



Universidad Nacional de Rosario  
Facultad de Ciencias Médicas

GMD Facultad Cs. Médicas  
Biblioteca  
  
TDM 2399



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS DE LOS POTENCIALES MECANISMOS  
INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN INMUNOMODULADORA  
DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y SUS DEFICIENCIAS EN  
PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR**

Tesis para optar el título de DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

**Lic. Georgina Gallucci**

**Director: Luciano D'Attilio**

**Co-directora: Natalia Santucci**

**Lugar de realización: Instituto de Inmunología Clínica  
y Experimental Rosario**

**2023**

# Rosario, Argentina



## Índice

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Tuberculosis	1
1.1.1	Tuberculosis en Argentina .....	2
1.1.2	Transmisión y síntomas de la Tuberculosis .....	3
1.1.3	Diagnóstico y algunas consideraciones .....	4
1.1.4	Prevención y Tratamiento .....	6
1.2	Patofisiología de la Tuberculosis	8
1.3	Respuesta inmune contra Mycobacterium tuberculosis	11
1.4	Comunicación bidireccional entre los sistemas inmune y endocrino	23
1.4.1	Dehidroepiandrosterona .....	26
1.4.2	Glucocorticoides .....	27
1.4.3	Receptor de glucocorticoides.....	28
1.4.4	Estructura genómica del receptor de glucocorticoides .....	29
1.4.5	Mecanismos de señalización del cortisol .....	34
1.4.6	Mecanismos de acción mediado por el receptor de glucocorticoides	36
1.4.7	Genes regulados por el receptor de glucocorticoides.....	39
1.4.8	Genes regulados positivamente por el receptor de glucocorticoides y relacionados con procesos antiinflamatorios e inmunosupresores. ....	39

1.4.9	Genes regulados negativamente por el receptor de glucocorticoides y relacionados con procesos inflamatorios e inmunoestimuladores. ....	46
1.5	DESREGULACION INMUNO ENDOCRINA EN LA TUBERCULOSIS	49
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	53
2.1	CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS	53
2.2	Objetivos generales	54
2.3	Objetivos específicos:	54
2.3.1	Objetivo 1.....	54
2.3.2	Objetivo 2.....	55
2.3.3	Objetivo 3.....	56
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.1	Grupos de estudio	58
3.1.1	Pacientes con Tuberculosis pulmonar .....	58
3.1.2	Pacientes con Tuberculosis pleural .....	58
3.1.3	Controles sanos.....	59
3.2	Recolección de muestras de sangre y parámetros clínicos.	60
3.3	Parámetros bioquímicos	60
3.4	Obtención de glóbulos blancos totales y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	61
3.4.1	Recolección y procesamiento de muestras de exudado pleural ..	62
3.5	Ensayo de linfoproliferación	62

3.6	Cuantificación de mediadores solubles	63
3.6.1	Cuantificación de citocinas, hormonas y proteína C reactiva en plasma o fluido pleural.....	63
3.6.2	Determinación de lipopolisacárido en plasma.....	63
3.7	Cuantificación de transcritos	64
3.7.1	Aislamiento de ARN.....	64
3.7.2	Síntesis de ADN complementario y qPCR.....	65
3.8	Condiciones finales del protocolo optimizado del Ensayo <i>in vitro</i> para la determinación de la sensibilidad a Glucocorticoides en pacientes con Tuberculosis pulmonar y controles sanos.	67
3.9	Análisis estadístico	68
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	70
4.1	CAPITULO I	70
4.1.1	Características generales de los grupos de estudios correspondientes a los objetivos 1 y 2.....	70
4.1.2	Análisis de los parámetros bioquímicos.....	73
4.1.3	Evaluación de la relación entre los niveles circulantes de parámetros inmuno-endócrinos e inflamatorios con la expresión de las isoformas del receptor de glucocorticoides.....	77
4.1.4	Discusión capítulo I.....	82
4.2	CAPÍTULO II	87

4.2.1	Evaluación de los niveles de expresión de genes regulados positiva y negativamente por el receptor de glucocorticoides y sus respectivas correlaciones con los mediadores del perfil inmuno-endocrino. ....	87
4.2.2	Evaluación <i>in vitro</i> de la sensibilidad a glucocorticoides de células de pacientes con tuberculosis pulmonar y controles sanos .....	95
4.2.3	Evaluación de la sensibilidad a glucocorticoides de leucocitos provenientes de pacientes con tuberculosis pulmonar y controles sanos estimulados con LPS o <i>Mtbi</i> . ....	96
4.2.4	Evaluación de la sensibilidad a glucocorticoides de células mononucleares periféricas provenientes de pacientes con TBP y controles sanos estimulados con <i>Mtbi</i> . ....	99
4.2.5	Discusión capítulo II .....	102
4.3	CAPITULO III	110
4.3.1	Características de los pacientes con TBPL .....	110
4.3.2	Perfil inmuno-endócrino a nivel plasmático y en pleura de pacientes con TBPL.	111
4.3.3	Cuantificación de los niveles de expresión de genes regulados por el receptor de glucocorticoides en células mononucleares de fluido pleural y sangre periférica en pacientes con TBPL .....	113
4.3.4	Evaluación de la capacidad linfoproliferativa frente al estímulo específico de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> irradiado en células mononucleares del fluido pleural y de sangre periférica provenientes de pacientes con tuberculosis pleural. ....	117

4.3.5	Análisis de correlación entre la expresión diferencial de genes regulados por el receptor de glucocorticoides y el perfil inmuno-endocrino del sitio local de la infección y a nivel sistémico. ....	118
4.3.6	Discusión Capítulo 3 .....	119
5	CONCLUSIONES .....	124
6	ANEXO 1 .....	127
6.1	Optimización de las condiciones experimentales del ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la sensibilidad a Glucocorticoides. ....	127
6.1.2	Optimización de las condiciones experimentales del ensayo <i>in vitro</i> a partir de leucocitos totales y células mononucleares de sangre periférica. ...	133
6.2	Evaluación del efecto de las concentraciones de estímulo con Lipopolisacárido y de los disolventes de DEX sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica. ....	134
7	BIBLIOGRAFÍA.....	137

## Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
Ag	Antígenos
ALT	Alanina Aminotransferasa
ANXA1	Anexina A1
AP-1	Proteína activadora 1
AST	Aspartato Aminotransferasa
AVP	Arginina vasopresina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCR	Receptor de células B
BFS	Buffer fosfato salino
CBG	Globulina transportadora de corticosteroides
CD	Células dendríticas
CMFP	Células mononucleares de fluido pleural
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMP	Células mononucleares de sangre periférica
ConA	Concanavalina A
CPA	Células presentadoras de antígenos
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DEX	Dexametasona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DP	Derrame pleural
FA	Fosfatasa alcalina
FKBP	Proteínas de unión a FK506
FP	Fluido pleural
FT	Factores de transcripción
GILZ	Cremallera de leucina inducida por glucocorticoides
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal
Hsp	Proteína de choque térmico
IFN- $\gamma$	interferón-gamma
IL	Interleucina
IL-1 $\beta$	interleucina-1beta
IMC	Índice de masa corporal
LB	Linfocito B
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
MA	Macrófagos alveolares
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógeno
MCC	Medio de cultivo completo
Mtb	Mycobacterium Tuberculosis
NET	Trampas extracelulares
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa de las células B activadas
nGRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides negativos

NK	Natural killer
OMS	Organización mundial de la salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Proteína C Reactiva
PPIA	Peptidil prolil isomerasa A
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
RG	Receptor de glucocorticoides
RG $\alpha$	Receptor de glucocorticoides alfa
RG $\beta$	Receptor de glucocorticoides beta
RI	Respuesta inmune
RM	Receptor mineralocorticoide
$r_s$	Coefficiente de correlación r de Spearman
SFB	Suero fetal bovino
SI	Sistema inmune
SRps	Proteínas ricas en serina/arginina
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
TBPL	Tuberculosis pleural
TCR	Receptor de células T
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T colaboradores de tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores de tipo 2
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VES	Velocidad de eritrosedimentación
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana



## RESUMEN

La Tuberculosis (TB), cuyo agente etiológico es el bacilo intracelular *M. tuberculosis*, afecta esencialmente al pulmón, donde puede producir desde algunas pocas lesiones hísticas hasta un cuadro de intensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Dicha variación en el grado de afectación orgánica parece estar relacionado con la respuesta inmune celular hacia la micobacteria, habida cuenta que puede mediar tanto protección como patología. Nuestros estudios previos han indicado que los pacientes con TB se caracterizan por un desbalance inmunoendocrino, con aumento en los niveles plasmáticos de citocinas pro y antiinflamatorias y de cortisol, así como una disminución en los valores de DHEA. El incremento de mediadores inflamatorios conlleva a que la estimulación del sistema endocrino desencadene una serie de condiciones desfavorables en el intento de ejecutar un control de la respuesta inmune en curso. Al activarse el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA) se induce la liberación de cortisol, el cual producirá efectos antiinflamatorios a nivel periférico, a la par que también actuará sobre el eje HPA, inhibiendo su propia síntesis.

La activación excesiva del HPA podría inducir en los pacientes con TB un cambio en la permeabilidad del tracto intestinal que permite la translocación de endotoxinas al torrente sanguíneo. En esta tesis se demostró que los pacientes preferentemente con enfermedad avanzada, presentaron en circulación niveles elevados del componente principal de la membrana plasmática de bacterias Gram-negativas como lo es el lipopolisacárido). Estos hallazgos indicarían que la presencia de esta endotoxina a nivel sistémico en conjunto con la coexistencia de citoquinas inflamatorias contribuye a la inflamación crónica subyacente en la patogenia de la TB progresiva.

Dado este contexto, el cortisol al ejercer su función antiinflamatoria juega un papel crucial en el control de la respuesta inmune. Es así que, una sensibilidad reducida a esta hormona podría afectar la respuesta contra la bacteria desencadenando una respuesta inflamatoria exacerbada, causando daño tisular. En pacientes con TB, además del incremento de cortisol plasmático, al estudiarse la expresión del receptor para Glucocorticoides (RG) se observó que la isoforma que media sus funciones biológicas el  $RG\alpha$ , no modificaba sus niveles de expresión en tanto que  $RG\beta$ , el cual sería un dominante negativo de la actividad del cortisol, estaba aumentada, llevando a una disminución en la relación entre ambas isoformas ( $RG\alpha/RG\beta$ ). Esta disminución sugiere que las células presentan una menor capacidad de respuesta celular a los GCs endógenos. En función de esta hipótesis se llevó adelante un ensayo funcional *in vitro* en el cual las células de los pacientes con TB mostraron una menor sensibilidad al accionar de los GCs, lo cual se podría traducir en una disminución en la capacidad de suprimir la inflamación.

Por otra parte, se estudió la expresión de diferentes genes regulados por el RG, encontrando que los pacientes con formas progresivas de TB, particularmente los casos severos, se caracterizan por una expresión aumentada de genes antiinflamatorios (ANXA1 e inhibidores de NF- $\kappa$ B), así como de IL-1 $\beta$  y de la isoforma  $RG\beta$ , conjuntamente con la disminución de la capacidad proliferativa específica. Estos hallazgos indican que el cortisol modularía un cierto perfil transcripcional de acuerdo al grado de compromiso pulmonar de la TB, en un intento del todo no eficaz de reducir el proceso inflamatorio desencadenado por la respuesta celular específica ante el patógeno.

Finalmente, con el objetivo de comparar la respuesta inmunoendócrina tanto en el sitio de la infección como a nivel sistémico se estudió el mismo perfil transcripcional de genes regulados por el receptor de glucocorticoides que en pacientes con tuberculosis pulmonar. Es así que, en el sitio local de la infección se encontró una disminución en la concentración de cortisol y un aumento de las citocinas inflamatorias. Estos mediadores inmuno-endocrinos podrían influir en el contexto celular al enviar diferentes señales que determinan un dado perfil transcripcional de genes regulados por el receptor de GCs. La regulación génica mediada por el RG es dependiente de su ligando por lo tanto la biodisponibilidad del cortisol en el sitio de la infección podría influir en la regulación transcripcional. Otro de los hallazgos indica que el incremento de la isoforma alfa podría ocurrir para captar las moléculas de cortisol disponibles en este sitio.

En su conjunto, estos hallazgos demuestran que el desbalance inmunoendocrino, característico de los pacientes con TB severa, entraría en un círculo vicioso que retroalimentan la cronicidad de la patología. La resistencia a los GCs endógenos favorecería una regulación ineficiente de la respuesta inmune en curso, quizás necesaria en la relación a la eliminación del bacilo/daño tisular.

# **INTRODUCCIÓN**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. Tuberculosis

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa contagiosa que se transmite entre individuos por vía aérea. A nivel mundial es una de las enfermedades de mayor incidencia, y se estima que cada siete minutos una persona es infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), su agente etiológico, lo que corresponde a un cuarto de la población mundial. Sin embargo, la mayoría de estos individuos no desarrollará la enfermedad, e incluso algunos de ellos lograrán eliminar el patógeno. El principal órgano afectado en esta patología es el pulmón, aunque también es posible que impacte en otros órganos, como los riñones, intestino, el cerebro, entre otros (TB extrapulmonar)<sup>1</sup>.

La micobacteria convive con el género humano desde la antigüedad. Estudios arqueológicos han hallado fragmentos de ADN micobacteriano en tejidos de pulmones provenientes de momias egipcias que datan del Reino Nuevo (alrededor de 1550-1080 A.C.)<sup>2,3</sup>. La historia evolutiva de este patógeno indica que surgió hace unos 70.000 años A.C. y fue evolucionando en paralelo con los seres humanos<sup>4</sup>. La larga historia de la enfermedad está claramente entrelazada no sólo con la compleja naturaleza de la patología, sino que ha sido influenciada por los principales cambios demográficos, epidemiológicos y culturales como la agricultura, la industrialización y la globalización, mostrando una evolución mutua entre el patógeno y la cultura humana<sup>5</sup>.

Sin dudas, la pandemia por coronavirus 2019 (COVID-19) ha impactado de diversas formas en la TB, tanto en su control como en su prevención. La pandemia causó interrupciones sustanciales en los sistemas de atención médica, incluidos los

programas de TB, lo que condujo a una limitación al acceso de los servicios sanitarios<sup>6</sup>. Como consecuencia, a nivel mundial aumentó un 3.6% la tasa de incidencia de TB (nuevos casos por 100.000 habitantes/año) entre 2020 y 2021, para así revertir el descenso que se venía logrando en dicha tasa, de alrededor del 2% por año durante la mayor parte de las dos décadas anteriores. También se estima que la TB resistente al tratamiento específico incrementó entre 2020 y 2021, con 450.000 casos nuevos de TB resistente a rifampicina en 2021<sup>7</sup>.

### **1.1.1 Tuberculosis en Argentina**

En Argentina, la TB es un importante problema de salud pública que afecta principalmente a personas jóvenes cuyas condiciones de vida distan de ser las adecuadas, con un consecuente estado de estrés e inmunosupresión. Según el último boletín oficial publicado por el Ministerio de Salud de la Nación Argentina, en 2020 se notificaron 10.896 casos de TB, de los cuales el 77% de los diagnósticos fue de localización pulmonar. La población de 15 a 44 años fue quien en su mayoría contrajo la enfermedad (62%), con los varones como los más afectados por esta patología. En cuanto a la distribución geográfica, la provincia de Buenos Aires y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) reportaron el mayor número de casos de TB a nivel del país (66%). En Argentina, la TB es una enfermedad de denuncia pública, siendo la provincia de Salta la que exhibe la de tasa de notificación total más alta (42.4 por cada 100.000 habitantes), y la más baja correspondiendo a La Rioja (2 por cada 100.000 habitantes)<sup>8</sup>.

Las regiones altamente urbanizadas como la Provincia de Buenos Aires y CABA presentan una gran densidad poblacional, hecho que podría atribuirse la alta incidencia y transmisión de la enfermedad<sup>9</sup>. Concretamente, en Argentina, la tasa de incidencia de casos de TB aparece estar asociada a un contexto social y económico

desfavorable<sup>10</sup>. Este contexto implica a personas que habitan hogares con necesidades básicas insatisfechas y en condiciones de hacinamiento, lo cual conduce a un mayor contagio y a un aumento en las probabilidades de desarrollar una TB activa. Así, la pobreza es un factor determinante en la incidencia de la TB en nuestro país.

### **1.1.2 Transmisión y síntomas de la Tuberculosis**

El reservorio natural del patógeno es el ser humano, no sólo el enfermo sino también el sujeto sano infectado con Mtb. Cuando la TB se localiza en el pulmón, aquellos que cursan la enfermedad activa podrán diseminar el bacilo, ya que, al toser, hablar o expectorar eliminarán pequeñas gotas de saliva (gotas de Flügge) que contienen bacilos, los cuales podrán ser aspirados por otros individuos. Los factores determinantes del contagio incluyen la localización de la TB (pulmonar o no), ciertas características de la enfermedad como mayor o menor cantidad de bacilos en el esputo, la duración y frecuencia del contacto entre la persona sana y la enferma, factores del ambiente en que ocurre el mismo (inadecuada ventilación) y las condiciones de salud del individuo expuesto (inmunodepresión, nutrición, enfermedades concomitantes como por ejemplo la diabetes). Si bien es posible el contagio tras un único contacto, gran parte de las infecciones se producen por una exposición sostenida en el tiempo. No obstante, la mayoría de las personas que se infectarán con la micobacteria podrán controlar la infección y no desarrollarán la enfermedad. Entre quienes se enfermarán de TB, el 80% manifestará la enfermedad durante los dos primeros años posteriores al primer contacto con el bacilo (primoinfección).

La TB pulmonar representa alrededor del 80 al 85% del total de los casos activos. Se manifiesta con signos respiratorios como tos seca (a veces con esputo

sanguinolento), dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. La TB también puede presentarse bajo la forma extrapulmonar, estando más en aquellos grupos poblacionales que se encuentran inmunosuprimidos. La tuberculosis extrapulmonar es el resultado de la infección por Mtb en diversos órganos, pudiendo afectar a los ganglios linfáticos, la pleura, el cerebro, el tracto gastrointestinal, entre otros<sup>11</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que en el 17% de los casos diagnosticados de TB la infección ocurre en sitios anatómicos distintos a los pulmones, siendo las formas más frecuentes la pleural y la ganglionar, seguidas por la genitourinaria<sup>7</sup>.

En lo que concierne a la TB pleural (TBPL), es importante considerar que la pleura es una membrana serosa conformada por una monocapa de células mesoteliales que cubre la pared torácica y los pulmones en las superficies parietal y visceral, respectivamente. Entre ambas capas hay un espacio lubricado llamado cavidad pleural, que facilita los movimientos respiratorios de los pulmones y ayuda a evitar la fricción. La TBPL se puede desencadenar debido a la propagación de la infección del pulmón hacia la cavidad pleural o puede estar asociada a la reactivación de la enfermedad<sup>12</sup>. Cuando Mtb accede al espacio pleural, la pleura responde con una vigorosa respuesta inflamatoria asociada a la formación de un exudado de glóbulos blancos y proteínas, que genera dolor torácico y suele ser este uno de los principales motivos de consulta<sup>13</sup>.

### **1.1.3 Diagnóstico y algunas consideraciones**

El diagnóstico de TB implica la identificación del agente causal en muestras de expectoraciones, secreciones orgánicas o de tejidos. La placa de tórax es un elemento complementario, pero no definitivo para la identificación de esta patología, no sólo porque es imposible discriminar con certeza las lesiones activas de las

inactivas, sino también porque es poco específica ya que las imágenes radiológicas que genera la TB (infiltrados, nódulos, cavidades, fibrosis y retracciones) pueden ser producidas por otras patologías respiratorias y enfermedades sistémicas<sup>14</sup>. No obstante, la radiografía de tórax sirve como instrumento en la clasificación del grado de compromiso pulmonar presentado por los pacientes. La baciloscopia es la técnica diagnóstica más práctica y la más utilizada en los países en desarrollo. Identifica la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes, directamente de la muestra de esputo mediante la tinción clásica de Ziehl-Neelsen<sup>8</sup>.

También están los llamados IGRA (interferón gamma release assays), que detectan la liberación de Interferón Gamma (IFN- $\gamma$ ) por los linfocitos en respuesta a antígenos micobacterianos específicos, que suelen utilizarse como ayuda en el diagnóstico de infección latente y de enfermedad tuberculosa.

La OMS recomienda la utilización de una prueba rápida Xpert®MTB/RIF, que permite detectar cepas del complejo Mtb y resistentes a rifampicina mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Es una técnica rápida (resultados en 2h) y eficiente que permite instaurar el tratamiento más tempranamente. Sin embargo, presenta sus limitaciones ya que un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables<sup>15,16</sup>.

Respecto a la TBPL, la presencia del derrame pleural (DP) generalmente es la primera sospecha de la existencia de la enfermedad. El diagnóstico de la existencia de DP no reviste gran dificultad y se basa en la exploración física y la comprobación con técnicas de imagen, como la radiografía simple de tórax. Cuando se presenta un DP se debe determinar su causa. La búsqueda de la etiología comenzará con la anamnesis y exploración química física y continuará con la toracocentesis diagnóstica que diferenciará los DP en trasudados y exudados.

Si es un trasudado, ello indica que la pleura está sana y que el derrame es causado por un desequilibrio hidrostático, efecto de una enfermedad de otro órgano, de manera que no se justifica continuar haciendo exámenes dirigidos a la pleura. Si es un exudado, en cambio, el estudio del líquido pleural va a orientar sobre la etiología y el pronóstico.

