 179(6):3463-71.
- ⁷¹ Hernández Pando, R., Chacón Salinas, R., Serafín López, J. y Estrada, I. **2007**. Tuberculosis. From Basic Science to Patient Care. Disponible en: www.TuberculosisTextbook.com.
- ⁷² Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Russell, D.G., Rich, E.A. **1994**. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol*. 152(2):743-53.
- ⁷³ Flynn, J.L., Chan, J. **2001**. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 19:93-129.
- ⁷⁴ Russell, D.G. **2011**. *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol Rev*. 240(1):252-68.
- ⁷⁵ Gengenbacher, M., Kaufmann, S.H. **2012**. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev*. 36(3):514-32.
- ⁷⁶ Vandal, O.H., Pierini, L.M., Schnappinger, D., Nathan, C.F., Ehrt, S. **2008**. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*. 14(8):849-54.
- ⁷⁷ Gatfield, J., Pieters, J. **2000**. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 288(5471):1647-50.
- ⁷⁸ Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., Pieters, J. **1999**. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. 97(4):435-47.
- ⁷⁹ Scherr, N., Jayachandran, R., Mueller, P., Pieters, J. **2009**. Interference of *M. tuberculosis* with macrophage responses. *Indian J Exp Biol*. 47(6):401-6.
- ⁸⁰ Kaul, D. **2007**. Coronin-1A epigenomics governs mycobacterial persistence in tuberculosis. *FEMS Microbiol Lett*. 278(1):10-4.
- ⁸¹ Anand, P.K., Kaul, D. **2005**. Downregulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages. *FEMS Microbiol Lett*. 250(1):137-44.
- ⁸² Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.X., Divangahi, M., Remold, H.G. **2011**. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol*. 4(3):279-87.
- ⁸³ O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J., Berry, M.P. **2013**. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 31:475-527.
- ⁸⁴ Torrado, E., Robinson, R. T., Cooper, A. M. 2011. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol*. 32 (2): 66-72.
- ⁸⁵ Behar, S.M., Divangahi, M., Remold, H.G. 2010. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?. *Nat Rev Microbiol*. 8(9):668-74.
- ⁸⁶ Jo, E.K. **2013**. Autophagy as an innate defense against mycobacteria. *Pathog Dis*. 67(2):108-18.

-
- ⁸⁷ Levine, B., Mizushima, N., Virgin, H.W. **2011**. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 469(7330):323-35.
- ⁸⁸ Gobin, J., Horowitz, M.A. **1996**. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J Exp Med*. 183(4):1527-32.
- ⁸⁹ Boelaert, J.R., Vandecasteele, S.J., Appelberg, R., Gordeuk, V.R. **2007**. The effect of the host's iron status on tuberculosis. *J Infect Dis*. 195(12):1745-53.
- ⁹⁰ Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., Altare, F. **2012**. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?. *Clin Dev Immunol*. 2012:139127.
- ⁹¹ Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffé, M., Emile, J.F., Marchou, B., Cardona, P.J., de Chastellier, C., Altare, F. **2008**. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog*. 4(11):e1000204.
- ⁹² Lay, G., Poquet, Y., Salek-Peyron, P., Puissegur, M.P., Botanch, C., Bon H, Levillain, F., Duteyrat, J.L., Emile, J.F., Altare, F. **2007**. Langhans giant cells from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *J Pathol*. 211(1):76-85.
- ⁹³ Gumperz, J.E., Brenner, M.B. **2001**. CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*. 13(4):471-8.
- ⁹⁴ Pitarque, S., Herrmann, J.L., Duteyrat, J.L., Jackson, M., Stewart, G., Lecointe, F., Payre, B., Schwartz, O., Young, D., Marchal, G., Lagrange, P., Puzo, G., Gicquel, B., Nigou, J., Neyrolles, O. **2005**. Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity. *Biochem J*. 392(3):615-24
- ⁹⁵ Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., Liu, Y.J. **2001**. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 194(6):863-9.
- ⁹⁶ Cooper, A.M. **2009**. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 27:393-422.
- ⁹⁷ Stenger, S., Niazi, K.R., Modlin, R.L. **1998**. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 161(7):3582-8.
- ⁹⁸ Yang, C.T., Cambier, C.J., Davis, J.M., Hall, C.J., Crosier, P.S., Ramakrishnan, L. **2012**. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe*. 12(3):301-12.
- ⁹⁹ Appelberg, R. **2007**. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing, *Trends Microbiol*. 15(2):87-92.
- ¹⁰⁰ Eum, S.Y., Kong, J.H., Hong, M.S., Lee, Y.J., Kim, J.H., Hwang, S.H., Cho, S.N., Via, L.E., Barry, C.E. **2010**. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*. 137(1):122-8.
- ¹⁰¹ O'gata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz, T., Lehrer, R.I., Catanzaro, A. **1992**. Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun*. 60(11):4720-5.

-
- ¹⁰² Korbelt, D., Schneider, B. y Schaible, U. **2008**. Innate Immunity in Tuberculosis: Myths and Truth. *Mic and Inf.* 10(9):995-1004.
- ¹⁰³ Tan, B.H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Bloom, B.R., Ganz, T., Modlin, R.L., Stenger, S. **2006**. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol.* 177(3):1864-71.
- ¹⁰⁴ Andersson, H., Andersson, B., Eklund, D., Ngoh, E., Persson, A., Svensson, K., Lerm, M., Blomgran, R., Stendahl, O. **2014**. Apoptotic neutrophils augment the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in human macrophages. *PLoS One.* 9(7):e101514.
- ¹⁰⁵ Seiler, P., Aichele, P., Bandermann, S., Hauser, A.E, Lu, B., Gerard, N.P, Gerard, C., Ehlers, S., Mollenkopf, H. J., Kaufmann, S. H. **2003**. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol.* 33(10):2676-86.
- ¹⁰⁶ Morris, D., Nguyen, T., Kim, J., Kassissa, C., Khurasany, M., Luong, J., Kasko, S., Pandya, S., Chu, M., Chi, P.T., Ly, J., Lagman, M., Venketaraman, V. **2013**. An elucidation of neutrophil functions against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol.* 2013:959650.
- ¹⁰⁷ Hilda, J.N., Narasimhan, M., Das, S.D. **2014**. Neutrophils from pulmonary tuberculosis patients show augmented levels of chemokines MIP-1 α , IL-8 and MCP-1 which further increase upon in vitro infection with mycobacterial strains. *Hum Immunol.* Aug;75(8):914-22.
- ¹⁰⁸ Orme, I.M., Robinson, R.T., Cooper, A.M. **2014**. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat Immunol.* 16(1):57-63.
- ¹⁰⁹ Yoneda, T., Ellner, J.J. 1998. CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 158(2):395-403.
- ¹¹⁰ Bozzano, F., Marras, F., De Maria, A. **2014**. Immunology of Tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 6(1):e2014027.
- ¹¹¹ Portevin, D., Via, L.E., Eum, S., Young, D. **2012**. Natural killer cells are recruited during pulmonary tuberculosis and their ex vivo responses to mycobacteria vary between healthy human donors in association with KIR haplotype. *Cell Microbiol.* 14(11):1734-44.
- ¹¹² Schierloh, P., Yokobori, N., Alemán, M., Landoni, V., Geffner, L., Musella, R.M., Castagnino, J., Baldini, M., Abbate, E., de la Barrera, S.S., Sasiain, M.C. **2007**. *Mycobacterium tuberculosis*-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infect Immun.* 75(11):5325-37.
- ¹¹³ Boom, W.H, Canaday, D.H., Fulton, S.A., Gehring, A.J., Rojas, R.E., Torres, M. **2003**. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb).* 83(1-3):98-106.
- ¹¹⁴ Meraviglia, S., El Daker, S., Dieli, F., Martini, F., Martino, A. **2011**. $\gamma\delta$ T cells cross-link innate and adaptive immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol.* 2011:587315.
- ¹¹⁵ Muñoz, S., Hernández-Pando, R., Abraham, S.N., Enciso, J.A. **2003**. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol.* 170(11):5590-6.