Para la identificación en el laboratorio de trasudados y exudados el método más difundido es la aplicación de los criterios de Light, en donde se establece que la presencia de cualquiera de las tres características siguientes indica que el DP es un exudado: razón entre proteína pleural y sérica  $> 0,5$ ; Nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) pleural  $>$  de  $2/3$  del límite superior normal del suero; razón LDH pleural/LDH sérico  $> 0,6$ <sup>17</sup>. El diagnóstico definitivo de pleuresía tuberculosa se consigue con el aislamiento del bacilo en esputo o especímenes de pleura, o por el hallazgo de granulomas caseosos en la biopsia pleural<sup>13</sup>. Los criterios de diagnóstico de TBPL dependen del cultivo de bacterias y la histopatología, pero la sensibilidad diagnóstica es limitada y consume mucho tiempo<sup>18</sup>. Por lo tanto, ante esta dificultad, se han planteado otras técnicas diagnósticas que incluyen a la cuantificación de IFN- $\gamma$  y la de Adenosina desaminasa<sup>19,20</sup>.

### 1.1.4 Prevención y Tratamiento

La inmunización profiláctica es una estrategia clave para reducir la incidencia de la TB. La vacuna BCG, creada hace más de cien años, es la única aprobada hasta el momento<sup>21</sup>. Se prepara a partir de cultivos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis* que ha perdido su virulencia tras cultivos sucesivos, manteniendo su poder antigénico. La misma se aplica a neonatos y lactantes en regiones de todo el mundo donde la tasa de morbilidad por TB es alta, siguiendo las indicaciones del programa de expansión de inmunización de la OMS. Se ha

documentado su efecto protector en niños contra la meningitis tuberculosa y la TB diseminada, sin embargo, no evita la infección primaria y, lo que es más importante, no previene la reactivación de la infección pulmonar latente, la principal fuente de propagación del bacilo en la comunidad<sup>22</sup>. El efecto de las vacunas BCG en la transmisión de Mtb es, por consiguiente, limitado.

Hasta tanto se disponga de una mejor vacuna para prevenir la TB, la lucha contra la propagación de esta enfermedad continuará basándose en los instrumentos disponibles actualmente: el diagnóstico temprano, la terapia supervisada y el tratamiento preventivo adecuado, así como en medidas de salud pública y de lucha contra la infección.

La TB es una enfermedad crónica en esencia, aunque se puede lograr la curación si se cumple con el tratamiento adecuado. Existen medicamentos de primera y segunda línea. Los medicamentos de primera línea, principales, o esenciales son: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Estreptomina y Etambutol. Estos fármacos son efectivos en la mayoría de los casos y logran la curación de los pacientes en un periodo de seis meses o más, de acuerdo con la severidad de la enfermedad, así como el estado clínico del paciente. Los medicamentos de segunda línea o subsidiarios se utilizan en caso de reacciones adversas y resistencia a fármacos tradicionales<sup>15</sup>. Además de la antibiótico-terapia es importante la información, supervisión y apoyo del paciente por un agente sanitario o un voluntario capacitado para el cumplimiento terapéutico, ya que puede ser difícil de sostener y, como consecuencia, la infección puede progresar. Los medicamentos antituberculosos corrientes se han utilizado por décadas y la resistencia a ellos está aumentando. Por su parte, la TBPL es un proceso que, en la mayoría de los individuos puede resolverse espontánea y favorablemente sin tratamiento específico, entre los 2-4 meses, Sin

embargo, hay una probabilidad de un 50% de desarrollar una TB pulmonar en los siguientes 5 años del cuadro pleural. Es por ello que el tratamiento de la TBPL persigue como objetivo prevenir el desarrollo subsecuente de una TB activa, a la par de disminuir los síntomas de la enfermedad en el paciente. Se recomienda básicamente, el mismo criterio de administración de drogas y tratamiento utilizados en la TB pulmonar<sup>15,23</sup>.

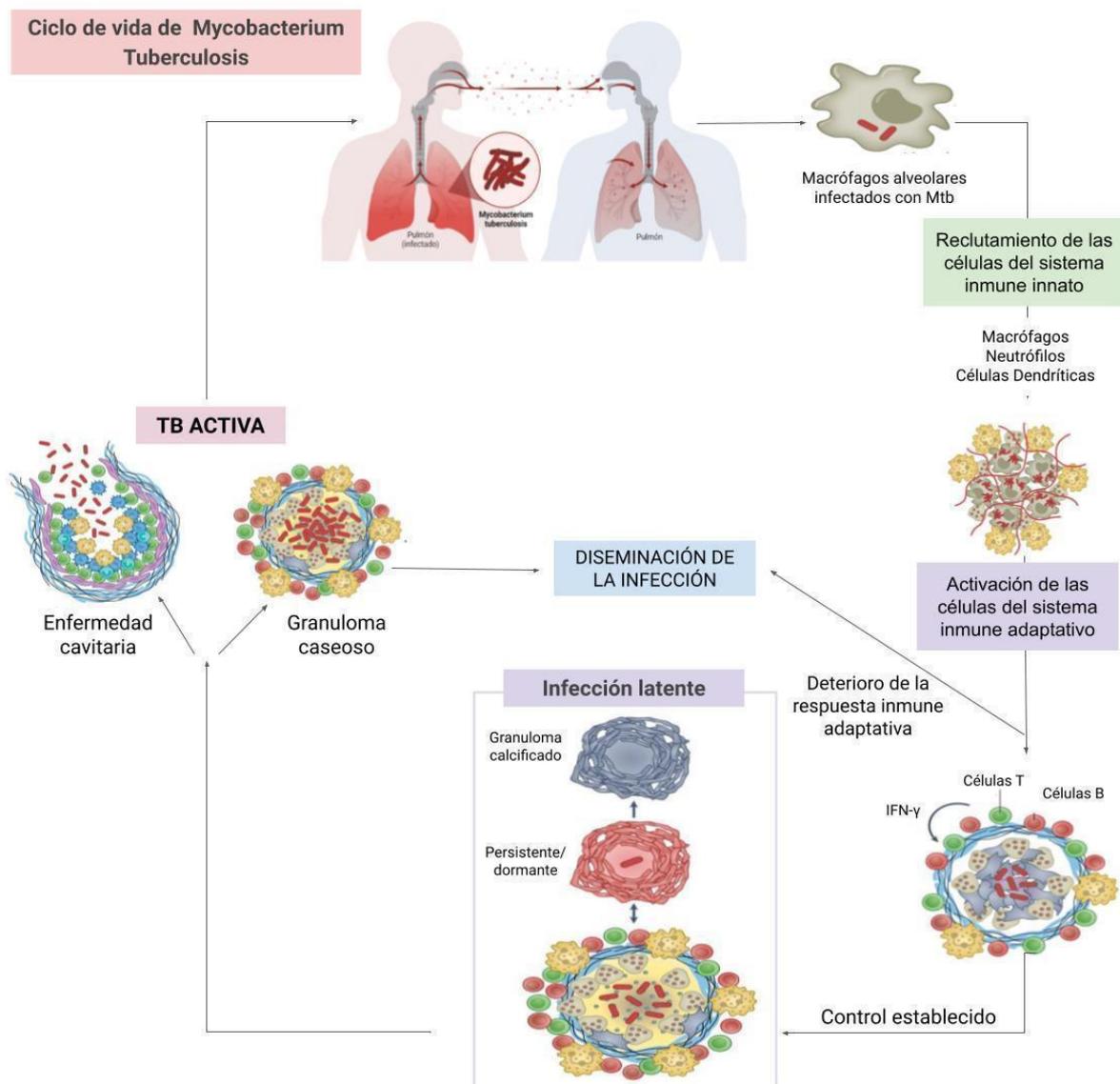
## **1.2 Patofisiología de la Tuberculosis**

Una característica central de la patogénesis de la TB es la capacidad del organismo causante, *Mtb*, de sobrevivir en diversos entornos intracelulares dentro de una variedad de poblaciones de células mieloides. El resultado de la infección por la micobacteria está determinado por la genética del hospedero, las comorbilidades, los factores ambientales y la virulencia de la bacteria. El establecimiento de la infección es conducido por las diferentes estrategias que utiliza la bacteria para resistir y desactivar los mecanismos de defensas que son gatillados por los macrófagos y los neutrófilos ante la infección<sup>24,25</sup>. *Mtb* también infecta a las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, las células dendríticas (CD), que viajan a los ganglios linfáticos drenantes y activan a las células T, las cuales migran al pulmón infectado. Este proceso conlleva varias semanas, pero una vez que se desarrolla una respuesta inmune (RI) adaptativa efectiva, las células T, células B y macrófagos activados forman el característico granuloma, que es una estructura definida que permite establecer el control bacteriano. En la mayoría de los casos, la replicación bacteriana se contiene y la respuesta inflamatoria disminuye, lo que conduce a la TB latente. Las personas con TB latente tienen una RI adaptativa a *Mtb*, pero no presentan síntomas, bacilos cultivables ni manifestaciones de la enfermedad. La TB latente probablemente engloba un espectro de resultados que incluye la eliminación bacteriana y la

enfermedad subclínica, aunque actualmente no hay forma de distinguir entre individuos que eliminaron la infección y aquellos que albergan bacilos viables<sup>26</sup>.

Aproximadamente, del 5 al 10% de las personas infectadas desarrollarán TB activa, ya sea por infección primaria progresiva o 'reactivación', que puede ocurrir mucho después de la infección inicial<sup>27</sup>. En la reactivación, la TB se desarrolla en el contexto de una RI adaptativa previamente 'exitosa' (aunque no esterilizante). Existen muchas manifestaciones posibles de la enfermedad, desde enfermedad pulmonar cavitaria hasta infección focal que involucra casi cualquier sistema de órganos, hasta infección ampliamente diseminada. La enfermedad pulmonar cavitaria es la más común y, es importante destacar que las personas con lesiones cavitarias son quienes más liberan patógenos al ambiente y, por ende, los mayores propagadores de la TB.

**Figura 1: Ciclo de vida de *Mycobacterium Tuberculosis***



*Mycobacterium tuberculosis* se transmite a través de aerosoles provenientes de individuos con infección pulmonar activa a individuos sanos. La bacteria infecta inicialmente a los macrófagos alveolares y luego se propaga a diferentes tipos de células, como otros macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Las células dendríticas llevan los antígenos a los ganglios linfáticos, donde se activan los linfocitos T específicos para el antígeno. Estos linfocitos luego migran al sitio de la infección y son esenciales para controlar la bacteria y prevenir su diseminación. Con una respuesta inmune adaptativa efectiva, la mayoría de los infectados desarrollan una infección latente, que puede variar desde una infección esterilizada hasta una enfermedad subclínica. Sin embargo, aproximadamente el 5-10% de los infectados desarrollarán TB activa, principalmente en forma de enfermedad cavitaria en los pulmones. La transmisión de la enfermedad ocurre principalmente a través de individuos con enfermedad pulmonar cavitaria.

### 1.3 Respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*

Como ya fuera dicho, Mtb ha podido co-evolucionar con los seres humanos al lograr establecer un delicado estado de equilibrio entre el control inmunológico del hospedero y los diferentes mecanismos de evasión. La infección por Mtb inicia su camino tras la inhalación de microgotas de saliva que contienen a la bacteria por parte de un individuo con TB pulmonar activa y su posterior inhalación por un individuo no infectado<sup>28</sup>, Mtb ingresa por el tracto respiratorio hasta el pulmón donde finalmente es depositado en los alvéolos<sup>29</sup>. Una vez allí, la micobacteria entra en contacto con la mucosa de las paredes de los alvéolos, las células epiteliales y los macrófagos alveolares (MA). Los macrófagos constituyen la primera línea de defensa contra el patógeno, debido a que pueden detectar y fagocitar a la bacteria e inducir mecanismos microbicidas<sup>30</sup>. En la etapa inicial de la infección, Mtb, dentro de los macrófagos, accede a los ácidos grasos y al colesterol del individuo<sup>31</sup>, lo que constituye un nicho nutricionalmente permisivo favoreciendo su crecimiento y supervivencia<sup>24,32</sup>. Asimismo, las CD<sup>33</sup> y las células epiteliales tipo II también pueden fagocitar a la micobacteria<sup>34,35</sup>.

Dado que los MA infectados son capaces de migrar hacia el intersticio pulmonar<sup>36</sup>, se instala la infección en el tejido periférico seguido del reclutamiento de monocitos sanguíneos que se diferencian en distintas subpoblaciones de células mieloides, incluidas las CD y los macrófagos derivados de monocitos<sup>37</sup>. Los diferentes linajes de los macrófagos responden de manera diferencial a Mtb, tal es el caso de los macrófagos intersticiales (MI), que se ubican en las regiones alveolares intersticiales o peribronquiales<sup>38,39</sup>. Estos macrófagos son capaces de inhibir con mayor eficacia el crecimiento bacteriano y comprometer la glicólisis para producir activamente citocinas inflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y factor de

necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>24</sup>. Con el paso del tiempo tras la infección, los bacilos comienzan a diversificar su nicho al infectar diferentes células, como neutrófilos, CD8 y distintas poblaciones de macrófagos que varían en su capacidad para eliminar y destruir las bacterias ingeridas<sup>40</sup>.

### **NEUTRÓFILOS**

Respecto a los neutrófilos, a pesar de que utilizan una variedad de mecanismos efectores para erradicar al patógeno, como la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la desgranulación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), Mtb puede sobrevivir dentro ellos al inducir el programa de muerte celular por necrosis<sup>41</sup>. De este modo se establece un círculo vicioso de infección sostenida que incluye la absorción de células necróticas infectadas por otros fagocitos, el crecimiento de Mtb en ellas y la infección perpetuada.

Otra estrategia que emplean los neutrófilos es la formación de trampas extracelulares (NET), compuestas por ADN que encierra altas concentraciones de agentes antimicrobianos (como elastasa, proteínas granulares y mieloperoxidasa), para degradar a la bacteria<sup>42</sup>. Si bien las NET evitan la propagación del bacilo, no son capaces de destruirlo<sup>43,44</sup>. La presencia de NET puede ser beneficiosa para contener la infección y activar a los macrófagos a producir citocinas proinflamatorias y quimioattractantes<sup>45</sup>, aunque puede ser perjudicial para el hospedero, ya que pueden causar daños en el tejido pulmonar<sup>46</sup>, conducente a una eliminación deficiente de la infección y al mismo tiempo extiende aún más la zona de inflamación generando mayor daño tisular<sup>45</sup>.

### **MACRÓFAGOS**

Los macrófagos son los principales reguladores de la inflamación durante la respuesta a la infección, al actuar como un puente entre la inmunidad innata y la

adaptativa monitoreando el microambiente a través de una variedad de receptores de superficie e intracelulares. Mediante tales receptores pueden detectar distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y activar diferentes estrategias antimicrobianas. Estos receptores que incluyen al tipo Toll (TLR), tipo lectina C, tipo NOD y la sintetasa de GMP cíclico-AMP-estimulada (cGAS)-STING son capaces de responder a Mtb activando respuestas transcripcionales en los macrófagos. La detección de PAMPs por los TLR2 y los receptores tipo lectina C activan la señalización del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), aumentando la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  y IL-6, al igual que IL-1 $\beta$  e IL-18. En el contexto de un estado proinflamatorio se activa la capacidad intrínseca de los macrófagos para generar ROS, conducente a la maduración del fagosoma resultando en un aumento de la actividad microbicida<sup>47,48</sup>.

Otros tipos de receptores como los Fcy, los del complemento y los carroñeros (*scavenger*) contribuyen con los mecanismos de defensa del hospedero al promover la captación de micobacterias<sup>49</sup>. Una vez que las bacterias son internalizadas, los macrófagos tienen muchas formas de eliminarlas: restricción de nutrientes esenciales, como el hierro; intoxicación con metales pesados; producción de péptidos antimicrobianos; generación de ROS e intermediarios reactivos de nitrógeno; y acidificación progresiva del fagosoma y fusión lisosomal<sup>50</sup>.

Si bien se sabe que los macrófagos presentes en los pulmones exhiben varios subtipos de diferentes orígenes de desarrollo y/o linajes, muchos estudios indican que la infección por micobacterias también puede influir en su polarización. Los macrófagos son una población celular compleja con un alto nivel de plasticidad<sup>51</sup>, en donde el patógeno aprovecha esta heterogeneidad propia de las poblaciones de

macrófagos en su propio beneficio al alterar la secreción de citocinas e inducir modificaciones epigenéticas<sup>52,53</sup>.

Está ampliamente establecida la existencia de dos tipos de macrófagos: los activados de manera clásica (M1) que se diferencian en respuesta a la señal de diversas citocinas, o los activados de modo alternativo (M2)<sup>54</sup>. Los M1, inducidos por la secreción de citocinas de los LT colaboradores de tipo 1 (Th1), fundamentalmente IFN- $\gamma$ , son capaces de destruir a la bacteria y a su vez producir citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-23<sup>55</sup>. Mientras que los M2, inducidos por citocinas de los LT colaboradores de tipo 2 (Th2), como IL-4 e IL-13, sintetizan citocinas antiinflamatorias (IL-10, Factor de crecimiento transformante beta-TGF- $\beta$ ), carecen de actividad antimicrobiana y poseen una baja actividad presentadora de antígenos<sup>56</sup>. Sin embargo, no todos los macrófagos que participan en la infección por Mtb se ajustan al fenotipo M1 y M2, pudiendo existir otras poblaciones de macrófagos relevantes y potencialmente contributivos en la inmunopatogénesis de la TB.

Una de las citocinas más relevantes dentro de los mecanismos efectores de los macrófagos es la IL-1 $\beta$ , que cumple funciones protectoras para el organismo durante las etapas iniciales de la TB. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, puede potenciar la producción de eicosanoides proinflamatorios, lo que resulta en una afluencia de neutrófilos y una exacerbación de la patología tisular<sup>57</sup>. También, Mtb induce la acumulación de ácidos grasos y colesterol en gotas lipídicas mediante la modulación de la expresión de factores del hospedero como PPAR $\alpha$ <sup>58</sup> para luego utilizarlas como fuente de carbono y para generar lípidos de virulencia necesarios para la patogénesis<sup>59-61</sup>. Por lo tanto, los macrófagos responden a la infección cambiando su metabolismo y Mtb aprovecha estos cambios para su beneficio.

## **CÉLULAS NATURAL KILLER**

Las células NK son linfocitos innatos granulares que poseen una capacidad citolítica potente. Las NK actúan temprano durante la infección y no están restringidas por el CMH<sup>62</sup>. No obstante, estas células utilizan mecanismos muy particulares no dependientes del antígeno para ejercer funciones efectoras. Las células NK son capaces de reconocer varios componentes de la pared celular de Mtb, como los ácidos micólicos, a través del receptor de citotoxicidad natural, NKp44<sup>63</sup>. En un estudio se observó que una reducción en el número de NK o en la expresión de marcadores de activación se correlaciona con la pérdida de control y la transición hacia TB activa<sup>64</sup>. Estos resultados indicarían que las células NK están implicadas en la defensa del individuo contra el patógeno. Además, mediante la activación de macrófagos, las NK indirectamente pueden controlar el crecimiento de las micobacterias. Otra estrategia que utilizan las NK para eliminar a las células infectadas con Mtb son los mecanismos citotóxicos, que incluyen la producción de gránulos citoplasmáticos que contienen perforina, granulicina y granzima. Por último, pero no menos importante, las NK tras ser estimuladas por Mtb producen citocinas pro inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-22 que activan diversos mecanismos efectores dentro de los macrófagos, como la generación de ROS y la necrosis programada<sup>50,65,66</sup>. Por otro lado, IL-22 juega un papel importante en la defensa y la homeostasis del individuo mediante la producción de péptidos antimicrobianos<sup>67</sup>.

## **CÉLULAS DENDRÍTICAS**

En el sitio de la infección coexisten otras células como las CD que como los macrófagos son capaces de reconocer a Mtb a través de receptores del complemento, TLRs, PRRs y DC-SIGN<sup>68</sup>. Una vez que las DC detectan y fagocitan patógenos o antígenos provenientes de éstos, se someten a un proceso de maduración,

umentando la expresión de moléculas del CMH de clase I y II, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y el receptor de quimiocinas 7 (CCR7), migrando hacia los órganos linfoides secundarios para la presentación antigénica a los LTs *náive* y así impulsar una inmunidad efectiva<sup>69,70</sup>. La secreción de la citoquina IL-12 por parte de las CD infectadas con Mtb es clave para inducir la migración de las CD a los ganglios linfáticos y la diferenciación de LT CD4<sup>+</sup> en LT Th1<sup>71</sup>. Luego, los LT Th1 secretarán IFN- $\gamma$  provocando un ciclo de retroalimentación positiva con mayor producción de IL-12 y la expansión clonal de los LT Th1 respondedores al antígeno<sup>72</sup>. Además, las CD infectadas con Mtb pueden promover la diferenciación a un perfil Th17, protector contra la infección por Mtb altamente virulenta, al secretar IL-17 IL-23, IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>73</sup>.

Las CDs también son capaces de interactuar con LT CD8<sup>+</sup>, quienes reconocen péptidos antigénicos provenientes del compartimento citosólico, que son presentados en el contexto de moléculas CMH-I<sup>74</sup>. A través de un mecanismo conocido como “presentación cruzada”, las CDs procesarán y transportarán péptidos a la vía de presentación canónica del CMH-I<sup>75</sup>. Así, los LT CD8<sup>+</sup> son activados por las CD para secretar granzima B o perforina e inducir la apoptosis de células infectadas tales como los macrófagos<sup>76</sup>.

## **RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA**

La protección contra la TB está asociada al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$ , que induce la activación de los macrófagos y promueve la eliminación de la micobacteria. Las CDs ligam a la inmunidad innata con la adaptativa, ya que viajan desde el sitio de la infección e inflamación hacia los tejidos linfoides secundarios para la activación de los LT<sup>77</sup>. En los ganglios linfáticos, las CDs inician la respuesta inmune adaptativa al

presentar los antígenos bacterianos a los LT. Luego de la activación, los LT *naïve* se diferencian en LT CD4<sup>+</sup> efectores, así como también en células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, para luego migrar al pulmón<sup>78,79</sup>. Los LT son fundamentales para activar los macrófagos y reducir el crecimiento de micobacterias<sup>80</sup>. A medida que avanza la infección se conduce a un reclutamiento y agregación de macrófagos y otras poblaciones inmunes alrededor de las células infectadas por Mtb lo que conlleva a la formación de una estructura denominada granuloma la cual es capaz de contener la infección y, siendo un sello característico de la TB<sup>81</sup>.

La activación de los LT requiere de distintas señales por parte de las CPAs<sup>82</sup>. La primera de ellas depende del reconocimiento del péptido derivado del patógeno cargado en CMH-I o CMH-II en la superficie de las CPAs y por parte del Receptor de Células T (TCR) específico para el antígeno de Mtb, expresado en los LTs *naïve*<sup>82</sup>. La segunda señal se produce a través de la unión entre las moléculas co-estimuladoras, como CD80, CD86 o CD40, de las CPAs y CD28 en los LT<sup>83,84</sup>. La unión de moléculas coestimuladoras por parte de los LT puede sesgar su función, mejorando o inhibiendo el control de Mtb<sup>85</sup>. Una tercera señal, dada por citocinas estimulantes, potencia la activación de los LT, en particular, los LT CD8<sup>+</sup><sup>86</sup>. Después de su activación en el ganglio linfático, los LT migran al entorno pulmonar en busca de células infectadas<sup>77</sup>. En los pulmones, el contacto directo tanto de los LT CD4<sup>+</sup> como de los LT CD8<sup>+</sup> con células que albergan Mtb puede controlar parcialmente el proceso, pero en ciertas ocasiones no son suficientes para eliminar al patógeno<sup>40,77</sup>. Las razones por las cuales los LT no logran controlar completamente la infección por Mtb son complejas. La más establecida es que la micobacteria evita activamente una detección efectiva por parte de los LT e induce su agotamiento (o exhaustación) lo que limita el potencial protector de éstos<sup>87</sup>.

### **LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>**

El principal mecanismo de la inmunidad protectora del hospedero ante la infección con Mtb es la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los LT CD4<sup>+</sup> Th1<sup>88,89</sup>. Esta citocina resulta ser clave en la activación de los macrófagos, quienes procederán a la eliminación de la micobacteria, controlando así la diseminación de la infección<sup>90</sup>. La importancia de IFN- $\gamma$  en el control de las infecciones por micobacterias quedó claramente evidenciada en personas infectadas con Mtb que, a su vez, presentaban mutaciones en genes que codifican para IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$ , se vio afectada la producción de IFN- $\gamma$  por los LT, ocasionando una reducción en la activación de los macrófagos y, consecuentemente, el progreso de la infección hacia la enfermedad activa<sup>91</sup>.

Sin embargo, IFN- $\gamma$  no puede controlar la infección por sí solo, sino que requiere la asociación de otros medidores como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y de quimiocinas capaces de atraer células inmunitarias en el sitio de la infección<sup>92</sup>. Las células T CD4<sup>+</sup> y el TNF- $\alpha$  son cruciales para la formación de granulomas y la protección del organismo<sup>93,94</sup>. Las personas con disfunción de las células T CD4<sup>+</sup> a causa de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o aquellas tratadas con inhibidores del TNF- $\alpha$  no logran formar granulomas bien organizados y tienen un alto riesgo de desarrollar TB activa e infección diseminada<sup>95</sup>.

### **LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup>**

Las células T CD8<sup>+</sup> son activadas durante la infección por Mtb, siendo detectables en la sangre de pacientes con TB<sup>96</sup>. Datos recientes respaldan la idea de que los LT CD8<sup>+</sup> y las CD4<sup>+</sup> actuarían sinérgicamente para controlar la infección por Mtb<sup>97</sup>. Los LT CD8<sup>+</sup> reconocen los antígenos de Mtb a través de las moléculas del CMH-I. Una vez activados los LT CD8<sup>+</sup> secretan citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Además, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> ejercen una acción citolítica contra Mtb al liberar moléculas citotóxicas como perforina y granulicina que tienen la capacidad de matar las células infectadas por Mtb o al inducir la apoptosis a través de la interacción Fas-Fas ligando<sup>98,99</sup>.

## **LINFOCITOS B**

La respuesta inmune adaptativa en la TB desencadenada por los linfocitos tras la infección de Mtb en el huésped, puede dividirse ampliamente en inmunidad celular mediada por LT e inmunidad humoral mediada por LB. Aunque la RI celular mediada por LT es crucial para controlar la infección por Mtb y regular la formación/maduración del granuloma, varios estudios han demostrado que los LB y la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos también pueden afectar las respuestas del huésped contra la infección por Mtb<sup>100</sup>. Un estudio reciente informó que la reactividad de los LB se encuentra desregulada en pacientes con TB activa y latente, pero no así en quienes cumplieron con el tratamiento anti-TB<sup>101</sup>. Este estudio también revela que los LB aumentan las funciones efectoras de la respuesta inmune mediada por LT. En el granuloma, los LB median varios procesos inmunológicos, como la presentación de antígenos a los LT, la producción de anticuerpos específicos contra Mtb y la promoción del desarrollo de la respuesta Th1 mediante la inducción de la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ <sup>102-104</sup>. Se cree que los anticuerpos contra Mtb, secretados por los LB, están involucrados en la neutralización de toxinas, la opsonización y la modulación de la lisis mediada por el complemento. Además, se han encontrado anticuerpos IgG específicos de antígenos micobacterianos en el plasma de pacientes con TB<sup>105</sup>.

En el sitio de la infección los LB son capaces de disminuir la inflamación al secretar citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-33, y al regular la respuesta

Th1 y Th17<sup>103</sup>, modulando la infiltración de neutrófilos y ayudando a prevenir una respuesta inflamatoria exacerbada<sup>102</sup>.

## **GRANULOMA**

El granuloma es la característica patológica clásica de la TB. Si bien se los considera una estructura protectora capaz de controlar y prevenir la diseminación de la infección, los granulomas también contribuyen a la supervivencia de las micobacterias y, lo que es más importante, son la principal manifestación del daño en el pulmón.

En un granuloma bien organizado, los fagocitos recién reclutados y los linfocitos rodean a los macrófagos infectados por Mtb. En esta etapa, el granuloma puede actuar como una barrera fisiológica y prevenir la diseminación inicial de la infección dentro y entre los hospedadores<sup>79</sup>. Sin embargo, cuando un granuloma pierde su integridad durante las etapas iniciales y se vuelve permisivo para el crecimiento bacteriano, entonces la infección inicial progresa hacia la TB primaria activa.

Durante las etapas iniciales de la infección, un elevado nivel de citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  producidas por las células inmunitarias, polariza a los macrófagos hacia un fenotipo predominantemente M1, capaz de controlar el crecimiento y la replicación bacteriana a través de sus funciones efectoras antimicrobianas. Además, los macrófagos M1 pueden presentar eficientemente antígenos de Mtb a los LT, estableciendo una inmunidad protectora de tipo Th1, y reclutando y activando más células inmunitarias innatas y adaptativas con un fenotipo proinflamatorio. Estas células rodean a los macrófagos infectados en el centro del granuloma y limitan la propagación de Mtb<sup>106</sup>. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, el ambiente inmunológico va modificándose con macrófagos

más permisivos al crecimiento de Mtb y polarizando hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio, caracterizado por una producción elevada de IL-4 e IL-10 y un metabolismo lipídico elevado que contribuye a la formación de macrófagos espumosos (o foamy)<sup>107</sup>.

Durante la enfermedad activa, los macrófagos infectados por Mtb en el centro de los granulomas sobrellevan a la necrosis, lo que resulta en la acumulación de caseum, una región cremosa y acelular en la cual Mtb puede sobrevivir extracelularmente. La necrosis descontrolada de las células infectadas contribuye a la ruptura del granuloma y a la diseminación del patógeno hacia los tejidos vecinos, facilitando la formación de otros secundarios; estos se observan en los pulmones aproximadamente en el 20% de los casos de TB activa, mientras que la reactivación de Mtb a partir de granulomas quiescentes contribuye a la enfermedad pulmonar activa en aproximadamente el 80% de los casos<sup>108</sup>. Aunque se cree que los granulomas restringen el crecimiento y la diseminación de Mtb, también promoverían la persistencia bacteriana, lo que representa un posible reservorio para la reactivación de la enfermedad en el futuro<sup>109</sup>. Se sabe que los componentes micobacterianos estimulan la secreción de IL-10, suprimiendo así la respuesta Th1<sup>109</sup> y facilitando la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 con el desarrollo de macrófagos ricos en lípidos y células gigantes<sup>110</sup>. Este fenómeno sugiere que los granulomas pueden servir como un nicho para apoyar el crecimiento y/o supervivencia de Mtb al proporcionar lípidos del hospedero como fuente de carbono<sup>109</sup>.

### **RESPUESTA INMUNE EN LA TUBERCULOSIS PLEURAL**

En otro orden de cosas y como ya fuera mencionado, la presentación más frecuente en cuanto a la TB extrapulmonar es la TBPL. En lo que respecta a las características propias de RI en una situación de TBPL, las células inmunológicas

presentes en el líquido pleural expresan TLR2 que son capaces de reconocer PAMPs y activar la respuesta inmune contra el patógeno invasor induciendo la producción de un amplio conjunto de mediadores inflamatorios<sup>111</sup>. El reconocimiento de PAMPs por parte de las células del sistema inmunológico allí presentes, induce una cascada de señalización que conlleva a la producción de una plétora de citocinas capaces de ejercer múltiples efectos. Es así que, el fluido pleural proveniente de pacientes con TBPL contiene elevados niveles de diversas citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8<sup>112-114</sup>. Tanto IFN- $\gamma$  como TNF- $\alpha$  cumplen un papel preponderante en el control de la infección por Mtb ya que son capaces de orquestar numerosas funciones protectoras, siendo IFN- $\gamma$  un efector central de la inmunidad celular al mediar la activación de macrófagos y sus mecanismos de defensa oxidativos que restringen el crecimiento del patógeno<sup>115</sup>. Asimismo, TNF- $\alpha$  sinergiza con IFN- $\gamma$  e IL-12 en la activación de macrófagos<sup>116</sup>.

Otro de los mecanismos de defensa que se induce tras el reconocimiento del patógeno es la producción de quimiocinas como MCP-1 y MIP-1 alfa conjuntamente con moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1) las cuales contribuyen al reclutamiento de células mononucleares al espacio pleural facilitando la adherencia y la migración de estas células<sup>117,118</sup>. Asimismo, los neutrófilos que ocupan el espacio pleural son capaces de secretar moléculas quimiotácticas reclutadoras de monocitos al sitio de la infección<sup>119</sup>.

Un sello característico en la patogénesis de TBPL es que luego de la exposición a Mtb se desencadena una reacción de hipersensibilidad retardada que se caracteriza por una extensa acumulación de linfocitos<sup>120</sup>. La afluencia de LT colaboradores específicos contra Mtb al espacio pleural, proporciona un contexto adecuado para el desarrollo de la respuesta inmune celular adaptativa contra la

infección, a la par que surgen diversas subpoblaciones Th que difieren en sus funciones efectoras en el control de la infección.

#### **1.4 Comunicación bidireccional entre los sistemas inmune y endocrino**

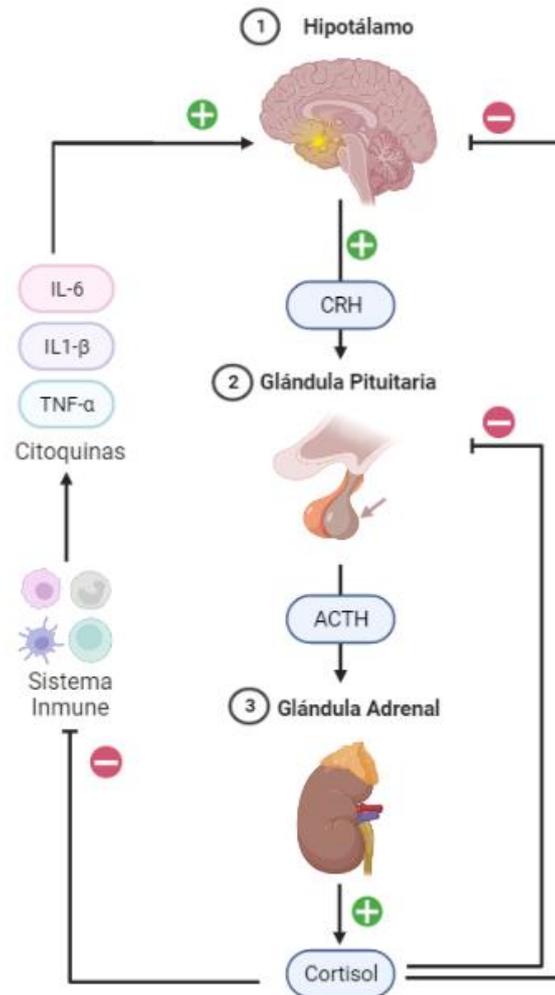
Es ampliamente aceptado que los sistemas neuroendocrino e inmune se encuentran interrelacionados. Esta conexión involucra ligandos y receptores comunes, permitiendo un circuito de diálogo cruzado que desempeña un papel importante en la homeostasis. Las citocinas proinflamatorias producidas durante la RI causan la producción de diferentes hormonas peptídicas que, dependiendo del eje neuroendocrino que se estudie, resultarán en la coordinación de una respuesta fisiológica ante los estímulos externos o internos que pudieran estar causando la activación del sistema inmune (SI)<sup>121</sup>. A los fines de esta tesis nos centraremos en el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA).

El eje HPA está compuesto por el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal. El hipotálamo es una estructura del sistema nervioso central situada en la base del cerebro, en la cual se localizan numerosos núcleos nerviosos que regulan múltiples funciones vegetativas. Debajo del hipotálamo se ubica la hipófisis o glándula pituitaria, en la cual se distinguen dos porciones o lóbulos: la neurohipófisis y la adenohipófisis. Por otra parte, la glándula adrenal o suprarrenal se encuentra localizada en la parte superior de los riñones. La corteza suprarrenal es la región externa y también la parte más grande de una glándula suprarrenal. Se divide en tres zonas separadas: zona glomerulosa, zona fasciculada y zona reticularis. Cada zona es responsable de producir hormonas esteroideas específicas<sup>122</sup>.

El hipotálamo responde a señales circadianas, situaciones de estrés y a la presencia de citocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y la IL-6, liberadas en ante

infecciones o daño tisular<sup>123</sup>. Tras la aparición de estas señales, el hipotálamo produce la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP), las cuales se sintetizan en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN)<sup>124,125</sup>.

Tras la activación, la CRH y la AVP actúan sobre la hipófisis anterior, estimulando la síntesis y secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que es liberada en la circulación y se une a receptores presentes en las células adrenocorticales, estimulando así el proceso de esteroidogénesis<sup>126,127</sup>. Durante la esteroidogénesis, a partir del colesterol se sintetizan distintas hormonas esteroideas como la dehidroepiandrosterona (DHEA) y el cortisol. Una vez producido este último, es liberado al torrente sanguíneo, produce efectos sistémicos al unirse a los receptores de glucocorticoides (RG), de distribución ubicua. A su vez, regula la actividad del eje HPA controlando su propia producción mediante mecanismos de retroalimentación negativa<sup>128</sup>. Estos procesos actúan tanto a nivel hipotalámico como en la hipófisis anterior, inhibiendo la liberación de CRH, ACTH y la proopiomelanocortina o POMC, que es el precursor de la ACTH<sup>128-130</sup>. Estos sistemas reguladores tienen la función de mantener niveles fisiológicos normales de las hormonas involucradas.

**Figura 2: Regulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal**

Abreviaturas: ACTH: hormona adrenocorticotrópica; CRH: hormona liberadora de la hormona adrenocorticotrópica; IL-6: Interleucina-6; IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta; TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral.

La alteración del eje HPA lleva a un desequilibrio en las interacciones entre los sistemas endócrino e Inmune, conduciendo a una mayor susceptibilidad a infecciones, enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Es así como una estimulación crónica del eje, acompañada de niveles elevados y sostenidos de GCs, produce supresión de la RI, lo cual se asocia con una menor capacidad de SI para lidiar con infecciones virales y/o bacterianas<sup>131</sup>.

### 1.4.1 Dehidroepiandrosterona

La DHEA es un andrógeno producido por la corteza suprarrenal, que puede ser transformado en un éster sulfato (DHEA-S) y actuar como reservorio circulante para la formación periférica de hormonas sexuales<sup>132</sup>. En cuanto a sus funciones, tanto la DHEA como sus metabolitos llevan a cabo sus acciones biológicas a través de la activación de diversos receptores<sup>133</sup>. Aunque no se conoce el receptor específico de la DHEA, se sabe que este andrógeno se une a los receptores de las hormonas esteroides y a algunos receptores clase II (receptor/esteroide de pregnano X y xenobiótico) con una afinidad mucho más baja que la de sus ligandos afines<sup>134</sup>. Asimismo, el mecanismo de acción de la DHEA no está del todo dilucidado, la hormona ejercería su acción indirectamente sobre los tejidos diana periféricos después de su conversión a andrógenos y/o estrógenos; o directamente, como neuroesteroide<sup>135</sup>. La DHEA puede influir indirectamente en la función celular y los procesos fisiológicos a través de la conversión de sus metabolitos en hormonas esteroides activas.

Estudios en animales demostraron que la DHEA aumenta la actividad inmunológica protegiéndolos de infecciones virales, bacterianas y parasitarias<sup>136,137</sup>. Esta hormona también tiene efectos antiglucocorticoides tanto en macrófagos<sup>138</sup> como en linfocitos<sup>139</sup>, y se ha observado que la DHEA favorece la proliferación celular de los LT al actuar como un activador transcripcional del gen IL-2 de las células CD4<sup>+140,141</sup>. DHEA-S, a su vez, tiene funciones inmunomoduladoras, asociándose los niveles bajos de esta hormona con cambios en el repertorio de células inmunes, como una disminución en las principales subpoblaciones de LT, junto con un aumento en el número de células NK y LT que presentan un fenotipo activado<sup>142,143</sup>. Las infecciones crónicas, como es el caso de la TB, dan como resultado niveles circulantes elevados

de varias citocinas, incluidos TNF- $\alpha$  e interferones de tipo 1, así como niveles bajos de DHEA que se correlacionan negativamente con la severidad de la enfermedad pulmonar<sup>144</sup>. También se produce una disminución de las concentraciones plasmáticas de DHEA durante infecciones graves, como la tripanosomiasis africana, la cisticercosis, el HIV<sup>145-148</sup>, así como trastornos autoinmunes u otras enfermedades crónicas<sup>149</sup>.

### 1.4.2 Glucocorticoides

Los GCs endógenos (cortisol en humanos y la corticosterona en roedores), desempeñan un papel crucial en diversos procesos fisiológicos indispensables para la vida. Estas hormonas tienen una amplia gama de efectos reguladores en el organismo. Se ha demostrado su participación en la regulación del metabolismo<sup>150</sup>, la respuesta inmunitaria<sup>151</sup>, el balance hídrico y electrolítico<sup>152</sup>, funciones cardiovasculares<sup>153,154</sup>, el estado de ánimo y las funciones cognitivas<sup>155,156</sup>, como así también la reproducción<sup>157</sup> y el desarrollo<sup>158</sup>.

Al igual que con otras hormonas esteroideas, el cortisol se sintetiza principalmente en la corteza de la glándula suprarrenal<sup>159</sup>. La secreción de cortisol sigue un patrón circadiano, que está influenciado por los estímulos luz-oscuridad percibidos por el hipotálamo. En este sentido, se observa una secreción máxima temprano en la mañana en anticipación a las actividades relacionadas con la vigilia, mientras que, durante la noche, se registra un nivel mínimo de secreción<sup>160</sup>. Las fluctuaciones circadianas y ultradianas de los GCs influyen en la respuesta inmunológica y el tráfico de leucocitos. Además, si bien son menos pronunciadas que los cambios inducidos por estrés, estas variaciones sutiles tienen efectos notables. Se ha observado una relación inversa entre el recuento de linfocitos y los patrones diurnos de secreción de GCs, lo que resulta en una disminución del 40% en el número

de células T circulantes de la noche a la mañana como resultado de variaciones en los niveles de cortisol<sup>161</sup>.

Los GCs regulan la expresión de una amplia variedad de genes relacionados a la funcionalidad del SI, como citocinas, moléculas de adhesión, quimioattractantes, entre otros. De esta manera afectan el tráfico de las células inmunes, así como su migración, maduración y diferenciación. A su vez, provocan un cambio de polaridad de la RI desde un perfil Th1 (inmunidad celular) hacia uno Th2 (inmunidad humoral)<sup>162,163</sup>, es decir, desde un patrón de citocinas pro-inflamatorias hacia un perfil antiinflamatorio. Estudios más recientes revelan que durante el curso de la RI los GCs ejercen efectos diferenciales sobre las células T efectoras y reguladoras, con una intensa inhibición en la proliferación de las primeras y apoptosis diferencial de las segundas<sup>164</sup>. En determinadas condiciones los GCs también podrían llegar a tener efectos pro-inflamatorios por algún mecanismo no del todo conocido. Estas acciones aparentemente opuestas operarían en conjunto para preparar al sistema inmunológico a responder al estímulo estresante (efecto pro-inflamatorio) y subsecuentemente restaurar la homeostasis<sup>151</sup>.