-
- ¹¹⁶ Carlos, D., Frantz, F.G., Souza-Júnior, D.A., Jamur, M.C., Oliver, C., Ramos, S.G., Quesniaux, V.F., Ryffel, B., Silva, C.L., Bozza, M.T., Faccioli, L.H. **2009**. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 11(8-9):770-8.
- ¹¹⁷ McCurdy, J.D., Olynych, T.J., Maher, L.H., Marshall, J.S. **2003**. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol.* 170(4):1625-9.
- ¹¹⁸ Taweewisit, M., Poumsuk, U. **2007**. High mast cell density associated with granulomatous formation in tuberculous lymphadenitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 38(1):115-9.
- ¹¹⁹ Shepard, C. C. **1955**. Phagocytosis by HeLa cells and their susceptibility to infection by human tubercle bacilli. *Proc Soc Exp Biol Med.* 90(2):392-6.
- ¹²⁰ Bermudez, L.E., Goodman, J. **1996**. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun.* 64(4):1400-6.
- ¹²¹ Harriff, M.J., Cansler, M.E., Toren, K.G., Canfield, E.T., Kwak, S., Gold, M.C., Lewinsohn, D.M. **2014**. Human lung epithelial cells contain *Mycobacterium tuberculosis* in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8⁺ T cells. *PLoS One.* 9(5):e97515.
- ¹²² Sharma, M., Sharma, S., Roy, S., Varma, S., Bose, M. **2007**. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol.* 85(3):229-37.
- ¹²³ Dorhoi, A.; Reece, S. T., Kaufmann, S. H. E. **2011**. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol Rev.* 240(1):235-51.
- ¹²⁴ Zhu, J., Paul, W.E. **2010**. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 20(1):4-12.
- ¹²⁵ Raja, A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120(4):213-32.
- ¹²⁶ Herbst, S., Schaible, U.E., Schneider, B.E. **2011**. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One.* 6(5):e19105.
- ¹²⁷ Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A. **1993**. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 178(6):2249-54.
- ¹²⁸ Szabo, S.J, Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. **2000**. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100(6):655-69.
- ¹²⁹ Ladel, C.H., Szalay, G., Riedel, D., Kaufmann, S.H. **1997**. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun.* 65(5): 1936–1938.
- ¹³⁰ Fulton, S.A., Johnsen, J.M., Wolf, S.F., Sieburth, D.S., Boom, W.H. **1996**. Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. *Infect Immun.* 64(7): 2523–2531.
- ¹³¹ Cooper, A. M., Magram, J., Ferrante, J., Orme, I. M. **1997**. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med.* 186(1):39-45.

-
- ¹³² Prochazkova, J., Pokorna, K., Holan, V. **2012**. IL-12 inhibits the TGF- β -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- β -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology*. 217(1):74-82.
- ¹³³ Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S.E., Samten, B., Girard, W.M., Barnes, P.F. **2000**. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis*. 182(1):234-9.
- ¹³⁴ Netea, M.G., Kullberg, B.J., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W. **2000**. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol*. 30(10):3057-60.
- ¹³⁵ Dorhoj, A., Kaufmann, S.H. **2014**. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Semin Immunol*. 26(3):203-9.
- ¹³⁶ Mootoo, A., Stylianou, E., Arias M.A., Reljic, R. **2009**. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 8(1):53-62.
- ¹³⁷ Bekker, L. G., Maartens, G., Steyn, L., Kaplan, G. **1998**. Selective increase in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis*. 178(2):580-4.
- ¹³⁶ Hsieh, S. M., Hung, C. C., Chen, M. Y., Sheng, W. H., Chang, S. C. **1999**. Dynamics of plasma cytokine levels in patients with advanced HIV infection and active tuberculosis: implications for early recognition of patients with poor response to anti-tuberculosis treatment. *AIDS*. 13(8):935-41.
- ¹³⁹ Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., Braun, M. M. **2001**. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 345(15):1098-104.
- ¹⁴⁰ Krishnan, N., Robertson, B.D., Thwaites, G. **2013**. Pathways of IL-1 β secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Tuberculosis (Edinb)*. 93(5):538-47.
- ¹⁴¹ Sims, J.E., Smith, D.E. **2010**. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 10(2):89-102.
- ¹⁴² Schenk, M., Fabri, M., Krutzik, S.R., Lee, D.J., Vu, D.M., Sieling, P.A., Montoya, D., Liu, P.T., Modlin, R.L. **2014**. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 141(2):174-80.
- ¹⁴³ Van Heyningen, T. K., Collins, H. L., Russell, D. G. **1997**. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J Immunol*. 158(1):330-7.
- ¹⁴⁴ Saunders, B.M., Frank, A.A., Orme, I.M., Cooper, A.M. **2000**. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 68(6):3322-6.
- ¹⁴⁵ Chen, C.Y., Huang, D., Yao, S., Halliday, L., Zeng, G., Wang, R.C., Chen, Z.W. **2012**. IL-2 simultaneously expands Foxp3⁺ T regulatory and T effector cells and confers resistance to severe tuberculosis (TB): implicative Treg-T effector cooperation in immunity to TB. *J Immunol*. 188(9):4278-88.
- ¹⁴⁶ Caramalho, I., Nunes-Silva, V., Pires, A.R., Mota, C., Pinto, A.I., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R.B., Sousa, A.E. **2015**. Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. *J Autoimmun*. 56:98-110.
-