### **1.4.3 Receptor de glucocorticoides**

Los GCs ejecutan su acción al unirse al RG, el cual es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, a la que también pertenecen los receptores para estrógeno, progesterona, andrógenos y mineralocorticoides<sup>165</sup>. Los GCs también pueden unirse, aunque con menor afinidad, al receptor de mineralocorticoides (RM), que se expresa principalmente en los riñones y regula una variedad de genes implicados en la homeostasis del sodio<sup>166</sup>. Este receptor, dentro de los receptores nucleares con ligando específico conocido, es el único capaz de unir dos ligandos endógenos, la aldosterona y el cortisol<sup>167</sup>.

#### 1.4.4 Estructura genómica del receptor de glucocorticoides

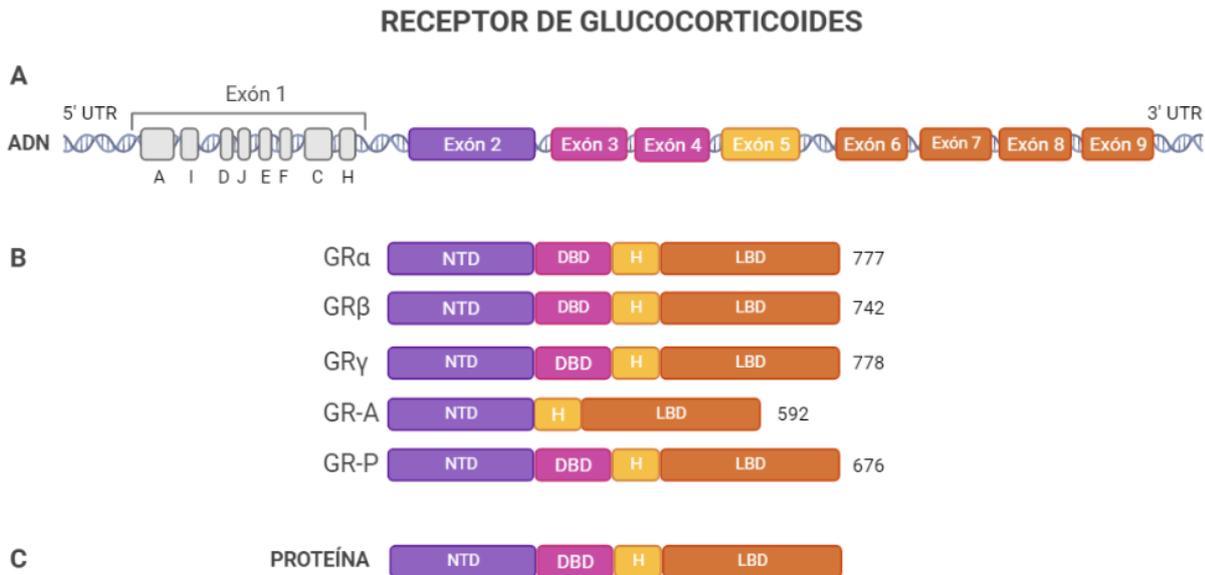
En humanos, el gen del RG (NR3C1) está conformado por nueve exones; el primer exón no se traduce en tanto que los 8 exones restantes están implicados en codificar la proteína (exón 2 al 9). En términos estructurales, el RG está compuesto por 3 dominios principales: el dominio de transactivación amino-terminal (NTD); el dominio de unión a ADN (DBD) y un dominio de unión a ligando (LBD) (Fig. 3C). Cada dominio comprende una función específica: el NTD cumple la función de activación transcripcional, conteniendo la mayoría de los residuos aminoacídicos sujetos a modificaciones postraduccionales. Además, el NTD es importante para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional basal. Por su parte, el DBD consta de dos dedos de zinc implicados en la unión al ADN, la translocación nuclear y la dimerización de RG. Finalmente, el LBD es la región que interactúa específicamente con el ligando, los GCs<sup>168</sup>.

En relación al exón 1, se sabe que el RG tiene una compleja estructura, ya que cuenta con 9 promotores alternativos y 13 variantes de *splicing*<sup>169</sup> (Fig. 3A). Se ha comprobado que el uso específico de las diferentes regiones promotoras puede variar significativamente en distintos tipos de células y tejidos, indicando que la expresión del gen NR3C1 puede estar regulada de manera selectiva en diferentes contextos celulares<sup>170–172</sup>.

La región 5' no traducida (UTR) del gen NR3C1 se caracteriza por un elevado contenido de CpG, pero carece de cajas TATA o CAT<sup>173,174</sup>. Sin embargo, contiene múltiples sitios de unión para factores de transcripción que actúan tanto como activadores (como NFκB, RE, cAMP, Sp1, PU.1, entre otros) y como represores (como el factor 1 de respuesta a GC, c-Ets-1/2), regulando así la expresión del gen NR3C1<sup>173,175–177</sup>. Además, se han identificado varios elementos de respuesta a GCs

(GRE), que contienen la secuencia GGAACAnnnTGTTCT y GRE negativos (nGRE); que tienen la secuencia consenso CTCC (n) 0–2GGAGA en la región promotora del gen RG. Esto sugiere que el receptor puede unirse específicamente a su propio promotor, ejerciendo un control autorregulatorio<sup>178</sup>. Además, estas variantes del exón 1 están sujetas a diversas modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN y acetilación/metilación de histonas, que ocurren en esta región y en otras<sup>169,179</sup>. Asimismo, se ha evidenciado que por medio de la interacción directa entre el RG y la cromatina, así como, indirectamente, mediante el reclutamiento de enzimas que modifican histonas y ADN, los GCs son capaces de integrar y transmitir señales tanto del entorno como del interior celular y de tejidos específicos, desencadenando un programa transcripcional complejo<sup>180</sup>.

Aunque sólo un gen codifica para el RG, a través de mecanismos de *splicing* alternativo de la región 3' UTR del transcripto primario pueden generarse dos isoformas del receptor, alfa (RG $\alpha$ ) y beta (RG $\beta$ ), que difieren en el exón 9 (9 $\alpha$  y 9 $\beta$ ), cada uno de ellos con extremos carboxilos terminales<sup>181,182</sup>. De esta forma, ambas isoformas comparten 727 aminoácidos, pero RG $\alpha$  contiene un exón 9 de 50 aminoácidos adicionales, lo que da como resultado una proteína de 777 aminoácidos, mientras que RG $\beta$  contiene un noveno exón de 15 aminoácidos adicionales y, por lo tanto, se compone de 742 aminoácidos. Así, RG $\beta$  tiene un dominio de unión a ligando (LBD) más corto que ha perdido la capacidad de unirse a los GCs (Fig 3B).

**Figura 3: Gen y proteína del receptor de glucocorticoides.**

(A) Estructura genómica del gen del receptor de glucocorticoides (RG). (B) Variantes del RG generadas por *splicing* alternativo. (C) Estructura de la proteína del RG: dominio N-terminal (NTD), dominio de unión a ADN (DBD), región bisagra (H) y dominio de unión a ligando (LBD).

Además de GR $\beta$ , se han identificado otras isoformas del RG que se obtienen mediante el proceso de *splicing* alternativo. Una de estas variantes es GR $\gamma$  y se distingue por tener una inserción de un residuo de arginina en su dominio de unión al ADN<sup>183</sup> (Fig. 2B). Otras isoformas identificadas incluyen GR-A, que carece de los exones 5 a 7, codificantes de la mitad amino-terminal del LBD, y GR-P que es una isoforma truncada que carece de los exones 8 y 9, que codifican la mitad carboxilo-terminal del LBD<sup>184,185</sup> (Fig. 3B). Debido a cambios en el LBD, GR-A y GR-P no se unen a los GCs.

### 1.1.1.1 Receptor de glucocorticoides alfa

GR $\alpha$  es el receptor clásico responsable de las acciones de los GCs. La activación del GR $\alpha$  puede tener diversos efectos en el organismo, incluyendo la regulación de la respuesta inflamatoria, la supresión del sistema inmunitario<sup>164</sup>, el

control del metabolismo de los carbohidratos<sup>186,187</sup> y la modulación de la reacción al estrés<sup>188</sup>. En cuanto al proceso inflamatorio, el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y otras citocinas inflamatorias generadas periféricamente activan el eje HPA en múltiples favoreciendo la producción de GCs<sup>189-191</sup>. En este contexto, el GC-RG $\alpha$  es necesario para prevenir la activación excesiva de las células fagocíticas y mejorar la eliminación bacteriana intracelular<sup>192</sup>. En la segunda fase, cuando prevalece la inflamación, el GC-RG $\alpha$  ejerce su acción antiinflamatoria clásica al (i) inhibir la vía de señalización del NF- $\kappa$ B, AP-1 y otras vías involucradas en la inflamación, y (ii) aumentar la transcripción de genes antiinflamatorios y de la proteína inhibidora del NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B<sup>193</sup>.

La restauración de la estructura y función tisular, es un proceso activo y cuidadosamente orquestado asociado con múltiples vías bioquímicas, incluido el cambio de producción de mediadores proinflamatorios a mediadores proresolutivos<sup>194</sup>. A medida que se continúa disminuyendo la inflamación sistémica y tisular, el GC-RG $\alpha$  activado se involucra en una serie de mecanismos proresolutivos que cambian, entre otros, el fenotipo de los granulocitos y los macrófagos. En estas células inmunitarias, mediante mecanismos genómicos, el GC-RG $\alpha$  aumenta la expresión de la Anexina A1 (ANXA1), el receptor de ANXA1 y la Cremallera de Leucina Inducida por Glucocorticoides (GILZ)<sup>195,196</sup>. La acción coordinada de GILZ y ANXA1 es esencial para regular la resolución del proceso<sup>197</sup>. Los granulocitos experimentan apoptosis constitutiva, desactivando sus respuestas de las secretoras potencialmente perjudiciales, es decir, la activación de NF- $\kappa$ B y la transcripción de citocinas inflamatorias con una disminución de la migración transendotelial, hecho que conduce al reconocimiento e internalización de los granulocitos por parte de los macrófagos (eferocitosis)<sup>198-200</sup>. Finalmente, se logra concluir con el fenómeno inflamatorio y se restablece la homeostasis.

Durante todo este proceso, los niveles de  $RG\alpha$  dentro de la célula no son estáticos, sino que están controlados de manera precisa por numerosos factores y en múltiples niveles. Aunque el  $RG\alpha$  se expresa de manera constitutiva, muestra patrones de expresión distintos en diferentes células y tejidos debido a la regulación diferencial<sup>193</sup>.

### **1.1.1.2 Receptor de glucocorticoides beta**

La variabilidad de las respuestas celulares mediadas por el RG se amplía aún más por la existencia de diversas isoformas del receptor, principalmente  $RG\alpha$  y  $RG\beta$ . Mientras que  $RG\alpha$  es el responsable de las acciones de los GCs,  $RG\beta$  actúa en detrimento de las actividades mediadas por la isoforma  $\alpha$ .  $RG\beta$  se describió originalmente como un receptor huérfano localizado constitutivamente en el núcleo<sup>181,201,202</sup>. Sin embargo, se ha identificado que la localización de  $RG\beta$  puede variar de acuerdo al tipo celular. En monocitos,  $RG\beta$  se encontró ubicado tanto en el citoplasma como en el núcleo mientras que en LT se ubica exclusivamente en el núcleo<sup>203</sup>.

$RG\beta$  se asocia a la insensibilidad a los GCs, en donde su capacidad para regular la expresión génica se atribuye principalmente a su antagonismo con  $RG\alpha$ <sup>168</sup>. La acción de  $RG\beta$  como inhibidor de la actividad dominante negativa del  $RG\alpha$  puede ser ejecutada por diversos mecanismos, entre los cuales se incluyen la competencia por la unión a GRE y a co-reguladores transcripcionales, así como también a la formación de heterodímeros  $RG\alpha/RG\beta$  inactivos<sup>204–207</sup>. De hecho, se ha demostrado que la relación de la expresión de  $RG\alpha$  respecto de la de  $RG\beta$  ( $RG\alpha:RG\beta$ ) controla la capacidad de respuesta celular de los GCs en varias células y tejidos, en donde las razones más plausibles se correlacionan con una mayor sensibilidad a GCs, mientras que las relaciones menos admisibles se asocian con la resistencia a GCs<sup>208–211</sup>. En

enfermedades inflamatorias como asma<sup>212</sup>, artritis reumatoide<sup>213</sup>, colitis ulcerosa<sup>214</sup> y lupus eritematoso sistémico<sup>215</sup> se ha observado este comportamiento<sup>182</sup>. Es así que, RG $\beta$  promueve la resistencia a GCs a través de mecanismos dependientes de RG $\alpha$  principalmente mediante la formación de un heterodímero con RG $\alpha$ , que impide la transactivación de este último, afectando las actividades mediadas por RG $\alpha$ <sup>208,209,211</sup>.

Se ha observado que la regulación de la relación RG $\alpha$ /RG $\beta$  puede estar influenciada por proteínas ricas en serina/arginina (SRps) que cumplen un rol importante en el mecanismo de *splicing* alternativo. Un ejemplo de esto son las proteínas SRp30c y SRp40c, que promueven la inclusión del exón 9 $\beta$  y generan el transcrito de RG $\beta$ <sup>216,217</sup>, mientras que un aumento de la proteína SRp20c favorece el empalme del exón 9 $\alpha$ <sup>218</sup>. La expresión de RG $\beta$  también puede verse regulada por mediadores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ <sup>219</sup>. Asimismo, se ha demostrado en la línea celular promonocítica THP-1 que la hormona DHEA contrarresta la actividad del cortisol al inducir la expresión de SRp30c, lo que promueve la expresión del transcrito beta<sup>220,221</sup>.

Más allá de su papel como inhibidor dominante negativo, RG $\beta$  puede regular la transcripción de forma independiente de RG $\alpha$ <sup>181,222,223</sup>. Diversos estudios han evidenciado que RG $\beta$  modula la expresión de genes involucrados en la inmunidad innata y adaptativa<sup>224</sup>, asimismo está implicado en procesos fisiológicos como el metabolismo, la comunicación celular, la migración y malignidad<sup>225</sup>. Es interesante destacar que RG $\beta$  puede influir sobre la inflamación al activar la vía de señalización de NF- $\kappa$ B y simultáneamente disminuir la expresión del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)<sup>226</sup>.

#### **1.4.5 Mecanismos de señalización del cortisol**

Una vez liberado de las células esteroideogénicas, el cortisol es transportado en la sangre por la albúmina y la globulina transportadora de corticosteroides (CBG).

Estas proteínas regulan la concentración de cortisol libre en el plasma controlando su disponibilidad<sup>227</sup>. El cortisol libre es una molécula liposoluble capaz de difundir a través de las membranas plasmáticas e ingresar al citoplasma. Una vez dentro de las células, puede ser convertido en cortisona inactiva mediante la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (11 $\beta$ -HSD2), mientras que la enzima 11 $\beta$ -HSD1 favorecerá la reacción inversa. Las señales inflamatorias, que incluyen TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , modulan la expresión de las enzimas 11 $\beta$ -HSD, alterando así la sensibilidad celular a los GCs endógenos<sup>228,229</sup>.

Por otra parte, en ausencia de cortisol, el RG se encuentra como monómero en el citoplasma asociado a proteínas chaperonas como la proteína de choque térmico (Hsp) 90, Hsp70 y la inmunofilina FK506 binding protein 51 (FKBP51), en una conformación de alta afinidad por su ligando<sup>230-232</sup>. Tras la unión del cortisol, el complejo RG-chaperona se reorganiza nuevamente, FKBP51 es reemplazado por FKBP52 y se induce un cambio conformacional que le permite al RG exponer sus secuencias de localización nuclear y translocar al núcleo<sup>233</sup>. De este modo, el RG unido al ligando se dirige hacia el núcleo para ejercer efectos genómicos, activando o reprimiendo genes diana, aunque también puede permanecer en el citoplasma y las mitocondrias ejecutando efectos no genómicos<sup>234,235</sup>. En el núcleo, el RG tiene la capacidad de modular la expresión génica principalmente formando homodímeros (RG-RG), sin embargo, también puede actuar como monómero uniéndose a sitios de media secuencia GRE<sup>236</sup> o incluso se ha sugerido que el RG puede formar tetrámeros<sup>237</sup>.

### **1.4.6 Mecanismos de acción mediado por el receptor de glucocorticoides**

De acuerdo con lo ya expresado, los RGs ejercen efectos genómicos a través de diversos mecanismos de control transcripcional, formando homodímeros que se unirán a sitios GRE y reclutarán coactivadores para ejercer conjuntamente la regulación de la expresión génica (transactivación)<sup>238,239</sup>. Por el contrario, los monómeros se unen a nGRE y unen correpresores que inhibirán la transcripción (transrepresión)<sup>240</sup>. También se puede inducir la transrepresión al unirse dos monómeros de RG en lados opuestos del ADN a secuencias compatibles con nGRE e invertida (IR nGRE)<sup>241</sup> (Fig. 4 -1).

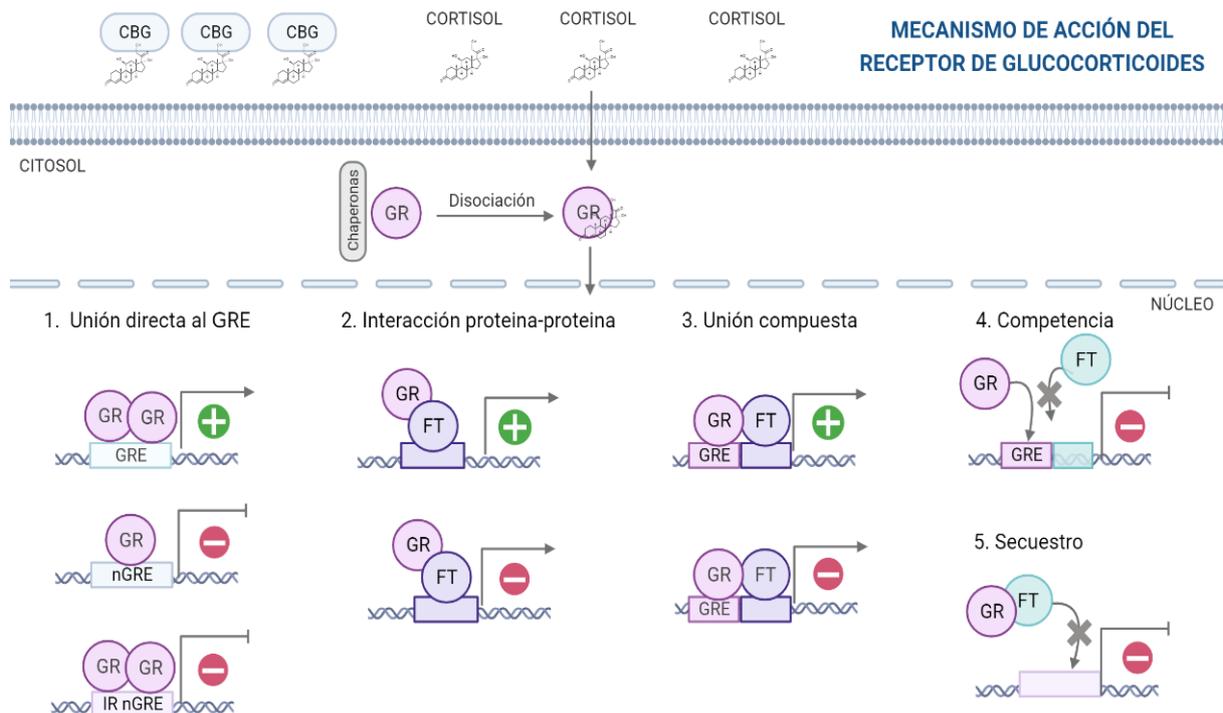
Clásicamente, se pensaba que los sitios GRE y los nGRE funcionaban como componentes de los promotores génicos. Sin embargo, se ha observado que la mayoría de los sitios de unión del RG se encuentran en áreas intragénicas y en regiones distantes de los sitios de inicio de la transcripción<sup>242</sup>. Además, la distribución de la unión al RG en el genoma difiere sustancialmente entre tejidos, indicando que la estructura de la cromatina determina los sitios GRE que estarán accesibles para el RG, lo que contribuye a la heterogeneidad de las respuestas a los GCs<sup>243</sup>. También se ha demostrado que muchos sitios de unión del RG se encuentran muy lejos de un gen o de sitios activos en la transcripción, indicativo que el RG a menudo ocupa regiones potenciadoras y/o está involucrado en el bucle de la cromatina en la regulación transcripcional del RG<sup>244</sup>.

El RG puede asociarse a otros factores de transcripción (FT) y, mediante la interacción proteína-proteína, modular la expresión génica sin requerir contacto directo con el ADN<sup>245</sup> (Fig. 4 -2). Esta forma de regulación se considera como el mecanismo predominante de transrepresión mediado por el RG sobre los FT proinflamatorios, como NF- $\kappa$ B y AP-1<sup>246,247</sup>. El tercer mecanismo descrito para los

efectos genómicos de los GC implica la unión del RG monomérico y otros FT a elementos compuestos, es decir, secuencias de ADN que contienen medio sitio GRE (mitad GRE) y un elemento de respuesta para otro factor de transcripción<sup>236,248</sup>. Se ha demostrado que el RG puede reprimir la expresión de genes proinflamatorios al unirse a elementos de respuesta genómicos de NF- $\kappa$ B ( $\kappa$ BRE)<sup>249</sup> (Fig. 4 -3).

El RG también puede reprimir la expresión génica al competir con otros FT por la unión al ADN<sup>250,251</sup> (Fig. 4 -4). De hecho, recientemente se descubrió que incluso se encuentran sitios medios de RG incrustados en elementos de respuesta AP-1 (Proteína Activadora-1), que es una proteína que interviene en la respuesta inflamatoria<sup>252</sup>. Por último, el RG puede secuestrar FT, obstruyendo su acción<sup>253</sup> (Fig. 4 -5).