-
- ¹⁴⁷ Kellar, K.L., Gehrke, J., Weis, S.E., Mahmutovic-Mayhew, A., Davila, B., Zajdowicz, M.J., Scarborough, R., LoBue, P.A., Lardizabal, A.A., Daley, C.L., Reves, R.R., Bernardo, J., Campbell, B.H., Whitworth, W.C., Mazurek, G.H. **2011**. Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with Mycobacterium tuberculosis antigens. *PLoS One*. 6(11):e26545.
- ¹⁴⁸ Khader, S.A., Cooper, A.M. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 41(2):79-83.
- ¹⁴⁹ Scriba, T.J., Kalsdorf, B., Abrahams, D.A., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., Hassan, H.Y., Wilkinson, R.J., Walz, G., Gelderbloem, S.J., Mahomed, H., Hussey, G.D., Hanekom, W.A. **2008**. Distinct, specific IL-17 and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol*. 180(3): 1962–1970.
- ¹⁵⁰ Li, Q., Li, J., Tian, J., Zhu, B., Zhang, Y., Yang, K., Ling, Y., Hu, Y. **2012**. IL-17 and IFN- γ production in peripheral blood following BCG vaccination and Mycobacterium tuberculosis infection in human. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 16(14):2029-36.
- ¹⁵¹ Torrado, E., Cooper, A.M. **2010**. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 21(6):455-62.
- ¹⁵² Jurado, J.O., Pasquinelli, V., Alvarez, I.B., Peña, D., Rovetta, A.I., Tateosian, N.L., Romeo, H.E., Musella, R.M., Palmero, D., Chuluyán, H.E., García, V.E. **2012**. IL-17 and IFN- γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J Leukoc Biol*. 91(6):991-1002.
- ¹⁵³ Cooper, A.M., Khader, S.A. **2008**. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev*. 226:191-204.
- ¹⁵⁴ Torchinsky, M.B., Blander, J.M. **2010**. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cell Mol Life Sci*. 67(9):1407-21.
- ¹⁵⁵ 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.
- ¹⁵⁶ Zhang, J., Qian, X., Ning, H., Eickhoff, C.S., Hoft, D.F., Liu, J. **2011**. Transcriptional suppression of interleukin-27 production by Mycobacterium tuberculosis-activated p38 MAPK via inhibition of AP-1 binding. *J Immunol*. 186(10): 5885–5895.
- ¹⁵⁷ Kalliolias, G.D., Gordon, R.A., Ivashkiv, L.B. **2010**. Suppression of TNF- α and IL-1 signaling identifies a mechanism of homeostatic regulation of macrophages by IL-27. *J Immunol*. 185(11):7047-56.
- ¹⁵⁸ Robinson, C.M., Nau, G.J. **2008**. Interleukin-12 and Interleukin-27 regulate macrophage control of Mycobacterium tuberculosis. *J Inf Dis*. 198(3):359-66.
- ¹⁵⁹ Gunluoglu, G., Yazar, E.E., Veske, N.S., Seyhan, E.C., Altin, S. **2014**. Platelet volume as an inflammation marker in active pulmonary tuberculosis. *Multidiscip Respir Med*. 9(1):11.
- ¹⁶⁰ Black, S., Kushner, I., Samols, D. 2004. C-reactive Protein. *J Of Biol Chem*. 19, 48487–48490.
- ¹⁶¹ Taha, D.A., Thanoon, I.A. **2009**. Antioxidant status, C-reactive protein and iron status in patients with pulmonary tuberculosis. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 10(3):361–369.

-
- ¹⁶² Rao, S., Bernhardt, V. **2009**. Serum C-Reactive Protein in Pulmonary Tuberculosis: Correlation With Bacteriological Load and Extent of Disease. *Infect Dis in Clin Prac.* 314-316.
- ¹⁶³ Valerio, J.A.E, C. M. , A. J.; y Pérez, E. M. **2007**. Proteína C reactiva, marcador inflamatorio asociado con ANCA en tuberculosis pulmonar. *Med Univ.* 9 (35): 58-63.
- ¹⁶⁴ Raja, A. **2004**. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120(4):213-32.
- ¹⁶⁵ O'Leary, S., O'Sullivan, M.P., Keane, J. **2011**. IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45(1):172-80.
- ¹⁶⁶ Toossi, Z., Ellner, J.J. **1998**. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 87(2):107-14.
- ¹⁶⁷ Brown, M. A. **2008**. IL-4 Production by T Cells: You Need a Little to Get a Lot. *J Immunol.* 181(5):2941-2.
- ¹⁶⁸ Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. **2004**. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25(12):677-86.
- ¹⁶⁹ Matucci, A., Maggi, E., Vultaggio, A. **2014**. Cellular and humoral immune responses during tuberculosis infection: useful knowledge in the era of biological agents. *J Rheumatol Suppl.* 91:17-23.
- ¹⁷⁰ Grotzke, J. E., Harriff, M.J., Siler, A.C., Nolt, D., Delepine, J., Lewinsohn, D. A., Lewinsohn, D. M. **2009**. The Mycobacterium tuberculosis Phagosome Is a HLA-I Processing Competent Organelle. *PLoS Pathog.* 5 (4): e1000374.
- ¹⁷¹ Barnes, P.F., Bloch, A.B., Davidson, P., Snider, D. **1991**. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 340(5):367-73.
- ¹⁷² Hopewell, P.C. **1992**. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management, and control of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 15(3):540-7.
- ¹⁷³ de Martino, M., Galli, L., Chiappini, E. **2014**. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein?. *BMC Infect Dis.* 14 Suppl 1:S1.
- ¹⁷⁴ Torchinsky, M.B., Blander, J.M. **2010**. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cell Mol Life Sci.* 67(9):1407-21.
- ¹⁷⁵ Kinjo, Y., Kawakami, K., Uezu K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., Takeda, K., Akira, S., Saito, A. **2002**. Contribution of IL- 18 to Th1 response and host defense against infection by Mycobacterium tuberculosis: a comparative study with IL- 12p40. *J Immunol.* 169(1):323-9.
- ¹⁷⁶ Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Harton, M., Palanisamy, G., Troudt, J., Shanley, C., Basaraba, R.J., Orme, I.M. **2007**. The hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J Immunol.* 179(1):522-31.
- ¹⁷⁷ He, X.Y., Xiao, L., Chen, H.B., Hao, J., Li, J., Wang, Y.J., He, K., Gao, Y., Shi, B.Y. **2010**. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(6):643-50.
- ¹⁷⁸ Philips, J.A., Ernst, J.D. **2012**. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol.* 7:353-84.