Es interesante destacar que el RG no solo ejerce su acción antiinflamatoria mediante la represión directa de FT proinflamatorios, sino que también es capaz de modular la transcripción de genes antiinflamatorios. Se han identificado varios ejemplos de genes que regulan la inflamación mediante la unión de homodímeros (RG-RG) a GRE canónicos. Algunos de estos genes incluyen ANXA1, NFKBIA ( $I\kappa$ B $\alpha$ ), DUSP1 (proteína fosfatasa dual específica 1), GILZ y ZFP36 (TPP). Además, se ha observado que los coactivadores reclutados por los homodímeros, también son coactivadores de otros FT involucrados en vías proinflamatorias, como NF- $\kappa$ B y AP-1. Por lo tanto, el RG al competir por estos coactivadores, lleva a una menor expresión de genes asociados con estos FT<sup>168,254-256</sup>. Estos hallazgos sugieren que el RG puede ejercer su acción antiinflamatoria mediante la modulación de la expresión génica en múltiples niveles de regulación y a través de diferentes mecanismos, lo que demuestra la compleja red de señalización que el RG es capaz de coordinar.

**Figura 4: Mecanismos de acción mediados por el receptor de glucocorticoides**

Los glucocorticoides (GCs) son moléculas liposolubles que difunden a través de la membrana plasmática y se unen al receptor de GCs (RG) en el citoplasma. Tras la unión, RG sufre un cambio conformacional que conduce a la disociación del complejo de chaperonas al cuál se encuentra asociado, lo que le permite exponer sus secuencias de localización nuclear y translocar al núcleo. Una vez en el núcleo el RG es capaz de activar (+) o reprimir (-) la expresión génica mediante diversos mecanismos. (1) Unión directa al ADN: la interacción de dímeros de RG puede activar genes al unirse a elemento de respuesta a GCs (GRE), pero también puede reprimir la transcripción al unirse a GRE repetidos e invertidos (IR GRE). Asimismo, el RG se puede unir como monómeros a GRE negativos (GRE<sub>n</sub>) e inhibir la transcripción. (2) Interacción proteína-proteína (*Tethering*): el RG puede interaccionar físicamente con otros Factores de transcripción (FT) y modular su actividad sin unirse al ADN. (3) Unión Compuesta: monómeros del RG se unen directamente a una mitad de GRE cerca del sitio de unión de otro FT, lo que da como resultado la transcripción o represión del gen. (4) RG también puede competir con otros FT para unirse al ADN (5) o puede secuestrarlos e impedir la transcripción génica.

### **1.4.7 Genes regulados por el receptor de glucocorticoides**

Tal como se describió en la sección anterior, el RG tiene un rol importante como agente anti-inflamatorio e inmunosupresor, siendo capaz de regular la expresión génica de una plétora de genes a través de múltiples mecanismos. A los fines de esta tesis, es relevante ahondar con mayor profundidad en la expresión de genes regulados por el RG que desempeñan un rol importante en la acción antiinflamatoria de los GCs. Por lo tanto, en las siguientes secciones se detallarán brevemente algunas de las principales características y funciones de estos genes.

### **1.4.8 Genes regulados positivamente por el receptor de glucocorticoides y relacionados con procesos antiinflamatorios e inmunosupresores.**

#### **1.4.8.1 ANEXINA A1**

Dada la naturaleza estructural de esta proteína, desempeña tanto efectos pro como antiinflamatorios. El dominio N-terminal de ANXA1 media la actividad antiinflamatoria mientras que la región central facilita funciones proinflamatorias, como la fusión y agregación de membranas, así como la promoción de la agrupación y migración a través del endotelio.

En condiciones homeostáticas los neutrófilos, monocitos y macrófagos expresan de manera constitutiva niveles elevados de ANXA1 en su citoplasma<sup>257-259</sup>, mientras que la expresión en LT es 100 veces menor que en estas células<sup>260</sup>. ANXA1 se encuentra en el citoplasma y en la membrana<sup>260</sup>, pero también puede secretarse y actuar tanto de forma autocrina como paracrina<sup>261,262</sup>. Durante la respuesta inflamatoria, los GCs estimulan la síntesis, así como la secreción de ANXA1<sup>263</sup>. No obstante, tras la activación, ANXA1 se transporta a la membrana y es capaz de inhibir la adhesión y migración de neutrófilos y monocitos al endotelio<sup>264-266</sup>. Por el contrario, se ha señalado que ANXA1 puede inducir efectos proinflamatorios después de ser

escindida en su extremo N-terminal. El péptido escindido promueve la trans migración de neutrófilos.

En relación al papel de ANXA1 en las células de la inmunidad adaptativa, se ha observado que en LT su acción puede variar según las condiciones microambientales y el estado de activación de las células. Algunos estudios han mostrado que la ausencia de ANXA1 en LT activados altera la vía de señalización mediada por el TCR, disminuyendo la señalización y favoreciendo<sup>267</sup> a la par la inhibición la respuesta Th1<sup>268</sup>.

#### **1.4.8.2 GILZ**

GILZ es una proteína ampliamente expresada, y regulada principalmente a nivel transcripcional por el RG. Actúa mediando los efectos antiinflamatorios de los GCs, ya que es capaz de modular la expresión de genes proinflamatorios e inhibir las vías de transducción de señales de la Proteína Quinasa Activada por Mitógeno (MAPK)<sup>269</sup>. GILZ modula FTs y vías de señalización asociadas con la inmunidad y la inflamación, así como también está implicada en procesos como la apoptosis, proliferación y diferenciación celular<sup>270–272</sup>.

Después de la activación de la respuesta adaptativa, los LT sobrevivientes se diferencian en diferentes linajes bajo la influencia de señales del TCR y otros estímulos<sup>273,274</sup>. GILZ promueve el cambio de una respuesta de perfil Th1 a Th2 inhibiendo la expresión de T-bet e induciendo la de GATA3, sendos reguladores de ambos perfiles<sup>275</sup>.

En las CDs, GILZ desempeña un papel activo en la inducción de un fenotipo tolerogénico, inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias y suprimiendo la expresión de CD80 y CD86 para así interferir en la presentación antigénica<sup>276</sup>. Además, las CDs producen IL-10 y TGF- $\beta$ , colaborando con la expresión de GILZ,

fortaleciendo así un ciclo de supresión de la activación inmunitaria y contribuyendo a la diferenciación de los LT hacia un perfil regulador<sup>277,278</sup>.

Por otra parte, GILZ interactúa con ANXA1 tanto en macrófagos como neutrófilos, inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias por parte de los primeros, e interfiriendo con la capacidad migratoria de los segundos. De esta manera GILZ y ANXA1 colaboran para evitar una respuesta inmunitaria excesiva que pudiera ocasionar daño en los órganos y tejidos involucrados<sup>278,279</sup>.

### 1.4.8.3 FKBP51

Las proteínas de unión a la droga inmunosupresora FK506 (FKBP, según sus siglas en inglés *FK506 Binding Proteins*) pertenecen a la familia de inmunofilinas. que se caracteriza por poseer actividad peptidil-prolil-isomerasa (cis/trans), capaz de catalizar la isomerización del enlace peptídico cis-trans que antecede al aminoácido prolina induciendo un cambio conformacional en la proteína diana<sup>280</sup>. FKBP51 y FKBP52 (51 kDa y 52 kDa) además de poseer un dominio peptidil-prolil-isomerasa, tienen un dominio de tres unidades repetidas en tándem con la propiedad de asociarse con las proteínas de choque térmico 90 (Hsp 90, del inglés *Heat Shock Proteins 90 kDa*) y Hsp 70 (Hsp 70kDa)<sup>281</sup>. A pesar de que estas proteínas comparten 60% de identidad en la secuencia de aminoácidos y 75% de similitud, sus dominios se orientan de manera diferente, provocando efectos diferenciales en la unión con Hsp90<sup>282</sup>.

Las proteínas FKBP51 y FKBP52 fueron identificadas por primera vez formando complejos con receptores esteroides<sup>283,284</sup>, tiempo más tarde se reveló que estas proteínas tienen roles opuestos sobre los receptores tanto en el control de la localización subcelular como en el transporte del receptor hacia el núcleo<sup>285</sup>. FKBP51 actúa como co-chaperona formando un heterocomplejo en el citosol con Hsp90 y el

RG<sup>286</sup>. Al unirse la hormona al receptor se disocia FKBP51 del heterocomplejo y se sustituye por FKBP52<sup>285</sup>. Luego, ésta recluta al complejo motor dineína/dinactina, el cual contribuye con el transporte del RG hacia el núcleo donde ejerce su rol como FT<sup>287</sup>. La expresión del gen que codifica para FKBP51 puede ser inducida por ciertas hormonas como los GCs, aunque no el gen FKBP52, el cual está bajo una robusta regulación positiva por esta hormona, lo que hace que la proteína FKBP51 sea un componente de un bucle regulador ultracorto en la señalización de esteroides que regula la sensibilidad a GCs<sup>288</sup>.

#### **1.4.8.4 NFKB**

El NF-κB se descubrió por primera vez en 1986 en el núcleo de linfocitos B como un elemento potenciador de la cadena liviana de la inmunoglobulina kappa (Sen 1986). Tiempo después, se reveló que NF-κB representa una familia de FT que median la expresión de genes diana, uniéndose a elementos específicos del ADN, κB *enhancer*<sup>289</sup>. Esta familia está compuesta por cinco miembros relacionados estructuralmente que incluyen a RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105) y NF-κB2 (p100)<sup>290,291</sup>. Estos dos últimos se encuentran como proteínas precursoras, las cuales pueden experimentar un procesamiento proteolítico para formar las subunidades p50 y p52<sup>292,293</sup>. A diferencia del procesamiento regulado por señales de p100<sup>294</sup>, el procesamiento de p105 ocurre de manera constitutiva y cotraduccionamente, en la cual cierta proporción de p105 puede permanecer sin ser procesada y ser capaz de retener a NF-κB en el citoplasma<sup>295</sup>. El rol como FT es ejercido por heterodímeros formados por p50 o p52 y otras proteínas Rel o por homodímeros (p50-p50 o p52-p52) que pueden actuar por sí solos reprimiendo la transcripción o pueden formar complejos al asociarse a activadores como Bcl-3 o a represores como HDA-1. Es así

que la composición de los dímeros determina si actúa como activador o represor de la transcripción<sup>291,296,297</sup>.

NF- $\kappa$ B es capaz de orquestar múltiples procesos fisiológicos y patológicos como la respuesta inmune innata y adaptativa, la proliferación celular, la inflamación y la carcinogénesis<sup>298</sup>. Funciona como un mediador fundamental de la respuesta inflamatoria al inducir la expresión de varios genes proinflamatorios, incluida las citocinas y quimiocinas, y también participa en la regulación del inflamasoma<sup>298</sup>.

En células no estimuladas, NF- $\kappa$ B es secuestrado en el citoplasma por el inhibidor de la familia NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Tras la estimulación, el complejo I $\kappa$ B quinasa se activa y fosforila al I $\kappa$ B para ser degradado por el proteasoma. La degradación de I $\kappa$ B libera a NF- $\kappa$ B, permitiéndole trasladarse al núcleo para iniciar una respuesta transcripcional<sup>291</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B se produce a través de dos vías denominadas vía clásica o canónica y vía alternativa o no canónica la cual selectivamente activa a miembros de NF- $\kappa$ B secuestrados por p100<sup>299</sup>. La vía canónica de NF- $\kappa$ B responde rápidamente a diversos estímulos que incluyen a las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ), receptores de reconocimiento de patrones (PRR), miembros de la familia de receptores de TNF- $\alpha$ , así como TCR y receptores de células B (BCR)<sup>300,301</sup>. Mientras que la vía no canónica responde a estímulos de desarrollo y supervivencia desencadenando una respuesta lenta e irreversible<sup>302</sup>.

Durante una infección por patógenos como Mtb existen varios mecanismos por los cuales las vías de señalización de NF- $\kappa$ B pueden ser moduladas ante el agente infeccioso<sup>303</sup>. Varias proteínas de Mtb son capaces de regular genes inflamatorios al atenuar la activación de NF- $\kappa$ B lo que conduce a aumentar la supervivencia de la bacteria<sup>304</sup>. Estos hechos evidencian el rol vital de NF- $\kappa$ B en la respuesta protectora

contra el patógeno y la capacidad de Mtb para modular la vía de señalización de NF- $\kappa$ B.

En contraposición a la respuesta pro inflamatoria inducida por NF- $\kappa$ B, el RG regula la respuesta anti-inflamatoria al interactuar físicamente con NF- $\kappa$ B y reprimir su transactivación<sup>305,306</sup>. Asimismo, el RG es capaz de inducir la expresión del inhibidor de NF- $\kappa$ B alfa (I $\kappa$ B $\alpha$ ), el cual puede secuestrar a NF- $\kappa$ B en el citoplasma<sup>307,308</sup>. Es así que, la interacción entre ambas vías de señalización codifica diversos programas de expresión génica que facilitan una defensa eficaz del hospedero<sup>256</sup>.

#### **1.4.8.5 INHIBIDORES DE NFKB ALFA Y BETA**

La vía de señalización de NF- $\kappa$ B regula diferentes aspectos de la inmunidad innata y adaptativa. Por lo tanto, para asegurar la homeostasis fisiológica esta vía está estrictamente regulada en múltiples niveles por diversos mecanismos. Bajo condiciones fisiológicas NF- $\kappa$ B se encuentra en las células unido a proteínas inhibitoras de NF- $\kappa$ B, que lo mantienen secuestrado en el citoplasma impidiéndole ejercer su acción como FT<sup>309</sup>. Los I $\kappa$ Bs, incluidas las proteínas I $\kappa$ B clásicas (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ ), las proteínas I $\kappa$ B no clásicas (Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ BNS, I $\kappa$ B $\eta$  e I $\kappa$ BL) y las proteínas I $\kappa$ B precursoras (p105 y p100), son moléculas importantes que regulan la activación de NF- $\kappa$ B. Los distintos inhibidores se distinguen en su preferencia por ciertos homodímeros y heterodímeros de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  se une preferentemente a heterodímeros presentes en las subunidades p50, p65 y c-Rel<sup>310,311</sup>, mientras que I $\kappa$ B $\beta$  se une a p65- c-Rel<sup>312,313</sup>.

##### **Inhibidor de NF- $\kappa$ B alfa (I $\kappa$ B $\alpha$ )**

I $\kappa$ B $\alpha$  sigue siendo el miembro prototípico de la familia de proteínas I $\kappa$ B. En estado de reposo, los dímeros p65/p50 son predominantemente secuestrados por

I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>311,314</sup>, tras un estímulo I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilado por un complejo de kinasas. Subsecuentemente, NF- $\kappa$ B puede ingresar al núcleo y regular la transcripción de numerosos genes. Inclusive, NF- $\kappa$ B puede impulsar la expresión del gen del I $\kappa$ B $\alpha$  (NFKBIA), generando un bucle de retroalimentación negativa<sup>315,316</sup>. Por lo tanto, la duración de la respuesta de NF- $\kappa$ B depende en gran medida de la cinética de la vía de retroalimentación<sup>317</sup>. Por otra parte, varios estudios han demostrado que el RG puede inducir la expresión del NFKBIA, lo que resulta en la producción de proteína I $\kappa$ B de novo que puede asociarse rápidamente con NF- $\kappa$ B e inhibir la translocación nuclear de este último<sup>318</sup>.

### **Inhibidor de NF- $\kappa$ B beta (I $\kappa$ B $\beta$ )**

I $\kappa$ B $\beta$  comparte varias propiedades estructurales y funcionales con I $\kappa$ B $\alpha$  pero principalmente se diferencia en que su degradación se induce tras estímulos que causan una activación más persistente de NF- $\kappa$ B, como LPS o IL-1 $\beta$ <sup>312</sup>. Existen diferencias estructurales que residen en el hecho que I $\kappa$ B $\beta$  carece de región de exportación nuclear y que la región de interacción del ADN de NF- $\kappa$ B no contacta con el inhibidor. Por lo tanto, NF- $\kappa$ B está disponible para unirse al ADN aún en presencia del inhibidor, y el complejo NF- $\kappa$ B·I $\kappa$ B $\beta$  puede permanecer en el núcleo<sup>313,319</sup>. Otros estudios observaron que el complejo NF- $\kappa$ B·I $\kappa$ B $\beta$  se mueve entre el citoplasma y el núcleo, mientras que el complejo p50·p65·I $\kappa$ B $\alpha$  se localiza en el citoplasma en células en reposo<sup>320,321</sup>. Por lo tanto, las proteínas de la familia I $\kappa$ B y NF- $\kappa$ B/Rel establecen una interrelación compleja que permite la transcripción modulada dependiente de NF- $\kappa$ B, adaptada al entorno fisiológico.

### **1.4.9 Genes regulados negativamente por el receptor de glucocorticoides y relacionados con procesos inflamatorios e inmunoestimuladores.**

Es ampliamente conocido que los GCs no sólo regulan los niveles de inflamación mediante la inducción de la expresión de ciertos genes anti-inflamatorios, sino también pueden reprimir la expresión de genes pro-inflamatorios mediante la interacción física entre el RG y NF- $\kappa$ B. Dada la naturaleza del RG, éste es capaz de restablecer la homeostasis integrando diversas vías de señalización. A los fines de esta tesis se decidió estudiar a las citocinas IL-6, IL- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , por su implicancia tanto en la RI como en la inflamación.

#### **1.4.9.1 INTERLEUCINA 6**

La IL-6 es un mediador soluble con efectos pleiotrópicos que desempeña tanto funciones proinflamatorias como antiinflamatorias. Juega un papel central en diversos mecanismos de defensa del organismo, como la respuesta inmune, la hematopoyesis y las reacciones de fase aguda en el hígado<sup>322</sup>. Esta citoquina ejerce su actividad principalmente mediante la unión a su receptor en la membrana celular, desencadenando una cascada de transducción de señales. Asimismo, existe un receptor soluble para IL-6, que tiene efectos agonistas y es capaz de unir a IL-6 para luego, interactuando con la proteína gp130, llevar adelante un proceso de señalización y transactivación en aquellas células que no expresan el receptor de membrana y así puedan responder a IL-6<sup>323</sup>.

En el sistema inmunológico innato, IL-6 induce la diferenciación de monocitos a macrófagos<sup>324</sup> y se asocia con propiedades inmunosupresoras en las CD<sup>325</sup>. IL-6 también puede iniciar las respuestas inflamatorias en los tejidos promoviendo la infiltración y activación de leucocitos mononucleares mientras que suprime la infiltración de neutrófilos<sup>326</sup>. Los neutrófilos y los monocitos/macrófagos son capaces

de producir y responder a IL-6, contribuyendo a la amplificación de la respuesta inflamatoria y a la transición de un estado inflamatorio agudo a crónico. Una vez que se sintetiza, IL-6 puede enviar señales de alerta a todo el organismo indicando la presencia de una situación de emergencia<sup>327</sup>.

Este hecho podría explicar en parte su estricta regulación en la síntesis. La expresión génica es regulada por varios FT que incluyen a NF- $\kappa$ B, proteína de especificidad 1 (SP1), factor nuclear IL-6 (NF-IL-6) y AP-1<sup>328–330</sup>. Asimismo, IL-6 es regulada negativamente por los GCs<sup>331</sup>.

Una de las actividades biológicas más conocidas de IL-6 es su destacado papel en la iniciación de la respuesta de fase aguda hepática y la inducción de proteínas de fase aguda, como la proteína C-reactiva (PCR), el fibrinógeno y la amiloide sérica A<sup>332</sup>. Los niveles elevados de estas proteínas son el sello distintivo de la inflamación ya que desempeñan un papel crítico en la defensa contra patógenos bacterianos. Así mismo, durante una infección, IL-6 junto a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , causan fiebre y leucocitosis, lo cual es beneficioso para la eliminación de patógenos<sup>333,334</sup>. La señalización de IL-6 es imprescindible para promover la proliferación y prevenir la apoptosis de LT<sup>335,336</sup>, así como también para regular la diferenciación y las funciones efectoras de las células CD4<sup>+</sup><sup>337</sup>.

#### **1.4.9.2 INTERLEUCINA 1 BETA**

IL- $\beta$  desempeña un papel fundamental como regulador maestro de la primera línea de defensa contra los patógenos<sup>338</sup>. Ejecuta una amplia gama de funciones biológicas, al actuar como un pirógeno leucocitario, mediador de la fiebre e inductor de los componentes de la respuesta de fase aguda<sup>339–341</sup>. También IL-1 $\beta$  ejerce

funciones neuroendocrinas, al inducir hormonas como ACTH, CRH y cortisol en respuesta al estrés<sup>342</sup>.

IL-1 $\beta$  es un factor circulante cuya expresión no es constitutiva, sino que está estrictamente regulada. Una de las principales fuentes de IL-1 $\beta$  son las células de origen mieloide, que expresan la citocina como una proteína precursora citoplasmática (pro-IL-1 $\beta$ )<sup>341</sup>. Para obtener la forma activa de IL-1 $\beta$ , la pro-IL-1 $\beta$  debe ser escindida proteolíticamente a nivel del inflamasoma<sup>343–345</sup>. La activación del inflamasoma es gatillada por señales generadas por diversos PAMPs y DAMPs, que inician el procesamiento y la liberación de IL-1 $\beta$ <sup>346</sup>. La exposición a productos bacterianos, así como también las condiciones de hipoxia, inducen la expresión de IL-1 $\beta$ <sup>347,348</sup>. A su vez, el promotor del gen de IL-1 $\beta$  contiene nGRE que actúan en respuesta a los GCs<sup>349</sup>.

#### **1.4.9.3 INTERFERON GAMMA**

IFN- $\gamma$  pertenece a la familia de interferones de tipo II. IFN- $\gamma$  es secretado predominantemente por linfocitos activados como los LT Th1, LT CD8<sup>+</sup> y células NK y, en menor medida, por células NKT, LB y células CPA<sup>350–352</sup>. La producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK y los macrófagos podría desempeñar un papel importante en la defensa temprana contra las infecciones, mientras que, en las respuestas inmunitarias adaptativas, IFN- $\gamma$  es principalmente producido por los linfocitos y secretado por LT Th1.

Su expresión es inducida por mitógenos y citocinas, como IL-12<sup>353,354</sup>, IL-15<sup>355</sup>, IL-18<sup>356,357</sup> e IFN tipo I<sup>358,359</sup>. En respuesta al Ag de Mtb se reclutan los FTs (CREB, ATF-2 y c-Jun) al promotor proximal de IFN- $\gamma$  y se activa la transcripción de esta citoquina esencial en la defensa contra este patógeno. Por otro lado, la inhibición de

la actividad del promotor de IFN- $\gamma$  está dada por la interacción entre el RG y el complejo de unión a ADN AP-1·CREB-ATF<sup>360</sup>.

La expresión del gen IFN- $\gamma$  está controlada en varios niveles, incluyendo cambios epigenéticos, acceso cromosómico, unión de FT a promotores y potenciadores, estabilidad del ARNm, entre otros. Dada la importancia del IFN- $\gamma$  en la función inmune del hospedador, no es sorprendente que este gen único esté tan fuertemente regulado<sup>361</sup>.

## **1.5 DESREGULACION INMUNO ENDOCRINA EN LA TUBERCULOSIS**

Cuando surge un estímulo aversivo o estresor, el eje HPA funciona como un regulador central que responde interconectando la acción de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. En el caso particular de la infección con Mtb, las células fagocíticas son capaces de hacer frente a esta amenaza mediante la fagocitosis de patógenos y la secreción de citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$ , IL-10, e IL-6<sup>147</sup>. Las citocinas liberadas estimulan el eje HPA y se induce la producción de esteroides adrenales como el cortisol y la DHEA. Ambas hormonas pueden afectar el desarrollo de la respuesta inmune. Así, los GCs facilitan la actividad Th2 en parte a través de una inhibición de las células Th1, mientras que la DHEA, su antagonista natural contrarresta los efectos de los GCs favoreciendo respuestas la inmunidad celular<sup>362</sup>. Mediciones de aquellos mediadores que participan de la unidad inmuno-endocrina, puso en evidencia que los pacientes con TB presentaban en circulación niveles reducidos de DHEA, mientras que las concentraciones de IL-6, IL-1 $\beta$  y cortisol se hallaban aumentadas<sup>363</sup>. Estos hechos podrían indicar que los GCs actuarían en detrimento de la respuesta contra Mtb al contrarrestar la acción de las células Th1, en

tanto que la disminución de los niveles de DHEA favorecerían el accionar de los GCs, no pudiendo contrarrestar los efectos inmunosupresores de esta hormona dificultando el control de la infección.

Ante este escenario en donde el patógeno persiste, la activación del sistema inmunológico se sostiene en el tiempo, con un consecuente estado inflamatorio crónico, que suele estar acompañado por daño tisular<sup>364</sup>. Asimismo, en las enfermedades de naturaleza crónica que presentan una continua y/o excesiva activación del eje HPA se puede alterar tanto la composición de la microbiota como la barrera epitelial del tracto gastrointestinal<sup>365</sup>. Al alterarse la permeabilidad intestinal se favorece la translocación de las bacterias que residen en el tracto gastrointestinal a la circulación. Como resultado, puede detectarse a nivel sistémico componentes de la membrana de las bacterias Gram-negativas como el Lipopolisacárido (LPS)<sup>366</sup>. El LPS se caracteriza por poseer potentes efectos de activación inmunitaria. En células del sistema inmune a través del reconocimiento por parte de TLR-4 induce la producción de citocinas y mediadores proinflamatorios<sup>367,368</sup>, los cuales podrían sumar un efecto adicional a la activación del eje HPA y consecuentemente perpetuar el proceso inflamatorio en una suerte de círculo vicioso.

La persistencia del patógeno junto con la respuesta inmunoinflamatoria prolongada no solo interfiere en la activación del eje HPA y la producción de hormonas, sino que también influye en el accionar de las mismas. Como se expresó anteriormente, la función biológica del cortisol depende de su interacción con el RG formado por el dímero  $RG\alpha$ , mientras que el heterodímero  $RG\alpha$ - $RG\beta$  actuaría como dominante negativo. Al analizar el accionar de los GCs en pacientes con TB, pudimos demostrar que las CMP provenientes de pacientes mostraban una relación de los transcriptos  $RG\alpha$ / $RG\beta$  disminuida, mientras que la expresión de  $11\beta$ -HSD1 se

encontraba incrementada respecto de los voluntarios sanos<sup>369</sup>. Tales datos sugieren que los pacientes con TB pulmonar severa manifiestan cierto grado de resistencia a la acción de los GCs endógenos, ya que, a pesar de poseer niveles plasmáticos elevados de citocinas pro-inflamatorias, de cortisol y del transcripto de  $11\beta$ -HSD1, la relación de los transcriptos  $RG\alpha/RG\beta$  sería desfavorable para que el esteroide ejerza sus funciones inmunomoduladoras características. En otro trabajo nuestro grupo ha estudiado el nivel de expresión de ambas isoformas del receptor y de la enzima  $11\beta$ -HSD1 en CMP de pacientes con TB sometidos a tratamiento específico antibacilar. Al momento del diagnóstico se observó un perfil de expresión de los transcriptos similar al descrito, con aumento de  $RG\beta$  y  $11\beta$ -HSD1 y disminución de la relación  $RG\alpha/RG\beta$  respecto del grupo de controles sanos. Sin embargo, con el tratamiento todos los transcriptos alcanzaron valores similares al grupo control, al igual que los de mediadores proinflamatorios y DHEA, mientras que los de cortisol se mantuvieron elevados hasta la alta clínica. Esto sugiere un defecto en la acción anti-inflamatoria de los GCs, que desaparece con el tratamiento específico y la mejoría clínica del paciente<sup>370</sup>; lo que indicaría que tal “defecto” sería adquirido en el transcurso de la infección y no una alteración congénita.

# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS

La TB es una enfermedad infecciosa con un marcado componente inflamatorio. Cuando la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para eliminar al patógeno, la persistencia del mismo conduce a la producción excesiva y prolongada de citocinas proinflamatorias, propio de la cronicidad. Así, durante la enfermedad tuberculosa, principalmente en las formas progresivas de la misma, la respuesta inmune se ve desregulada, traduciéndose en una importante producción de citocinas proinflamatorias conducente a la estimulación del sistema neuroendocrino. Este, en el intento de ejercer una acción homeostática, establece un ambiente inmunosupresor, el cual podría por un lado estar evitando un mayor daño tisular por parte de la RI, aunque por otro lado desfavorecería tanto el armado de la inmunidad protectora (y eliminación del patógeno), así como el adecuado control del proceso e inflamatorio

El componente inmunosupresor propio de la regulación inmunoendócrina en TB está asociado al aumento de los niveles de cortisol; sin embargo, coexiste con una producción sostenida de citocinas proinflamatorias, sugiriendo que la hormona no estaría cumpliendo su función establecida. Este escenario plantea la inquietud respecto a algún posible mecanismo de resistencia a los GCs que involucre la participación de RG. Aún más, esta supuesta resistencia al cortisol endógeno podría argumentar la fallida regulación de retroalimentación normal en el sistema inmunitario en los casos más severos de esta enfermedad infecciosa crónica.

A su vez, considerando que la TBPL es la manifestación extrapulmonar más frecuente de la TB, y que ofrece la posibilidad de analizar y comparar el

compartimento periférico y el compartimento pleural y teniendo en cuenta que la TBPL, a diferencia de la TBP, comúnmente se resuelve sola, sin requerir tratamiento específico, conocer los mecanismos subyacentes propios de la regulación inmunoendócrina en esta forma de la patología aporta información relevante al momento de analizar las dificultades que enfrenta el sistema inmunológico ante una infección con Mtb.

## **2.2 Objetivos generales**

En base a lo expuesto, en esta tesis se propone profundizar el conocimiento de los procesos fisiopatológicos que hacen al accionar de los GCs como hormonas inmunomoduladoras y antiinflamatorias en una patología infecciosa crónica como la TB en sus diferentes manifestaciones. El estudio de la interacción entre los GCs y la respuesta inmuno-inflamatoria es doblemente relevante, no sólo por la necesidad de ahondar en el entendimiento de los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad en diferentes manifestaciones clínicas y que hacen a este desbalance inmuno-endócrino, sino también porque tales procesos tienen que ver con el curso más mórbido de la patología. En este sentido, nos propusimos los siguientes objetivos específicos.

## **2.3 Objetivos específicos:**

### **2.3.1 Objetivo 1**

Evaluar en qué medida las variaciones en los niveles circulantes de mediadores que participan en la interrelación inmuno-endócrina (citocinas: IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10 y hormonas: cortisol y DHEA) y los marcadores inflamatorios (proteína C reactiva y velocidad de eritrosedimentación) se relacionan con la expresión de los transcritos de las isoformas del RG en pacientes con TBP y controles sanos.

Además, y como ya fuera planteado, dado que la TB es una enfermedad inflamatoria crónica en la cual la producción exacerbada de citocinas proinflamatorias puede causar el incrementar la permeabilidad intestinal, aumentando la circulación de componentes bacterianos y, consecuentemente favoreciendo el proceso inflamatorio, es de interés establecer si en esta patología se presentan elevados niveles circulantes de LPS, y si ello guarda relación con los perfiles de mediadores mencionados anteriormente. Este análisis se realizará, además, considerando el grado de compromiso pulmonar a fin de establecer si los pacientes con enfermedad leve, moderada o severa difieren en las relaciones anteriormente descritas.

### **2.3.2 Objetivo 2**

Estudiar, en los mismos grupos de pacientes, parámetros funcionales que puedan estimar el desarrollo de resistencia a los GCs endógenos, mediante dos estrategias en parte complementarias.

2.1 Analizar la expresión de genes regulados positiva (ANXA1, FKBP51, GILZ y los inhibidores de NF-KB isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ) y negativamente (IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ) por el RG e implicados en la RI, de acuerdo al grado de compromiso pulmonar.

2.2 Evaluar la resistencia a cortisol endógeno a través de la optimización de un ensayo funcional que determine la respuesta de leucocitos y de CMP al estimular las células con LPS e inhibir la producción de IL-6 con cortisol o dexametasona. Para cotejar con el nivel de respuesta específica, también se efectuará un ensayo similar en paralelo, estimulando las células con *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por radiación gamma (*Mtbi*).

### **2.3.3 Objetivo 3**

Dado que la TBPL constituye un modelo natural para comprender la RI protectora en el sitio de la infección y la respuesta endócrina que se desarrolla en paralelo nos proponemos:

Estudiar el mismo perfil de expresión génica planteado en el objetivo 2.1 en CM de pacientes con TBPL provenientes tanto de fluido pleural (CMFP) como de sangre periférica (CMP) y analizar las potenciales correlaciones entre mediadores inmunoendócrinos y transcritos.

# **MATERIALES & MÉTODOS**

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Grupos de estudio**

##### **3.1.1 Pacientes con Tuberculosis pulmonar**

Para llevar a cabo este estudio se reclutaron pacientes con TB pulmonar (18-65 años), de los cuales se obtuvo una muestra de sangre luego de haber leído y firmado el consentimiento informado. El diagnóstico de la patología fue realizado sobre la base de criterios clínicos y radiológicos sumados a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo u otro/s fluido/s biológico/s. La muestra de sangre fue tomada antes del inicio del tratamiento anti-bacilar.

Teniendo en cuenta el grado de compromiso pulmonar se clasificaron los pacientes con TB, en leves, moderados y severos según la extensión y el tipo de lesión pulmonar observadas en la placa radiológica. En base a ello, los pacientes que presentaron compromiso pulmonar en un único lóbulo y sin cavidades visibles se clasificaron como pacientes con TB leve. En cuanto al grupo de pacientes con TB moderada, se consideraron todos aquellos individuos que presentaron compromiso unilateral de dos o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, no debían exceder un diámetro de 4 cm. Finalmente, se determinó como pacientes con TB severa a aquellos individuos con enfermedad bilateral con afectación masiva y múltiples cavidades<sup>371</sup>.

##### **3.1.2 Pacientes con Tuberculosis pleural**

Los pacientes con TBPL se seleccionaron en base a criterios clínicos en donde por cuestiones diagnósticas y terapéuticas se obtuvo una muestra de exudado pleural a través del procedimiento de toracocentesis y una muestra de sangre periférica. El

diagnóstico se efectuó mediante la identificación del bacilo sea por microscopía directa del pellet del exudado (Ziehl–Nielsen) en el cultivo, o por medio del reconocimiento histopatológico de granulomas tuberculosos en la biopsia pleural.

Es importante destacar que la TBPL, como foco infeccioso único, es una patología de baja frecuencia de presentación. Ante la sospecha de la misma, la confirmación del diagnóstico es muy difícil de realizar debido a que: la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en el examen directo generalmente es negativo, el cultivo demanda más de 30 días y no siempre es positivo; el diagnóstico por medio de anatomía patológica requiere que la muestra de tejido recuperada permita la identificación del granuloma tuberculoso. Por su parte, los tratamientos empíricos suelen ser efectivos para el paciente con sospecha de TBPL, sin embargo, solo se incorporaron al grupo TBPL aquellas muestras con diagnóstico certero.

Todos los pacientes con TB incluidos en este estudio fueron incorporados por médicos especialistas de los Servicios de Clínica Médica y Neumología del Hospital Provincial del Centenario.

### **3.1.3 Controles sanos**

El grupo de controles sanos fue conformado por una población de individuos similares en sexo y edad respecto de los pacientes con TB que concurrieron al servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario, así como voluntarios sanos provenientes de diversas instituciones y que no registraban contacto con pacientes con TB a fin de machear en sexo y edad con los pacientes con TB.

En este estudio se excluyeron aquellos individuos con compromiso directo de la glándula suprarrenal por el bacilo, personas con serología HIV positiva, mujeres embarazadas o amamantando y aquellas personas medicadas con corticoides o

drogas inmunosupresoras o inmunomoduladores. Todos los participantes no presentaban enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos.

### **3.2 Recolección de muestras de sangre y parámetros clínicos.**

Todas las extracciones de las muestras de sangre venosa se realizaron entre las 7:30 y las 9:00 hs siguiendo el mismo procedimiento de venopunción. Los sujetos incorporados en este estudio completaron un protocolo de examen estandarizado en el hospital, en donde se utilizó un cuestionario estructurado para recopilar información que incluía características demográficas, antecedentes de enfermedades previas y comportamientos relacionados con la salud, como tabaquismo, consumo de alcohol y drogas. El peso y la talla se midieron mediante procedimientos estándar, a partir de los cuales se calculó el índice de masa corporal (IMC).

### **3.3 Parámetros bioquímicos**

En el laboratorio bioquímico del Hospital Provincial del Centenario se determinaron por métodos estándares el hemograma completo con recuento de plaquetas usando un analizador hematológico automatizado (Sysmex XN-1000). El nivel de glicemia, Hemoglobina Glicosilada (HbA1c), urea, creatinina, ácido úrico, proteínas totales, albumina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), colinesterasa sérica, colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL, según sus siglas en ingles), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL, según sus siglas en ingles), triglicéridos y velocidad de eritrosedimentación (VES) fueron examinados utilizando un analizador bioquímico automático Roche Cobas 600 (modulo analítico 501).

### 3.4 Obtención de glóbulos blancos totales y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Una vez obtenidas las muestras de sangre entera anticoagulada con EDTA (0.01% V/V Wiener Lab, Rosario), se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos a 8°C. A partir de allí se recolectó el plasma, se le adicionó el inhibidor de proteasa (Aprotinina: 1.6 mg/ml, Abcam) para su mejor preservación, se fraccionó y almacenó a -20°C, hasta su utilización para la cuantificación de mediadores solubles. A una alícuota de las células que se encontraban en la interfaz entre los glóbulos rojos y el plasma se las colocó en un tubo con Buffer de lisis (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 1.5M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM EDTA, pH= 7.4) para eliminar los glóbulos rojos y obtener los glóbulos blancos totales (Buffy Coat, BC). Del resto de las células de la interfaz se aislaron las CMP mediante un gradiente de densidad. Para ello, a la capa leucocitaria se la diluyó en igual volumen con buffer fosfato salino (BFS) con 5% penicilina/estreptomina (BFS+ATB; Gibco, EEUU) y esta suspensión celular se colocó suavemente sobre un gradiente de Ficoll-Paque Plus (densidad 1.077, Amersham Biosciences, NJ, EE.UU.). Luego, se centrifugó a 1800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) y se recuperaron de la interfaz las CMP, las que se lavaron tres veces con BFS+ATB. Utilizando una cámara de Neubauer se contaron las células y se evaluó su viabilidad tiñendo las mismas con una solución de Azul tripán 0.4% (p/v), permitiendo diferenciar células vivas de muertas; sólo se utilizaron las muestras cuya viabilidad sea mayor al 95% (ninguna muestra presentó menor viabilidad). Por último, las CMP se resuspendieron en BFS+ATB, una alícuota de 3.10<sup>6</sup> células se destinaron para evaluar su capacidad proliferativa (ver sección 3.6), 5.10<sup>5</sup> células se utilizaron para evaluar la potencial resistencia a GC (ver sección 3.9) y 8.10<sup>6</sup> células se preservaron en 1 ml de TRIreagent (Genbiotech) a -80°C hasta su utilización y extracción del ARN total (sección 3.8.1).

### 3.4.1 Recolección y procesamiento de muestras de exudado pleural

A primera hora de la mañana (entre las 7:30 y las 9 hs) a los pacientes con TBPL se les extrajo una muestra de sangre venosa, como ya se describió, previa al procedimiento de toracocentesis. De este último, se recolectó una alícuota de 100 ml de la efusión pleural en tubos con EDTA (0.01% Wiener lab), una alícuota de cada una fue derivada al Laboratorio Central del Hospital Centenario donde se realizaron las pruebas de diagnóstico y los análisis bioquímicos correspondientes.

El fluido pleural (FP) anticoagulado se centrifugó a 8° C durante 15 minutos a 2000 rpm y se le adicionó Aprotinina (1.6 mg/ml Abcam), se fraccionó y almacenó a -20 °C hasta su utilización para la cuantificación de mediadores solubles. Luego de la centrifugación el pellet de células obtenidos se resuspendió en PBS+ATB y se procedió de la misma manera en descrita en la sección 3.4 para la obtención de las CMFP. De la muestra de sangre entera, provenientes de los pacientes con TBPL, se obtuvieron las CMP como ya fuera detallado. De ambas muestras de CM, se destinaron dos alícuotas, una a los cultivos *in vitro* para los ensayos de proliferación (sección 3.6) y la otra adicionada con el reactivo TRI-reagent para la posterior extracción del ARN total y cuantificación de la expresión génica.

### 3.5 Ensayo de linfoproliferación

Con el objetivo de analizar la capacidad proliferativa de las CM pertenecientes a los diferentes grupos de estudio (CMP de pacientes con TBP, TBPL y Co; CMFP de pacientes con TBPL), se cultivaron las células por cuadruplicado en placas 96 pocillos de fondo plano. Se sembraron  $2 \cdot 10^5$  células/pocillo en 200µl de volumen final, con o sin adición de 8 µg/ml de la cepa H37Rv *Mtbi* (Universidad de Colorado, USA). Como control positivo de proliferación se utilizó Concanavalina A (ConA; 2.5 µg/ml, Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C, en una atmósfera

humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y se pulsaron con 1µC de 3[H]timidina durante 18h antes de la recolección de células. 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 los cultivos estimulados/cpm promedio de los cultivos sin estimular).

### **3.6 Cuantificación de mediadores solubles**

#### **3.6.1 Cuantificación de citocinas, hormonas y proteína C reactiva en plasma o fluido pleural.**

Los niveles de las citocinas IL-6, IL-10 e IFN-γ fueron cuantificadas mediante un ensayo comercial de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, BD Pharmingen, límite de detección-LD: IL-10: 7.8 pg/ml, IFN-γ 4.7 pg/ml y IL-6 2 pg/ml) según las indicaciones del fabricante. Para la evaluación de los niveles circulantes de las hormonas Cortisol y DHEA se utilizó también la técnica de ELISA (DRG, LD: cortisol 2.5 ng/ml y DHEA: 2.5 ng/ml). Tanto las citocinas como las hormonas fueron cuantificadas usando un sistema espectrofotométrico de microplacas Epoch™ (BioTek, Winooski, VT).

La proteína C reactiva (PCR) plasmática fue medida a través de un ensayo turbidimétrico usando un analizador automático de alta sensibilidad (Wiener Lab, Rosario, Argentina, LD: 2.5 mg/l).

#### **3.6.2 Determinación de lipopolisacárido en plasma**

Los niveles de Lipopolisacárido (LPS) plasmáticos se evaluaron utilizando el ensayo de punto final cromogénico de Lisado de amebocitos de Limulus (Hycult

Biotech, Uden, Países Bajos, límite mínimo de detección de 0,04 UE/ml) de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

### **3.7 Cuantificación de transcriptos**

#### **3.7.1 Aislamiento de ARN**

Las muestras de CM obtenidas en las secciones 3.4 y 3.5, preservadas en TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos), se utilizaron para extraer el ARN total de las CMP y CMFP, de los distintos grupos de estudio, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, a los tubos conteniendo entre  $7$  y  $8 \cdot 10^6$  cél/ml de reactivo se les agregaron  $200 \mu\text{l}$  de cloroformo (Merck), se agitó enérgicamente para que las fases se mezclen y se incubó durante  $5$  min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se centrifugó a  $12000$  rpm durante  $15$  min a  $4^\circ\text{C}$ . La fase acuosa (aproximadamente  $500 \mu\text{l}$ ) se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó  $5 \mu\text{l}$  de carrier y  $500 \mu\text{L}$  de alcohol isopropílico (Merck) para precipitar el ARN total. Los tubos se incubaron durante  $2$ hs a  $-20^\circ\text{C}$  y se centrifugaron a  $12000$  rpm durante  $20$  min a  $4^\circ\text{C}$ . Consecutivamente, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet con  $1$  mL de etanol absoluto (Merck)  $75\%$  v/v en  $\text{H}_2\text{O}$  suplementada con dietilpirocarbonato ( $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC). Luego, se agitó brevemente en un vortex y se centrifugó a  $8000$  rpm durante  $5$  min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante obtenido se descartó y se dejó secar el pellet durante  $5$ - $10$  min, dejando los tubos abiertos. Por último, se disolvió el pellet en  $30 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC realizando pipeteos suaves. Las muestras de ARN se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.7.2 Síntesis de ADN complementario y qPCR.