-
- ¹⁷⁹ Dlugovitzky, D., Luchesi, S., Torres Morales, A., Ruiz-Silva, J., Canosa, B., Valentini, E., Bottasso, O. **1995**. Circulating immune complexes in patients with advanced tuberculosis and their association with autoantibodies and reduced CD4+ lymphocytes. *Braz J Med Biol Res.* 28(3):331-5.
- ¹⁸⁰ Torres, M., Mendez-Samperio, P., Jimenez-Zamudio, L., Teran, L., Camarena, A., Quezada, R., Ramos, E., Sada, E. **1995**. Comparison of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. *Clin Exp Immunol.* 96(1):75-8.
- ¹⁸¹ Shauf, V., Rom, W.N., Smith, K.A., Sampaio, E.P., Meyn, P.A., Tramontana, J.M., Cohn, Z.A., Kaplan, G. **1993**. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculous patients. *J Infect Dis.* 168(4):1056-9.
- ¹⁸² Sodhi A, Gong JH, Silva C, Qian D, Barnes PF. **1997**. Clinical correlates of interferon c production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 25(3):617-20.
- ¹⁸³ Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T. **2005**. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6(11):1123-32.
- ¹⁸⁴ Damsker, J.M., Hansen, A.M., Caspi, R.R. **2010**. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 1183:211-21.
- ¹⁸⁵ Pedroza-Roldán, C., Barba, J., Flores-Valdez, M.A. **2012**. Th17: A New Player to be Considered in Tuberculosis Studies. *J Bacteriol Parasitol.* 3:e115.
- ¹⁸⁶ Tsai, H.C., Velichko, S., Hung, L.Y., Wu, R. **2013**. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. *Clin Dev Immunol.* 2013:267971.
- ¹⁸⁷ Peterson, R.A. **2012**. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* 40(2):186-204.
- ¹⁸⁸ Churina, E.G., Urazova, O.I., Novitskiy, V.V. **2012**. The role of foxp3-expressing regulatory T cells and T helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberc Res Treat.* 2012:931291.
- ¹⁸⁹ Marin, N.D., París, S.C., Vélez, V.M., Rojas, C.A., Rojas, M., García, L.F. **2010**. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 90(4): 252-61.
- ¹⁹⁰ Guyot-Revol, V., Innes, J.A., Hackforth, S., Hinks, T., Lalvani, A. **2006**. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Resp Critl Care Med.* 173(7):803-10.
- ¹⁹¹ Chen, X., Zhou, B., Li, M., Deng, Q., Wu, X., Le, X., Wu, C., Larmonier, N., Zhang, W., Zhang, H., Wang, H., Katsanis, E. **2007**. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol.* 123(1):50-9.
- ¹⁹² Ferraz, J.C., Melo, F.B., Albuquerque, M.F., Montenegro, S.M., Abath, F.G. **2006**. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 39(11):1387-97.

-
- ¹⁹³ Lim, H.J., Park, J.S., Cho, Y.J., Yoon, H.I., Park, K.U., Lee, C.T., Lee, J.H. **2013**. CD4(+)FoxP3(+) T regulatory cells in drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 93(5):523-8.
- ¹⁹⁴ Goldfeld, A.E. **2004**. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *Tuberculosis*. 84: 76-81.
- ¹⁹⁵ Tan, J.S., Canaday, D.H., Boom, W.H., Balaji, K.N., Schwander, S.K., Rich, E.A. **1997**. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol*. 159(1):290-7.
- ¹⁹⁶ Canaday, D.H., Ziebold, C., Noss, E.H., Chervenak, K.A., Harding, C.V., Boom, W.H. **1999**. Activation of human CD8+ ab TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J Immunol*. 162(1):372-9.
- ¹⁹⁷ Canaday, D.H., Wilkinson, R.J., Li, Q., Harding, C.V., Silver, R.F., Boom, W.H. **2001**. CD4+ and CD8+ T cells kill intracellular *M. tuberculosis* by a perforin and FAS/FASL independent mechanism. *J Immunol*. 167(5):2734-42.
- ¹⁹⁸ Lazarevic, V., Nolt, D., Flynn, J.L. **2005**. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses. *J Immunol*. Jul 15;175(2):1107-17.
- ¹⁹⁹ Steinman L. **2004**. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol*. 5(6):575-81.
- ²⁰⁰ Haddad, J.J., Saadé, N.E., Safieh-Garabedian, B. **2002**. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol*. 133(1-2):1-19.
- ²⁰¹ Webster, J.I., Tonelli, L., Sternberg, E.M. **2002**. Neuroendocrine Regulation of Immunity. *Annu Rev Immunol*. 20:125-63.
- ²⁰² Turnbull, A.V., Rivier, C.L. **1999**. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 79(1):1-71.
- ²⁰³ Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K. **2006**. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 5(3):243-51.
- ²⁰⁴ Tomlinson JW1, Stewart PM. **2001**. Cortisol metabolism and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 15(1):61-78.
- ²⁰⁵ Zhou, J., Cidlowski, J.A. **2005**. The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 70(5-7):407-17.
- ²⁰⁶ Rook, G.A. **1999**. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 13(4):567-81.
- ²⁰⁷ Seckl, J.R., Walker, B.R. **2001**. Minireview: 11 -hydroxysteroid dehydrogenase type 1—atissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*. 142(4):1371-6.
- ²⁰⁸ Busillo, J.M., Cidlowski, J.A. **2013**. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*. 24(3): 109–119.
- ²⁰⁹ Bamberger, C.M., Bamberger, A.M., de Castro, M., Chrousos, G.P. **1995**. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest*. 95(6):2435-41.

-
- ²¹⁰ Hausmann, M., Herfarth, H., Schölmerich, J., Rogler, G. **2007**. Glucocorticoid receptor isoform expression does not predict steroid treatment response in IBD. *Gut*. 56(9):1328-9.
- ²¹¹ Yudit, M.R., Jewell, C.M., Bienstock, R.J., Cidlowski, J.A. **2003**. Molecular Origins for the Dominant Negative Function of Human Glucocorticoid Receptor Beta. *Mol Cell Biol*. 23(12):4319-30.
- ²¹² Hamid, Q.A., Wenzel, S.E., Hauk, P.J., Tscopoulos, A., Wallaert, B., Lafitte, J.J. **1999**. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 159(5 Pt 1):1600-4.
- ²¹³ Sousa, A.R., Lane, S.J., Cidlowski, J.A., Staynov, D.Z., Lee, T.H. **2000**. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol*. 105(5):943-50.
- ²¹⁴ Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, Kohgo, Y. **2000**. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 118(5):859-66.
- ²¹⁵ Webster, J.C., Oakley, R.H., Jewell, C.M., Cidlowski J.A. **2001**. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(12):6865-70.
- ²¹⁶ McKay, L.I., Cidlowski, J.A. **1998**. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol*. 12(1):45-56.
- ²¹⁷ Franchimont, D. **2004**. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci*. 1024:124-37.
- ²¹⁸ Ehrchen, J., Steinmüller, L., Barczyk, K., Tenbrock, K., Nacken, W., Eisenacher, M., Nordhues, U., Sorg, C., Sunderkötter, C., Roth, J. **2007**. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood*. **2007** Feb 1;109(3):1265-74.
- ²¹⁹ Vallelian, F., Schaer, C.A., Kaempfer, T., Gehrig, P., Duerst, E., Schoedon, G., Schaer, D.J. **2010**. Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and antioxidant capacity. *Blood*. 116(24):5347-56.
- ²²⁰ Elftman, M.D., Norbury, C.C., Bonneau, R.H., Truckenmiller, M.E. **2007**. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. *Immunology*. 122(2):279-90.
- ²²¹ Hontelez, S., Karthaus, N., Looman, M.W., Ansems, M., Adema, G.J. **2013**. DC-SCRIPT regulates glucocorticoid receptor function and expression of its target GILZ in dendritic cells. *J Immunol*. 190(7):3172-9.
- ²²² Luther, C., Adamopoulou, E., Stoeckle, C., Brucklacher-Waldert, V., Rosenkranz, D., Stoltze, L., Lauer, S., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E. **2009**. Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *J Immunol*. 183(2):841-8.
- ²²³ Rutella, S., Lemoli, R.M. **2004**. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett*. 94(1-2):11-26.

-
- ²²⁴ Bellavance, M.A., Rivest, S. **2014**. The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front Immunol.* 5:136.
- ²²⁵ Besedovsky, L., Born, J., Lange, T. **2014**. Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4. *FASEB J.* 28(1):67-75.
- ²²⁶ Bianchi, M., Meng, C., Ivashkiv, L.B. **2000**. Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(17):9573-8.
- ²²⁷ Baschant, U., Tuckermann, J. **2010**. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 120(2-3):69-75.
- ²²⁸ Rabbitt, E.H., Lavery, G.G., Walker, E.A., Cooper, M.S., Stewart, P.M., Hewison, M. **2002**. Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *FASEB J.* 16(1):36-44.
- ²²⁹ Chapman, K.E., Coutinho, A., Gray, M., Gilmour, J.S., Savill, J.S., Seckl, J.R. **2006**. Local amplification of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci.* 1088:265-73.
- ²³⁰ Draper, N., Stewart, P.M. **2005**. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol.* 186(2):251-71.
- ²³¹ Chapman, K., Holmes, M., Seckl, J. **2013**. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev.* 93(3):1139-206.
- ²³² Kalimi, M., Shafagoj, Y., Loria, R., Padgett, D., Regelson, W. **1994**. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol and Cell Bioch.* 131(2):99-104.
- ²³³ Hennebold, J.D., Daynes, R.A. **1994**. Regulation of macrophage dehydroepiandrosterone sulfate metabolism by inflammatory cytokines. *Endocrinology.* ;135(1):67-75.
- ²³⁴ Schmidt, M., Kreutz, M., Löffler, G., Schölmerich, J., Straub, R.H. **2000**. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J Endocrinol.* 164(2):161-9.
- ²³⁵ Greenspan, F.S. **1991**. *Basic and Clinical Endocrinology*. East Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange.
- ²³⁶ Traish, A.M., Kang, H.P., Saad, F., Guay, A.T. **2011**. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J Sex Med.* 8(11):2960-82.
- ²³⁷ Straub, R.H., Lehle, K., Herfarth, H., Weber, M., Falk, W., Preuner, J., Scholmerich, J. **2002**. Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: role of interleukin-6 and tumour necrosis factor. *Eur J Endocrinol.* 146(3):365-74.
- ²³⁸ Yang, N., Jeng, K.C., Ho, W.M., Chou, S.J., 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.
- ²³⁹ Mahuad, C. **2004**. Regulación Inmunoneuroendócrina de la Respuesta Inmune. Estudios en Pacientes Tuberculosos con distinto grado de afectación pulmonar. Tesis doctoral. Facultad de Cs. Biomédicas. U.N.R. Argentina. Pg. 18-28