Una vez aislado el ARN total, se determinó la cantidad y calidad del mismo utilizando un sistema espectrofotométrico Epoch™ con placas de microvolumen Take3 (BioTek, Winooski, VT).

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total mediante la extensión de cebadores oligo-dT con la transcriptasa inversa M-MuLV (Thermo) en un volumen final de 40 µl de agua estéril DEPC.

El análisis de la expresión génica fue llevado a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polimerase Chain Reaction) cuantitativa en tiempo real (qPCR). Las cuantificaciones se realizaron con el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus de 96 pocillos (Applied Biosystems) utilizando 3 µl de la dilución 1/10 del ADNc, 0,4 µM de cada cebador y 3 µl de 5x HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne), volumen final de 15 µl. Las condiciones del perfil térmico fueron las siguientes: 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de PCR de desnaturalización a 95 °C durante 7 segundos, 25 segundos para el anillado a 60 °C y 30 segundos para el alargamiento a 72 °C. Las lecturas de fluorescencia se efectuaron durante 10 segundos a 80 °C finalizada cada etapa de alargamiento. La especificidad de los productos fue confirmada mediante las curvas de disociación obtenidas siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo y la confirmación de la secuencia de las mismas por secuenciación del producto de amplificación al momento de optimizar las condiciones de reacción de cada amplicón. Todas las reacciones se hicieron por duplicado.

Los resultados de la amplificación de los transcritos fueron analizados mediante el método de curva estándar relativa. Este método permite identificar las diferencias en los niveles de expresión de un gen específico refiriéndose a una curva

estándar. Para la construcción de las curvas estándares se utilizaron diluciones seriadas de ADNc sintetizadas a partir de la línea celular Jurkat que expresan las isoformas del RG alfa y beta y de macrófagos derivados de células THP-1 tratados con GCs

Para normalizar la expresión de cada gen en estudio, se utilizó la amplificación del gen peptidilprolil isomerasa A (PPIA) como control endógeno en cada una de las muestras de las células mononucleares. Los datos se expresaron como el número de veces de cambio en los niveles de expresión de un gen específico normalizado por los niveles de expresión relativa del gen de referencia PPIA.

A continuación, se detallan en la tabla 1 las secuencias de los cebadores utilizados para los distintos transcritos cuantificados en esta tesis:

**Tabla 1: Lista de secuencia de cebadores utilizados para la cuantificación de ARNm por qPCR para lograr el objetivo 1 y 2.**

Gen	Secuencia del cebador	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de anillado (°C)
ANXA1 Gene ID:301	F:5'- TCAAGCCATGAAAGGTGTTGGA-3' R: 5'-CCACAAAGAGCCACCAGGATT-3'	183	61
FKBP5 Gene ID:2289	F: 5'-ATCCGGAGAACCAACGGAAAG-3' R: 5'-TCTCCTTCGCCACAGTGAAT-3'	137	61
GILZ Gen ID:1831	F: 5'-CAACCGCAACATCGACCAGA-3' R: 5'-TCCACCTCCTCTCTCACAGC-3'	150	60
NFKBIA Gen ID:4792	F: 5'-TCAATGCTCAGGAGCCCTGTAAT-3' R: 5'-AGCC-CTGGTAGGTA ACTCTGT-3'	126	61
NFKBIB GeneID:4793	F: 5'-CGAGGGCGAGGACGAGAAAT-3' R: 5'-GGGGTCGTCAGGAAGAGGTT-3'	157	61
NFKB1 GeneID:4790	F: 5'-ACTCTGGCGCAGAAATTAGGTC-3' R: 5'-GCTTCGGTGTAGCCCATTTGT-3'	152	62
PPIA Gen ID:5478	F:5'-GCATACGGGTCCTGGCATCTTG-3' R: 5'-TGCCATCCAACCACTCAGTCTTG-3'	101	60
RG $\alpha$ GeneID:2908	F: 5'-GAAGGAAACTCCAGCCAGAAC-3' R: 5'-GATGATTTTCAGCTAACATCTCG-3'	159	60
RG $\beta$ GeneID:2908	F: 5'-GAAGGAAACTCCAGCCAGAAC-3' R: 5'-TGAGCGCCAAGATTGTTGG -3'	144	60

IFN- $\gamma$ Gene ID:3458	F:5'AACGAGATGACTTCGAAAAGCTG-3' R: 5'-TCTTCGACCTCGAAACAGCA-3'	158	60
IL-6 Gene ID: 3586	F: 5'-TACGGCGCTGTCATCGAT-3' R: 5'-TAGAGTCGCCACCCTGATGT -3'	191	60
IL-1 $\beta$ Gene ID: 3553	F: 5'-TCTGTACCTGTCCTGCGTGTTG-3' R: 5'-GGGGAAGTGGGCAGACTCAA -3'	157	60

F: oligo sentido; R: oligo inverso; ANXA1: Anexina A1; FBKP5: FKBP proil isomerasa 5; GILZ: cremallera de leucina inducida por glucocorticoides; NFKBIA: inhibidor de NF- $\kappa$ B alfa; NFKBIB: inhibidor de NF- $\kappa$ B beta; NFkB1: subunidad p105 de NF- $\kappa$ B; PPIA: peptidil proil isomerasa A; RG receptor de glucocorticoides; IFN- $\gamma$ : interferón-gamma; IL-10: interleucina-10; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta.

### 3.8 Condiciones finales del protocolo optimizado del Ensayo *in vitro* para la determinación de la sensibilidad a Glucocorticoides en pacientes con Tuberculosis pulmonar y controles sanos.

La descripción de los pasos seguidos en la optimización y determinación de las condiciones finales del ensayo *in vitro* para determinar la sensibilidad a los GCs tanto de leucocitos totales como de CMP provenientes de pacientes con TBP y Co se encuentra detallada en el **ANEXO 1**. En esta sección se describen las condiciones finales del mismo.

Ensayo con leucocitos totales: una vez purificados los leucocitos totales a partir del Buffy coat, como se describió en el ítem 3.4, se incubaron a una concentración de  $5 \cdot 10^5$  células/pocillos en MCC (600  $\mu$ l de volumen final), se estimularon con LPS (30 ng/ml) o *Mtbi* (10  $\mu$ g/ml) y se adicionaron con diferentes concentraciones de cortisol ( $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  M) o DEX ( $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  M).

Ensayo con CMP: se realizó un protocolo similar con las CMP purificadas a partir del gradiente de Ficoll, como se describió en el ítem 3.4, se resuspendieron en MCC y se sembraron  $5 \cdot 10^5$  CMP en placas de 24 pocillos. Las células se estimularon

sólo con *Mtbi* (10 µg/ml) y se las inhibió con los rangos de dosis para cortisol y DEX descritos en el párrafo anterior, el volumen final de los cultivos fue de 600µl.

Todos los cultivos fueron incubados por 24hs a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Finalizado el tiempo de incubación, se recolectaron los sobrenadantes y se preservaron a -20°C hasta la cuantificación de los niveles de IL-6.

### 3.9 Análisis estadístico

Las comparaciones se efectuaron por medio de procedimientos estadísticos para grupos independientes tanto en las variables cuantitativas (por ejemplo, prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones posthoc) o cualitativas (chi cuadrado, probabilidad exacta). Previamente se indagó acerca de la distribución normal de las variables (y su eventual transformación en caso de no ser así) para poder aplicar técnicas paramétricas de ajuste y obtener una adecuada estimación de las interrelaciones. Las comparaciones entre muestras individuales fueron realizadas utilizando el test de Mann-Whitney y las comparaciones entre varios grupos se realizaron usando análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el posthoc test de Dunnett. Para determinar la sensibilidad a GCs se utilizó ANOVA a dos factores con medidas repetidas. Mediante la prueba de correlación de rango de Spearman se analizaron las asociaciones entre las variables estudiadas.

$P \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los asteriscos indican los niveles de significancia: \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 9.0 software.

# **CAPÍTULO I**

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados y la discusión presentados en este primer capítulo se corresponden con los obtenidos en el cumplimiento del primer objetivo específico.

### **4.1 CAPITULO I**

#### **4.1.1 Características generales de los grupos de estudios correspondientes a los objetivos 1 y 2**

En este estudio fueron reclutados cuarenta y siete Co y cuarenta y siete pacientes con TBP. Del total de los pacientes con TBP la mitad de los participantes resultó, según los criterios de clasificación establecidos, tener una afección pulmonar moderada (51%, n= 24), un 36% de pacientes severos (n=17) y una menor proporción de pacientes con TBP leves (16%, n=6). Las características generales de ambos grupos se encuentran en la Tabla 2.

Como ya fue expresado, en este estudio se incluyeron individuos con un rango de edad que variaba desde los 18 a 65 años. Con respecto a los pacientes, la mediana en edad fue de 32 años, que se correspondió con el grupo etario de adultos jóvenes. En cuanto a los sujetos sanos la mediana fue de 31.5 años, sin presentarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Respecto al sexo y el número de individuos vacunados con BCG, tampoco hubo diferencias entre grupos. Por otra parte, y como era de esperar al ser la TB una enfermedad consuntiva, sí se observó un marcado descenso en el Índice de Masa Corporal en el grupo de pacientes respecto a Co, más aún en los grupos severos.

En el análisis de la presencia de distintos factores de riesgo como tabaquismo y consumo de alcohol entre los dos grupos, se encontró que el número de fumadores fue más prevalente en los pacientes con TB ( $p < 0.01$ ), lo cual incrementaba conforme

con la severidad. Con respecto al consumo de alcohol, el 19.5 % de los controles y el 31.6 de los pacientes refirió hacerlo, y este porcentaje aumentaba con la severidad hasta un valor de 38.5 % en los severos, aunque no se hallaron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio, ni considerando el grado de severidad de la TBP (Tabla 2).

Tabla 2: características generales de los grupos de estudio

Variables	Co (n=47)	TB (n=47)	Leve (n=6)	Moderado (n=23)	Severo (n=17)	Valor de p
Edad (años) <sup>a</sup>	31.5 [23-46]	32 [22-45]	36 [26-59]	32 [22-58]	34 [24-44]	ns
Sexo (F/M) <sup>b</sup>	13/34	13/34	3/3	6/17	4/13	ns
BCG (Si/No) <sup>b</sup>	47/0	40/7	5/1	20/3	14/3	<0.02
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	27 [24.8-29.4]	20 [18.5-21]*	20 [19-22]*	21 [19-24]*	20 [18-20]*	<0.0001
Hábito de fumar (Si/No)	7/29	19/19 <sup>#</sup>	2/4	8/11	9/4 <sup>#</sup>	<0.01
Consumo de alcohol (Si/No)	7/29	12/26	3/3	4/15	5/8	ns

<sup>a</sup>Los datos están representando como la media y el rango intercuartil. Las comparaciones fueron realizadas usando el test de Mann-Whitney.

<sup>b</sup>Los datos se presentan como frecuencia y las comparaciones se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

\* diferente de Co, p<0.0001; # diferente de Co (Test exacto de Fisher) p<0.01

Abreviaciones: Co: Controles sanos; TBP: pacientes con tuberculosis pulmonar; F: femenino; M: masculino; BCG: Bacillus Calmette-Guerin; IMC: índice de masa corporal; ns: no significativo.

#### **4.1.2 Análisis de los parámetros bioquímicos**

Al analizar el reporte del hemograma completo de los pacientes con TBP se encontró un aumento significativo de glóbulos blancos totales, neutrófilos, monocitos y plaquetas junto con valores reducidos de hemoglobina y linfocitos respecto del grupo Co (Tabla 3). Los mismos resultados se observaron en las comparaciones según el grado de afectación pulmonar. Únicamente, en el grupo de pacientes severos se encontró un menor número de eritrocitos respecto del grupo Co.

**Tabla 3. Parámetros hematológicos de los pacientes con Tuberculosis pulmonar (TBP) y Controles sanos (Co).**

<b>Parámetros [Valores de referencia]</b>	<b>Co (n=39)</b>	<b>TBP (n=38)</b>	<b>Leve (n=6)</b>	<b>Moderado (n=19)</b>	<b>Severo (n=13)</b>
Glóbulos blancos ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [4-9]	6.1 (5.3- 7.2)	8.7 (7.5-11.1)*	8.7 (6.2-13.7)	8.5 (7.5 -9.5)*	11.0 (7.8- 12.0)*
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [2-6]	3.2 (2.7- 4.0)	5.8 (4.4- 7.8)*	5.1 (3.9 -9.8)*	5.4 (4.1- 6.2)*	7.6 (6.1- 8.6)*
Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [1- 3]	2.0 (1.7- 2.5)	1.6 (1.2- 2.2)*	1.7 (1.2 -2.5)	1.6 (1.3- 2.2)*	1.4 (0.9 -1.6)*
Monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [0- 1]	0.5 (0.4- 0.6)	0.8 (0.6 -1.0)*	0.8 (0.5 -1.7)	0.7 (0.5 - 0.9)*	1.0 (0.6 -1.4)*
Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [0- 0.4]	0.13 (0.09-0.19)	0.16 (0.10 -0.21)	0.15 (0.12 -0.18)	0.15 (0.10 -0.20)	0.16 (0.05- 0.23)
Basófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [0- 0.09]	0.03 (0.02-0.05)	0.03 (0.02 -0.05)	0.05 (0.02 -0.06)	0.05 (0.03 -0.05)	0.02 (0.01 -0.04)
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ ) [150- 400]	229 (198-278)	431 (317 -512)*	415 (253 -641)*	447 (334- 498)*	370 (307 -537)*
Glóbulos rojos (M/ $\mu\text{l}$ ) [3.7-5.5]	4.7 (4.5- 5.1)	4.6 (4.1-5.1)	4.3 (4.0 -5.0)	4.9 (4.3- 5.2)	4.3 (4.0- 4.7)*
Hemoglobina (g/dL) [11-16]	14.2 (13.3-14.8)	12.4 (11.1-13.5)*	13.0 (11.5 -13.3)	12.9 (11.4- 14.1)*	12.0 (10.4-12.5)*

Los datos están expresados como la mediana (rango inter cuartil). Las comparaciones cuantitativas fueron realizadas mediante métodos no paramétricos, como el análisis de Kruskal Wallis seguido de una prueba post-hoc cuando correspondía, para el enfoque de comparación múltiple. \* Representa diferencias estadísticamente significativas de Co ( $p < 0.05$ ).

Abreviaciones: Co: Controles sanos; TBP: pacientes con Tuberculosis pulmonar.

Los pacientes con TBP no mostraron diferencias significativas con relación a los niveles séricos de glucosa, ácido úrico, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y triglicéridos cuando fueron comparadas con el grupo Co, aunque exhibieron un incremento en la concentración de HbA1c (Tabla 4). Preferentemente los pacientes con TBP moderada presentaron una disminución en la concentración de urea, albúmina y colesterol HDL (Tabla 4). Por lo que se refiere a pacientes con el menor grado de afección pulmonar, se encontró un descenso en la concentración de albúmina y colinesterasa sérica. Mientras que aquellos con enfermedad avanzada, mostraron niveles más bajos de creatinina, albúmina, colinesterasa sérica, colesterol total, colesterol HDL y LDL y valores elevados de fosfatasa alcalina respecto al grupo de Co (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros bioquímicos de los pacientes con Tuberculosis pulmonar (TBP) y Controles sanos (Co)

	Co (n=39)	TBP (n=38)	Leves (n=6)	Moderados (n=19)	Severos (n=13)
Glicemia (mg/dl) [70-100]	89 (82-93)	86 (82-95)	88 (80- 97)	86 (83- 93)	87 (81- 96)
HbA1c (%) [4.8-5.9]	5.2 (4.7-5.6)	5.5 (5.1- 5.8)*	4.9 (4.6- 5.7)	5.7 (5.4- 5.8)*	5.6 (5.1- 6.2)
Urea (mg/dl) [10-50]	30 (26-36)	22 (19-30)*	24 (14- 34)	21 (20- 28)*	23 (18- 32)
Creatinina (mg/dl) [0.5-0.9]	0.8 (0.7-0.9)	0.7 (0.6-0.8)*	0.6 (0.6-0.9)	0.7 (0.6- 0.9)	0.7 (0.6- 0.9)*
Ácido úrico (mg/dl) [2.4-5.7]	4.8 (3.9-5.6)	5.0 (3.8 -8.3)	7.7 (4.0 - 9.2)	6.3 (3.8- 9.3)	4.5 (3.6- 4.9)
Proteínas totales(g/dL) [6.6-8.7]	7.4 (7.1-7.6)	7.9 (7.4-8.3)*	7.8 (7.4- 8.1)	8.0 (7.7- 8.3)*	7.8 (6.9- 8.4)
Albumina (g/dl) [3.4-4.8]	4.5 (4.3-4.7)	3.9 (3.5-4.2)*	3.7 (3.6-4.0)*	4.0 (3.8- 4.3)*	3.3 (3.1- 3.9)*
AST (UI/l) [10-38]	19 (16 -22)	16 (13-24)	17 (13- 33)	15 (13- 22)	18 (15- 26)
ALT (UI/l) [10-41]	18 (12-23)	18 (12-24)	13 (4- 15)	19 (12-26)	23 (14- 26)
FA (U/l) [35-104]	67 (53-76)	92 (83-109)*	87 (77- 103)	85 (80- 99)*	109 (93- 198)*
Colinesterasa sérica (UI/l) [6400-5500]	9157 (7911-10393)	6130 (5361- 7202)*	5748 (5647- 6663)*	6669 (5921- 7452)*	4698 (3379- 6568)*
Colesterol total (mg/dl) [50-200]	179 (152 -193)	144 (121-177)*	181 (107-245)	145 (133- 180)	124 (112- 151)*
Colesterol HDL (mg/dl) [40-100]	51 (45-61)	36 (25-44)*	43 (32-58)	35 (31- 44)*	26 (18- 39)*
Colesterol LDL (mg/dl) [4-100]	107 (91 -123)	88 (72-108)*	110 (66-142)	83 (72- 108)	85 (73- 98)*
Triglicéridos (mg/dl) [50-150]	91 (61-99)	79 (69-102)	80 (70- 124)	86 (69- 97)	72 (66- 103)

Los datos están expresados como la mediana (rango inter cuartil). Las comparaciones cuantitativas se realizaron mediante métodos no paramétricos, como el análisis de Kruskal Wallis seguido de una prueba post hoc cuando correspondía, para el enfoque de comparación múltiple. \* Representa diferencias estadísticamente significativas respecto a Co ( $p < 0.05$ ).

Abreviaciones: Co: controles sanos; TBP: pacientes con Tuberculosis pulmonar; HbA1c: Hemoglobina glicosilada, AST: Aspartato Aminotransferasa, ALT: Alanina Aminotransferasa, FA: fosfatasa alcalina, HDL: lipoproteínas de alta densidad y LDL: lipoproteínas de baja densidad

### **4.1.3 Evaluación de la relación entre los niveles circulantes de parámetros inmuno-endócrinos e inflamatorios con la expresión de las isoformas del receptor de glucocorticoides.**

Dado que los factores circulantes estarían condicionando la funcionalidad y la expresión génica celular, se evaluó la potencial relación de los mediadores inmuno-endócrinos e inflamatorios circulantes con la expresión de los transcritos de las isoformas del RG.

#### **4.1.3.1 Cuantificación de citocinas pro y antiinflamatorias, hormonas y mediadores inflamatorios plasmáticos en pacientes con TBP.**

Al estudiar las citocinas pro y anti inflamatorias en circulación tanto en pacientes con TBP como en Co, se encontró que el primer grupo mostró concentraciones aumentadas de IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10 ( $p < 0.001$  vs Co), particularmente a expensas de los casos moderados y severos ( $p < 0.003$  vs Co) (Tabla 5).