-
- ²⁴⁰ 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):377-85.
- ²⁴¹ Loria, R.M., Padgett, D.A. **1993**. Androstenediol regulates systemic resistance against lethal infections in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 685:293-5.
- ²⁴² Padgett, D.A., Sheridan, J.F., Loria, R.M. **1995**. Steroid hormone regulation of a polyclonal TH2 immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 774:323-5.
- ²⁴³ Suzuki, T., Suzuki, N., Daynes, R.A., Engleman, E.G. **1991**. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 61(2-1):202-11.
- ²⁴⁴ Angerami, M., Suarez, G., Pascutti, M.F., Salomon, H., Bottasso, O., Quiroga, M.F. **2013**. Modulation of the phenotype and function of Mycobacterium tuberculosis-stimulated dendritic cells by adrenal steroids. *Int Immunol*. 25(7):405-11.
- ²⁴⁵ Kipper-Galperin, M., Galilly, R., Danenberg, H.D., Brenner, T. **1999**. Dehydroepiandrosterone selectively inhibits production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 17(8):765-75.
- ²⁴⁶ Ramírez, J.A., Bruttomesso, A.C., Michelini, F.M., Acebedo, S.L., Alché, L.E., Galagovsky, L.R. **2007**. Syntheses of immunomodulating androstanes and stigmastanes: comparison of their TNF-alpha inhibitory activity. *Bioorg Med Chem*. 15(24):7538-44.
- ²⁴⁷ López-Marure, R., Huesca-Gómez, C., Ibarra-Sánchez, M.J., Zentella, A., Pérez-Méndez, O. **2007**. Dehydroepiandrosterone delays LDL oxidation in vitro and attenuates several oxLDL-induced inflammatory responses in endothelial cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 6(3):174-82.
- ²⁴⁸ Kim, S.K., Shin, M.S., Jung, B.K., Shim, J.Y., Won, H.S., Lee, P.R., Kim, A. **2006**. Effect of dehydroepiandrosterone on lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production in DH82 cultured canine macrophage cells. *J Reprod Immunol*. 70(1-2):71-81.
- ²⁴⁹ Mahuad, C.1, Bay, M.L., Farroni, M.A., Bozza, V., Del Rey, A., Besedovsky, H., 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):639-46.
- ²⁵⁰ Kroboth, P.D., Salek, F.S., Pittenger, A.L., Fabian, T.J., Frye, R.F. **1999**. DHEA and DHEA-S: a review. *J.Clin.Pharmacol*. 39 (4): 327-348.
- ²⁵¹ Hernandez-Pando, R., de la Luz, S.M., Orozco, H., Arriaga, K., Pavon, L., Marti, O., Lightman, S.L., Rook, G.A. **1998**. Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *QJM*. 91 (11): 755-766.
- ²⁵² Watson, R.R., Huls, A., Araghinikam, M., Chung, S. **1996**. Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. *Drugs Aging*. 9(4):274-91.
- ²⁵³ Danenberg, H.D., Ben-Yehuda, A., Zakay-Rones, Z., Friedman, G. **1995**. Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment reverses the impaired immune response of old mice to influenza vaccination and protects from influenza infection. *Vaccine*. 13(15):1445-8.

-
- ²⁵⁴ Rey, A.D., Mahuad, C.V., Bozza, V.V., Bogue, C., Farroni, M.A., Bay, M.L., Bottasso, O.A., Besedovsky, H.O. **2007**. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav.Immun.* 21 (2): 171-179.
- ²⁵⁵ Bozza, V.V., D'Attilio, L., Mahuad, C.V., Giri, A.A., Del Rey, A., Besedovsky, H., Bottasso, O., 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.
- ²⁵⁶ D'Attilio, L., Trini, E., Bongiovanni, B., Dídoli, G., Gardeñez, W., Nannini, L.J., Giri, A., Bottasso, O.A., Bay, M.L. **2011**. mRNA expression of alpha and beta isoforms of glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear cells of patients with tuberculosis and its relation with components of the immunoendocrine response. *Brain Behav Immun.* 25(3):461-7.
- ²⁵⁷ Molenaar, E.T., Voskuyl, A.E., Familian, A., van Mierlo, G.J., Dijkmans, B.A., Hack, C.E. **2001**. Complement activation in patients with rheumatoid arthritis mediated in part by C-reactive protein. *Arthritis Rheum.* 44(5):997-1002.
- ²⁵⁸ Sheldon, J. **2004**. Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 18(3):249-69.
- ²⁵⁹ Besedovsky, H.O., del Rey, A. **1996**. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17(1):64-102.
- ²⁶⁰ Turnbull, A.V., Rivier, C.L. **1999**. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):1-71.
- ²⁶¹ Giltay, E.J., Fonk, J.C., von Blomberg, B.M., Drexhage, H.A., Schalkwijk, C., Gooren, L.J. **2000**. In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(4):1648-57.
- ²⁶² Dlugovitzky, D., Torres-Morales, A., Rateni, L., Farroni, M.A., Largacha, C., Molteni, O., Bottasso, O. **1997**. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 18(3):203-7.
- ²⁶³ Orii, F., Ashida, T., Nomura, M., Maemoto, A., Fujiki, T., Ayabe, T., Imai, S., Saitoh, Y., Kohgo, Y. **2002**. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(5):1286-94
- ²⁶⁴ Straub, R.H., Besedovsky, H.O. **2003**. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J.* 17(15):2176-83.
- ²⁶⁵ He, J.Q., Sandford, A.J., Wang, I.M., Stepaniants, S., Knight, D.A., Kicic, A., Stick, S.M., Paré, P.D. **2008**. Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 32(3):755-62.
- ²⁶⁶ Orii, F., Ashida, T., Nomura, M., Maemoto, A., Fujiki, T., Ayabe, T., Imai, S., Saitoh, Y., Kohgo, Y. **2002**. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(5):1286-94.
- ²⁶⁷ Mazzocchi, G., Rossi, G.P., Neri, G., Malendowicz, L.K., Albertin, G., Nussdorfer, G.G. **1998**. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity in the human adrenal cortex. *FASEB J.* 12(14):1533-9.

-
- ²⁶⁸ D'Attilio, L.D. **2012**. Regulación Inmunoendócrina. Estudios en pacientes tuberculosos con distinto grado de afectación pulmonar. Relación entre la expresión de receptores para glucocorticoides y la severidad de la tuberculosis. Tesis doctoral. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. Argentina. Pg.51.
- ²⁶⁹ D'Attilio, L., Díaz, A., Santucci, N., Bongiovanni, B., Gardeñez, W., Marchesini, M., Bogué, C., Dívoli, G., Bottasso, O., Bay, M.L. **2013**. Levels of inflammatory cytokines, adrenal steroids, and mRNA for GR α , GR β and 11 β HSD1 in TB pleurisy. *Tuberculosis (Edinb)*. 93(6):635-41.
- ²⁷⁰ Organización Mundial de la Salud. Datos y cifras sobre la obesidad. Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>
- ²⁷¹ Bottasso, O., Bay, M.L., Besedovsky, H., del Rey, A. **2007**. The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand J Immunol*. 66(2-3):166-75.
- ²⁷² Bottasso, O., Bay, M.L., Besedovsky, H., Del Rey, A. **2013**. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci*. 53:77-85.
- ²⁷³ Schwenk, A., Macallan, D.C. **2000**. Tuberculosis, malnutrition and wasting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 3(4):285-91.
- ²⁷⁴ Mahuad, C., Bozza, V., Pezzotto, S.M., Bay, M.L., Besedovsky, H., del Rey, A., Bottasso, O. **2007**. Impaired immune responses in tuberculosis patients are related to weight loss that coexists with an immunoendocrine imbalance. *Neuroimmunomodulation*. 14(3-4):193-9.
- ²⁷⁵ Bottasso, O., Bay, M.L., Besedovsky, H., Del Rey, A. **2009**. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci*. 53:77-85.
- ²⁷⁶ Karyadi, E., Dolmans, W.M., West, C.E., Van Crevel, R., Nelwan, R.H., Amin, Z., Gross, R., Van der Ven-Jongekrijg, J., Van der Meer, J.W. **2007**. Cytokines related to nutritional status in patients with untreated pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Asia Pac J Clin Nutr*. 16(2):218-26.
- ²⁷⁷ Sinclair, D., Abba, K., Grobler, L., Sudarsanam, T.D. **2011**. Nutritional supplements for people being treated for active tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev*. (11):CD006086.
- ²⁷⁸ Gupta, K.B., Gupta, R., Atreja, A., Verma, M., Vishvkarma, S. 2009. Tuberculosis and nutrition. *Lung India*. 26(1):9-16.
- ²⁷⁹ Odone, A., Houben, R.M., White, R.G., Lönnroth, K. **2014**. The effect of diabetes and undernutrition trends on reaching 2035 global tuberculosis targets. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2(9):754-64.
- ²⁸⁰ Chandra, R.K. **1997**. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr*. 66:460S-463S.
- ²⁸¹ Macallan, D.C. **1999**. Malnutrition in tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 34(2):153-7.
- ²⁸² Lönnroth, K., Williams, B.G., Cegielski, P., Dye, C. **2010**. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. *Int J Epidemiol*. 39(1):149-55.
- ²⁸³ Karyadi, E., Schultink, W., Nelwan, R.H., Gross, R., Amin, Z., Dolmans, W.M., van der Meer, J.W., Hautvast, J.G., West, C.E. **2000**. Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis in Indonesia. *J Nutr*. 130(12):2953-8.
- ²⁸⁴ Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P. **2009**. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 10(6):397-409.

-
- ²⁸⁵ Busillo, J.M., Azzam, K.M., Cidlowski, J.A. **2011**. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 286(44):38703-13.
- ²⁸⁶ Weber, P.S., Toelboell, T., Chang, L.C., Tirrell, J.D., Saama, P.M., Smith, G.W., Burton, J.L. **2004**. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J Leukoc Biol*. 75(5):815-27.
- ²⁸⁷ Molitoris, J.K., McColl, K.S., Swerdlow, S., Matsuyama, M., Lam, M., Finkel, T.H., Matsuyama, S., Distelhorst, C.W. **2011**. Glucocorticoid elevation of dexamethasone-induced gene 2 (Dig2/RTP801/REDD1) protein mediates autophagy in lymphocytes. *J Biol Chem*. 286(34):30181-9.
- ²⁸⁸ Purton, J.F., Monk, J.A., Liddicoat, D.R., Kyparissoudis, K., Sakkal, S., Richardson, S.J., Godfrey, D.I., Cole, T.J. **2004**. Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death. *J Immunol*. 173(6):3816-24.
- ²⁸⁹ Wright, H.L., Cross, A.L., Edwards, S.W., Moots, R.J. **2014**. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 53(7):1321-31.
- ²⁹⁰ Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F., Akiyama, Y. **1989**. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*. 74(4):1241-4.
- ²⁹¹ Sahin, F., Yazar, E., Yıldız, P. **2012**. Prominent features of platelet count, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in pulmonary tuberculosis. *Multidiscip Respir Med*. 7(1):38.
- ²⁹² Kaushansky, K. **2005**. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 115(12):3339-47.
- ²⁹³ Cem Gabay, M.D., Irving Kushner, M.D. **1999**. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med*. 340(6):448-54.
- ²⁹⁴ Caruso, A.M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B.R., Flynn, J.L. **1999**. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*. 162(9):5407-5416.
- ²⁹⁵ Scanga, C.A., Mohan, V.P., Yu, K., Joseph, H., Tanaka, K., Chan, J., Flynn, J.L. **2000**. Depletion of CD4 (+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med*. 192(3):347-358.
- ²⁹⁶ Raviglione, M.C., Snider, D.E., Kochi, A. **1995**. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of world wide epidemic. *Ja Ma*. 273:220-6.
- ²⁹⁷ Lawn, S.D., Bekker, L.G., Middelkoop, K., Myer, L., Wood, R. **2006**. Impact of HIV infection on the epidemiology of tuberculosis in a peri-urban community in South Africa: the need for age-specific interventions. *Clin Infect Dis*. 42(7):1040-7.
- ²⁹⁸ Lewinsohn, D.A., Heinzl, A.S., Gardner, J.M., Zhu, L., Alderson, M.R., Lewinsohn, D.M. **2003**. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells preferentially recognize heavily infected cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 168(11):1346-52.
- ²⁹⁹ Behar, S.M. 2013. Antigen-specific CD8(+) T cells and protective immunity to tuberculosis. *Adv Exp Med Biol*. 783:141-63.
-

-
- ³⁰⁰ Uppal, S.S., Tewari, S.C., Verma, S., Dhot, P.S. **2004**. Comparison of CD4 and CD8 lymphocyte counts in HIV-negative pulmonary TB patients with those in normal blood donors and the effect of antitubercular treatment: hospital-based flow cytometric study. *Cytometry B Clin Cytom.* 61(1):20-6.
- ³⁰¹ Davoudi, S., Rasoolinegad, M., Younesian, M., Hajiabdolbaghi, M., Soudbakhsh, A., Jafari, S., EmadiKouchak, H., Mehrpouya, M., Lotfi, H. **2009**. CD4+ cell counts in patients with different clinical manifestations of tuberculosis. *Braz J Infect Dis.* 12(6):483-6.
- ³⁰² Al-Aska, A., Al-Anazi, A.R., Al-Subaei, S.S., Al-Hedaithy, M.A., Barry, M.A., Somily, A.M., Buba, F., Yusuf, U., Al Anazi, N.A. **2011**. CD4+ T-lymphopenia in HIV negative tuberculous patients at King Khalid University Hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Eur J Med Res.* 16(6):285-8.
- ³⁰³ Li, X., McKinstry, K.K., Swain, S.L., 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):939-49.
- ³⁰⁴ Hougardy, J.M., Place, S., Hildebrand, M., Drowart, A., Debrie, A.S., Loch, C., Mascart, F. **2007**. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 176(4):409-16.
- ³⁰⁵ Guyot-Revol, V., Innes, J.A., Hackforth, S., Hinks, T., Lalvani, A. **2006**. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 173(7):803-10.
- ³⁰⁶ Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T. **2009**. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?. *Int Immunol.* 21(10):1105-11.
- ³⁰⁷ Santucci, N., D'Attilio, L., Kovalevski, L., Bozza, V., Besedovsky, H., del Rey, A., Bay, M.L., Bottasso, O. **2011**. A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 6(10):e26363
- ³⁰⁸ Boussiotis, V.A., Tsai, E.Y., Yunis, E.J., Thim, S., Delgado, J.C., Dascher, C.C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J.M., Goldfeld, A.E. **2000**. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest.* 105(9):1317-25.
- ³⁰⁹ Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L., Randall, T.D., Cooper, A.M. **2007**. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* 8(4):369-77.
- ³¹⁰ Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M.D., Watanabe, H., Kawakami, K., Suda, T., Sudo, K., Nakae, S., Iwakura, Y., Matsuzaki, G. **2007**. IL-17-Mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol.* 178(6):3786-96.
- ³¹¹ Xiang, L., Marshall, G.D. **2011**. Immunomodulatory effects of in vitro stress hormones on FoxP3, Th1/Th2 cytokine and costimulatory molecule mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Neuroimmunomodulation.* 18(1):1-10.
- ³¹² Quiroga, M.F., Angerami, M.T., Santucci, N., Ameri, D., Francos, J.L., Wallach, J., Sued, O., Cahn, P., Salomón, H., Bottasso, O. **2012**. Dynamics of Adrenal Steroids are Related to Variations in

-
- Th1 and Treg Populations during Mycobacterium tuberculosis Infection in HIV Positive Persons. *PLoS One*. 7(3):e33061.
- ³¹³ Nagabhushanam, V., Solache, A., Ting, L.M., Escaron, C.J., Zhang, J.Y., Ernst, J.D. **2003**. Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol*. 171(9):4750-7.
- ³¹⁴ Chowdhury, I.H., Ahmed, A.M., Choudhuri, S., Sen, A., Hazra, A., Pal, N.K., Bhattacharya, B., Bahar, B. **2014**. Alteration of serum inflammatory cytokines in active pulmonary tuberculosis following anti-tuberculosis drug therapy. *Mol Immunol*. 62(1):159-68.
- ³¹⁵ Verbon, A., Juffermans, N., Van Deventer, S.J., Speelman, P., Van Deutekom, H., Van Der Poll, T. **1999**. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol*. 115(1):110-3.
- ³¹⁶ Lebrethon, M.C., Jaillard, C., Naville, D., Bégeot, M., Saez, J.M. **1994**. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human adrenocortical fasciculata-reticularis cell differentiated functions. *J Clin Endocrinol Metab*. 79(4):1033-9.
- ³¹⁷ Liakos, P., Lenz, D., Bernhardt, R., Feige, J.J., Defaye, G. **2003**. Transforming growth factor beta1 inhibits aldosterone and cortisol production in the human adrenocortical cell line NCI-H295R through inhibition of CYP11B1 and CYP11B2 expression. *J Endocrinol*. 176(1):69-82.
- ³¹⁸ Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A., Vinson, G.P. **1998**. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 19(2):101-43.
- ³¹⁹ D'Attilio, L., Bozza, V.V., Santucci, N., Bongiovanni, B., Dídoli, G., Radcliffe, S., Besedovsky, H., del Rey, A., Bottasso, O., Bay, M.L. **2012**. TGF- β neutralization abrogates the inhibited DHEA production mediated by factors released from M. tuberculosis-stimulated PBMC. *Ann N Y Acad Sci*. 1262:1-9.
- ³²⁰ Straub, R.H., Cutolo, M. **2006**. Further evidence for insufficient hypothalamic-pituitary-glandular axes in polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol*. 33(7):1219-23.
- ³²¹ Kulkarni, A., Madras, N.A. **2008**. Relationship of nitric oxide and protein carbonyl in tuberculosis. *Indian J Tuberc*. 55(3):138-44.
- ³²² Rosenfeld, R.S., Hellman, L., Gallagher, T.F. **1972**. Metabolism and interconversion of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate. *J Clin Endocrinol Metab*. 35(2):187-93.
- ³²³ Straub, R.H., Härle, P., Yamana, S., Matsuda, T., Takasugi, K., Kishimoto, T., Nishimoto, N. **2006**. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy favors adrenal androgen secretion in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*. 54(6):1778-85.
- ³²⁴ Katzung, B., Masters, S., Trevor, A. **2009**. Basic and Clinical Pharmacology, 11th Edition. The McGraw-Hill Companies Inc, NY, USA.
- ³²⁵ Francois Venter, W.D., Panz, V.R., Feldman, C., Joffe, B.I. **2006**. Adrenocortical function in hospitalised patients with active pulmonary tuberculosis receiving a rifampicin-based regimen - a pilot study. *S Afr Med J*. 96(1):62-6.

-
- ³²⁶ Gross, K.L., Lu, N.Z., Cidlowski, J.A. **2009**. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 300(1-2):7-16.
- ³²⁷ Pujols, L., Mullol, J., Picado, C. **2010**. Importance of glucocorticoid receptors in upper and lower airways. *Front Biosci (Landmark Ed).* 15:789-800.
- ³²⁸ Chapman, K.E., Gilmour, J.S., Coutinho, A.E., Savill, J.S., Seckl, J.R. **2006**. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1--a role in inflammation?. *Mol Cell eEndocrinol.* 248(1-2):3-8.
- ³²⁹ Zhang, T.Y., Ding, X., Daynes, R.A. **2005**. The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J Immunol.* 174(2):879-89.
- ³³⁰ Freeman, L., Hewison, M., Hughes, S.V., Evans, K.N., Hardie, D., Means, T.K., Chakraverty, R. **2005**. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood.* 106(6):2042-9.
- ³³¹ Thieringer, R., Le Grand, C.B., Carbin, L., Cai, T.Q., Wong, B., Wright, S.D., Hermanowski-Vosatka, A. **2001**. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol.* 167(1):30-5.
- ³³² Gilmour, J.S., Coutinho, A.E., Cailhier, J.F., Man, T.Y., Clay, M., Thomas, G., Harris, H.J., Mullins, J.J., Seckl, J.R., Savill, J.S., Chapman, K.E. **2006**. Local amplification of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol.* 176(12):7605-11.
- ³³³ Wamil, M., Seckl, J.R. **2007**. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target. *Drug Discov Today.* 12(13-14):504-20.
- ³³⁴ Straub, R.H., Paimela, L., Peltomaa, R., Schölmerich, J., Leirisalo-Repo, M. **2002**. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(3):654-62.