En la misma dirección, los pacientes con TBP presentaron niveles de cortisol relativamente elevados ( $p < 0.05$ ) en particular los moderados ( $p < 0.01$ ), mientras que los niveles de DHEA fueron considerablemente inferiores ( $p < 0.01$ ) en el grupo TBP, a expensas de los casos severos ( $p < 0.0001$  vs Co). Tales alteraciones, resultaron en un aumento de la relación Cortisol/DHEA en pacientes con TBP en comparación con la observada en Co ( $p < 0.0001$ ), la cual se conservó incrementada en todos los grupos de TBP, siendo los severos quienes presentaron la mayor relación ( $p < 0.01$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5: Niveles plasmáticos de citocinas pro y antiinflamatorias, hormonas suprarrenales y relación Cortisol/DHEA en controles (Co) y pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP) con diferente grado de afectación pulmonar (Leve, Moderado y Severo).**

	Co	TBP	Leve	Moderado	Severo
IL-10 [pg/ml]	8 (6-10)	10 (8-15)*	7 (5-11)	10 (8 -14)*	11 (8 -18)*
IL-6 [pg/ml]	9.0 (6.4 -10.6)	31.4 (20.9 -42.4)*	18.2 (6.2 -40.6)	25.7 (22.6-37.4)*	37.4 (21.7 -63.5)*
IFN- $\gamma$ [pg/ml]	7.1 (5.1 -14.0)	14.6 (9.0 -23.8)*	11.9 (5.5 -15.7)	13.7 (8.8 -23.5)*	22.8 (14 -34.6)*
Cortisol [ng/ml]	195 (108 -251)	213 (187 -273)*	193 (174 -218)	238 (208- 304)*	189 (183- 231)
DHEA [ng/ml]	6.3 (3.8 -8.4)	3.3 (2.4 -6.2)*	4.1 (2.6 -6.7)	4.6 (2.7 -6.5)	2.4 (1.4 -4.3)*
Cortisol/DHEA	26 (19 -40)	55 (39 -80)*	58 (40 -81)	52 (36 -77)*	66 (45 -148)*

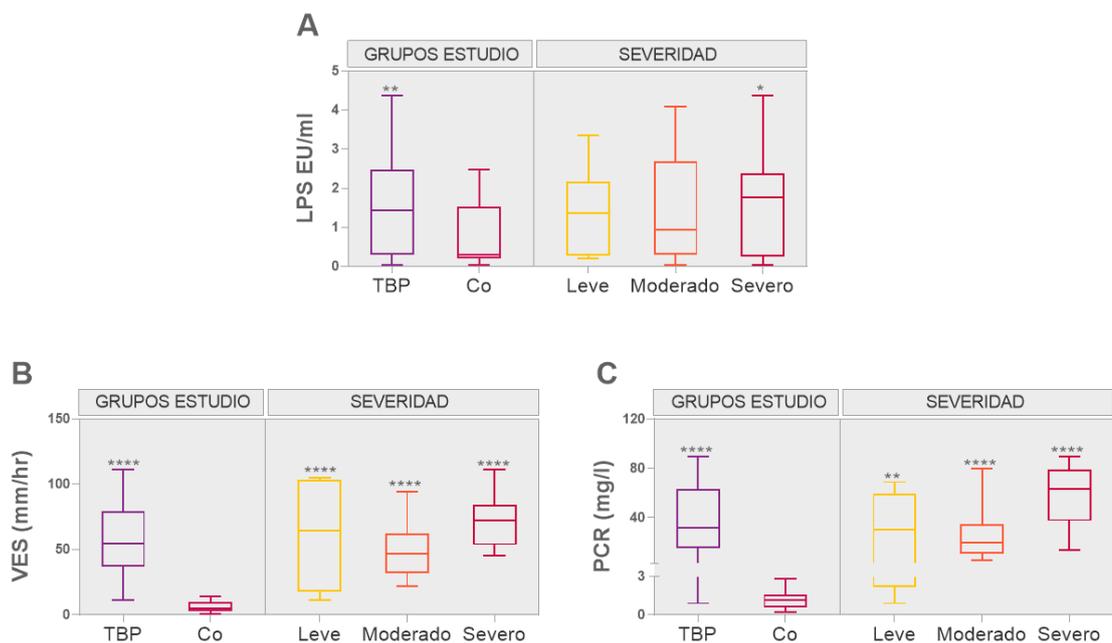
Los datos están expresados como la mediana (rango inter cuartil).

Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Mann-Whitney. \* Representa diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de controles sanos,  $p < 0.05$ .

Abreviaciones: Co: controles sanos; TBP: tuberculosis pulmonar; IL-6: interleucina-6; IFN- $\gamma$ : interferón-gamma; IL-10: interleucina-10; DHEA: dehidroepiandrosterona.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los mediadores inflamatorios junto con los niveles circulantes de LPS se encuentran representados en la figura 5. La comparación de los niveles plasmáticos de LPS reveló que los pacientes con TBP presentan mayores concentraciones que el grupo Co ( $p < 0.05$ ), particularmente en los casos con enfermedad severa (Fig. 5A,  $p < 0.01$ ). Como era esperable, los pacientes con TBP también mostraron niveles elevados de PCR (Fig. 5B,  $p < 0.0001$ ) y VES (Fig. 4C,  $p < 0.0001$ ), si se los confronta con Co. Otras comparaciones indicaron que, a mayor grado de compromiso pulmonar, mayor era la concentración de PCR ( $p < 0.005$ ), y la VES ( $p < 0.0001$ ).

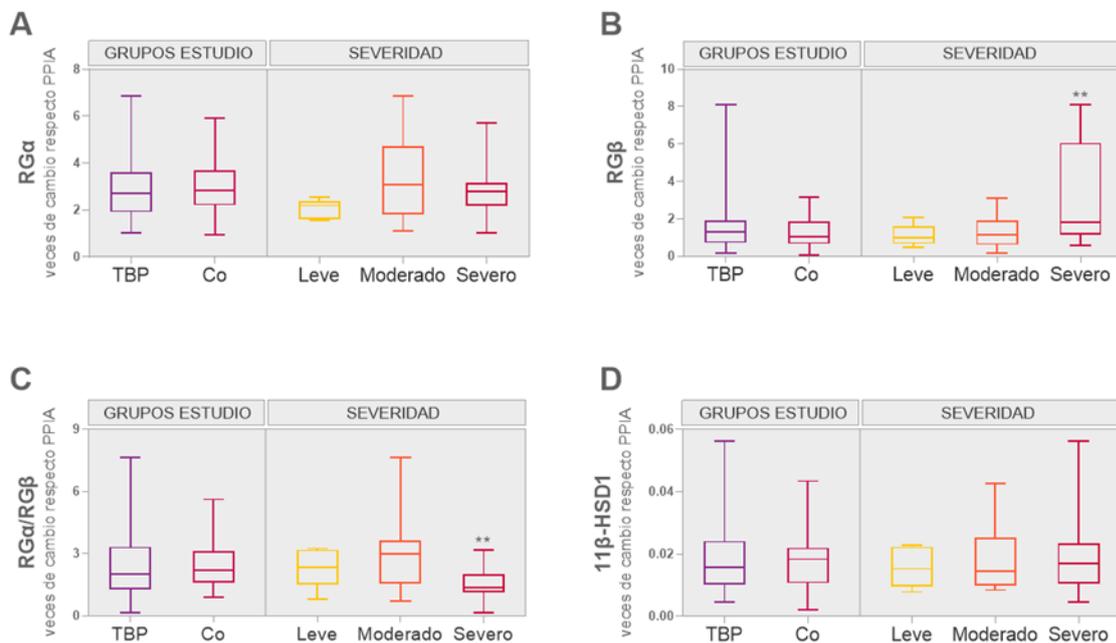
**Figura 5: Niveles plasmáticos de Lipopolisacáridos (A), Proteína C-reactiva (B), velocidad de eritrosedimentación (C) en controles sanos (Co) y pacientes con Tuberculosis pulmonar (TBP).**



Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Kruskal-Wallis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de Co: \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Abreviaciones: Co: controles sanos; TBP: tuberculosis pulmonar; LPS: Lipopolisacárido; PCR: Proteína C-reactiva; VES: velocidad de eritrosedimentación. Te falta aclarar el análisis estadístico.

El análisis de la expresión de las isoformas del RG alfa y beta en CMP no reveló grandes diferencias entre el grupo de pacientes con TBP y Co (Fig. 6A y B, respectivamente). Al contrastar según el grado de severidad de la enfermedad se hallaron niveles elevados del transcripto de la isoforma RG $\beta$  en pacientes con TBP severa (Fig. 6B). Al calcular la relación entre ambas isoformas del RG, la relación RG $\alpha$ /RG $\beta$  disminuyó en el grupo de pacientes con TBP severa en comparación con Co (Fig. 6C).

**Figura 6: Expresión relativa de los transcritos de las isoformas del receptor de glucocorticoides alfa (A), beta (B), la relación RG $\alpha$ /RG $\beta$  (C) y 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (D) en células mononucleares de sangre periférica de controles sanos (Co), y pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP).**



Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcripto de PPIA (peptidil proil isomerasa A). Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Kruskal-Wallis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto el grupo de Co: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Abreviaciones: RG $\alpha$ : receptor de glucocorticoides alfa; RG $\beta$ : receptor de glucocorticoides beta; RG $\alpha$ /RG $\beta$ : relación RG $\alpha$  y RG $\beta$ ; 11 $\beta$ -HSD1: 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1.

#### 4.1.3.2 Análisis de correlación entre los niveles plasmáticos de mediadores del sistema inmuno-endocrino, inflamatorios y transcriptos.

Al realizar el análisis de correlación entre los mediadores inmuno-endocrinos e inflamatorios circulantes con la expresión de los transcriptos de las isoformas del RG se halló una serie de correlaciones que se resumen en la tabla 6. Sólo se muestran aquellas significativas de mayor relevancia. En un análisis inicial se consideró al grupo de pacientes con TBP como un todo y se observó que, entre los marcadores inflamatorios, las concentraciones de LPS plasmáticas se asociaron negativamente con los niveles circulantes de DHEA, mientras que los niveles de PCR se correlacionaron positivamente con la relación cortisol/DHEA. Por otro lado, al considerar el compromiso pulmonar dentro del grupo TBP, se evidenció que en los pacientes con TBP severa existía una correlación positiva entre los elevados niveles plasmáticos de LPS con los de las citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$ .

**Tabla 6: Análisis de correlación de los niveles plasmáticos de hormonas, citocinas y LPS en el grupo general de pacientes con tuberculosis pulmonar y aquellos con enfermedad severa.**

Correlaciones	TBP (n= 38)		TBP severos (n= 17)	
	$r_s$	Valor de p	$r_s$	Valor de p
LPS vs. DHEA	-0.41	0.02	-	ns
PCR vs. Cortisol/DHEA	0.37	0.03	-	ns
LPS vs. IFN- $\gamma$	-	ns	0.80	0.01
LPS vs. IL-6	-	ns	0.59	0.03
IL-6 vs. Cortisol/DHEA	-	ns	0.64	0.03
IL-6 vs RG $\beta$	-	ns	0.62	0.05

El test de rango de Spearman fue utilizado para determinar la correlación entre las variables. Abreviaciones: ns: no significativo; TBP: pacientes con Tuberculosis pulmonar; LPS: Lipopolisacárido; IL-6: interleucina-6; IFN- $\gamma$ : interferón-gamma; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; PCR: proteína C reactiva; DHEA: dehidroepiandrosterona;  $r$ : coeficiente de correlación  $r$  de Spearman.

#### 4.1.4 Discusión capítulo I

La TB puede ser considerada como una enfermedad inflamatoria crónica, donde diferentes factores como la producción excesiva y prolongada de citocinas afectan la comunicación entre las células del sistema inmunológico y endocrino, con las posteriores consecuencias que esto puede implicar en términos regulatorios. Si los cambios relacionados con el sistema inmunoendocrino se desencadenan en secuencia o en paralelo es una cuestión que no se puede evaluar en el campo clínico. Si bien no son ideales, los datos sobre la presencia de mediadores en pacientes clasificados según la gravedad de la enfermedad son complementarios y útiles para aprender a ensamblar piezas, lo que refleja un tipo diferente de interacciones hospedero-patógeno que implican una intersección dinámica de diversas redes de señalización y respuesta. En el marco de esta comunicación bidireccional entre ambos sistemas, una serie de hormonas, como el cortisol y la DHEA, poseen reconocida influencia sobre la respuesta inmune. En línea con estudios previos<sup>363,370,372</sup>, en el presente trabajo de tesis se ha demostrado que pacientes con un grado de severidad avanzada presentan niveles aumentados de citocinas pro y antiinflamatorias conjuntamente con un incremento de cortisol, en presencia de una disminución en niveles plasmáticos de DHEA. Es probable que este entorno afecte la función de las células inmunocompetentes, hecho que se vería reflejado en la disminución de la capacidad proliferativa de las CMP de pacientes con TBP ante la exposición a *Mtbi*, la cual disminuye conforme aumenta el grado de severidad de la enfermedad. Resultados relacionados han sido publicados previamente por nuestro grupo de trabajo, donde se halló una relación inversa entre los niveles plasmáticos de cortisol o de la relación cortisol/DHEA con la producción de citocinas *in vitro* o la capacidad linfoproliferativa frente al estímulo específico con antígenos de *Mtb*<sup>363,373</sup>.

Además, de las citocinas inflamatorias convencionales o específicas de una respuesta celular, en este trabajo estudiamos otros mediadores inflamatorios, y así se evidenció que los pacientes con TBP presentan en circulación elevados niveles de LPS al igual que PCR, IL-6, IFN- $\gamma$  y VES. Un análisis posterior según el grado de severidad de la enfermedad reveló que los pacientes con el mayor grado de compromiso pulmonar poseen las mayores concentraciones plasmáticas de LPS; siendo también los casos moderados y severos los de mayores niveles de PCR, VES, IL-6 e IFN- $\gamma$ . Estos mediadores si bien están implicados en la respuesta antimicrobiana, también están relacionados con la extensión pulmonar de la enfermedad, así como con la carga bacteriana<sup>374,375</sup>.

Los elevados niveles plasmáticos de LPS hallados en los pacientes con TBP podrían sugerir una alteración a nivel de la mucosa, ya que los mismos están relacionados con el grado de permeabilidad intestinal<sup>376,377</sup>. En situaciones de inflamación prolongada, además del desbalance inmunoendócrino, es probable que el incremento de IL-6 (y su producción persistente) provoque daño intestinal, lo que facilitaría la translocación microbiana<sup>378</sup>. Otras citocinas como IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  también pueden alterar la permeabilidad de la mucosa intestinal<sup>379</sup>. En consonancia con este punto de vista, nuestros estudios revelaron una asociación positiva entre los niveles de LPS e IL-6 e IFN- $\gamma$ . Además del contexto inflamatorio, se demostró que los individuos expuestos al tabaco poseen más probabilidades de presentar niveles modestamente elevados de LPS en circulación<sup>380-382</sup>. En este sentido, dado que todo el grupo de pacientes con TBP, y en particular los casos de mayor severidad de la enfermedad presentaron, una mayor frecuencia al hábito de fumar podría ser un factor para considerar. Este último no solo se asocia con una barrera intestinal deteriorada

del intestino delgado<sup>383,384</sup>, sino que también con lesiones pulmonares cavitarias y una respuesta disminuida de IFN- $\gamma$ <sup>384,385</sup>.

Si bien estudios anteriores informaron niveles elevados de LPS en el suero de pacientes con TB pulmonar o extrapulmonar<sup>386,387</sup>, al igual a lo observado en otras enfermedades de naturaleza crónica como la cirrosis<sup>388</sup>, diabetes<sup>389</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>390</sup>, infección crónica y envejecimiento<sup>391</sup>, el hecho de clasificar a los pacientes de acuerdo al grado de compromiso pulmonar o severidad de la enfermedad y su relación con el desequilibrio inmunoendócrino, permite ampliar los hallazgos reportados por otros grupos. Además, pone en evidencia la necesidad de este tipo de análisis, a fin de realizar una mejor caracterización de los grupos de pacientes con TBP<sup>392</sup>. Los niveles elevados de LPS sumarían otro elemento a la serie de factores que impactan sobre la inflamación presente en los pacientes con TBP, especialmente aquellos con la enfermedad progresiva. Son este grupo de pacientes con la patología avanzada los que presentaron los mayores niveles de la relación cortisol/DHEA que se correlacionaron positivamente con los niveles de IL-6. Mientras que la relación negativa entre LPS y DHEA proporciona otra evidencia que vincula la inflamación con la disminución de la presencia de este andrógeno.

En este contexto, podríamos estar frente a una especie de círculo vicioso; donde la traslocación de LPS a circulación a su vez aumenta la producción de mediadores inflamatorios, estimulando aún más la producción de cortisol y por consiguiente una alteración en mucosas, favoreciendo la perpetuación del desbalance homeostático y el daño tisular.

Dado este desbalance inmunoendócrino, los elevados niveles de cortisol plasmáticos desempeñarían un rol central en la regulación del proceso antimicrobacteriano en desarrollo. Como se mencionó anteriormente, las funciones

inmunomoduladoras de los GCs están mediadas principalmente por su receptor funcional  $RG\alpha$ <sup>194</sup>. Si bien se sabe que un aumento de cortisol circulante genera una regulación negativa en la expresión del transcripto<sup>393,394</sup>, tales cambios no fueron observados en este estudio ni en los anteriores. Posiblemente este hecho no ocurra debido a la naturaleza crónica de la TB<sup>395</sup>. El incremento en la expresión de la isoforma  $RG\beta$  y el descenso en la relación  $RG\alpha/RG\beta$  que aparecen en los pacientes con TBP severa podrían implicar cierto grado de resistencia al accionar del cortisol endógeno<sup>396</sup>, ya reportado en trabajos previos<sup>370,395</sup>. A pesar de que las variaciones en los niveles de las isoformas de RG alfa y beta están intrínsecamente relacionadas con los mecanismos de *splicing* alternativo del transcripto primario, las razones o los factores que afectan estos fenómenos no están completamente claros<sup>225</sup>. Es así como, en estudios *in vitro* tales cambios han sido relacionados con diferentes factores circulantes, como hormonas y citocinas<sup>176</sup>. En este trabajo de tesis si bien no se observaron numerosas relaciones entre el perfil inmunoendócrino y la expresión diferencial de los transcriptos de RGs, de acuerdo a la severidad de la patología, la correlación positiva entre los niveles aumentados de IL-6 y la expresión de  $RG\beta$  en pacientes con TBP severa puede estar reflejando una regulación deficiente de la reacción inflamatoria debido a una expresión aumentada de  $RG\beta$ , a fin de mantener cierto estado de actividad antimicrobiana por parte del SI.

Este perfil inmunoendócrino y transcripcional de los RGs en las CMP, que reflejarían cierto grado de resistencia a la acción del cortisol endógeno en las mismas, debiera ser constatado mediante ensayos funcionales. Lo cual se condice con el objetivo 2 del presente trabajo.

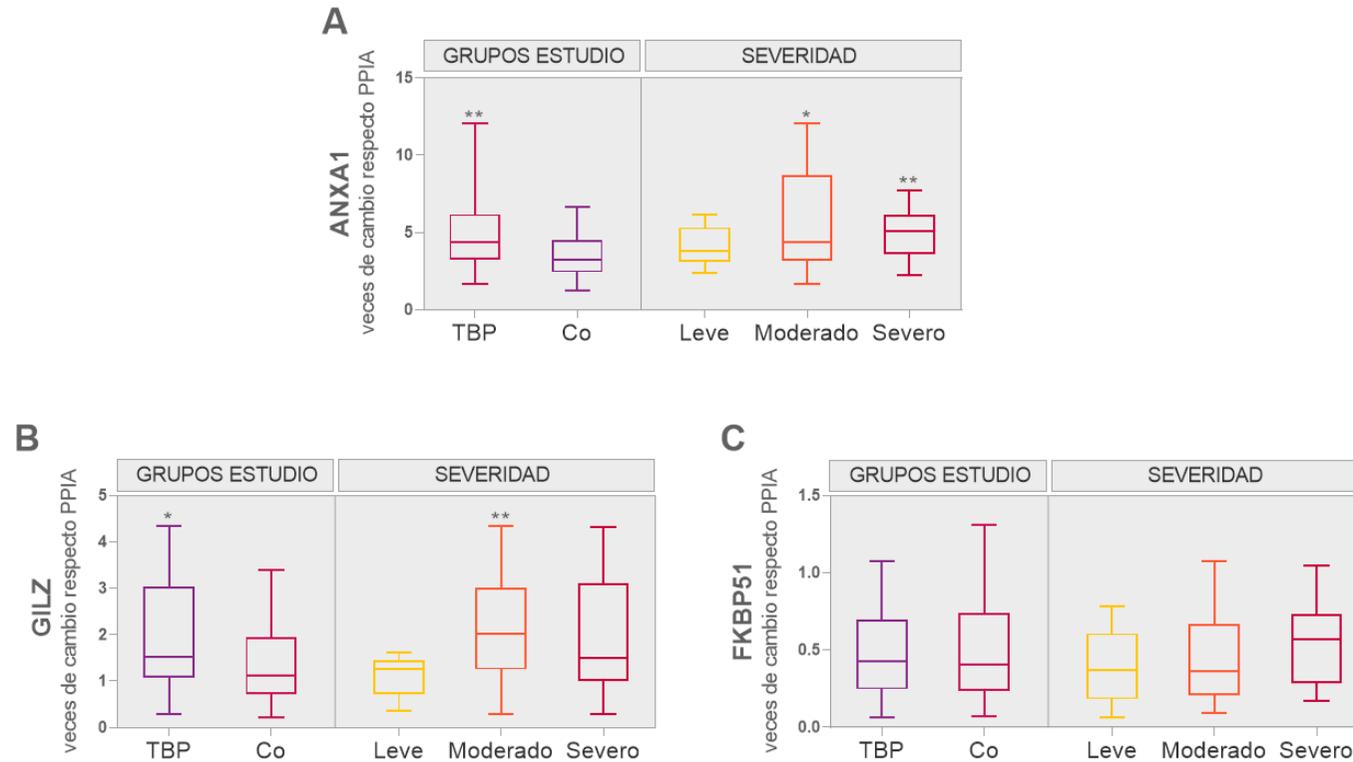
## **CAPÍTULO II**

## 4.2 CAPÍTULO II

### 4.2.1 Evaluación de los niveles de expresión de genes regulados positiva y negativamente por el receptor de glucocorticoides y sus respectivas correlaciones con los mediadores del perfil inmuno-endocrino.

De acuerdo con los propósitos del estudio, exploramos el potencial efecto regulador de los niveles circulantes de GCs, sobre la expresión de genes regulados por el RG tanto positiva (ANXA1, FKBP5, GILZ y los inhibidores de NF-KB isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ) como negativamente (IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ). Como se muestra en la Figura 7 (paneles A y B), las CMP de pacientes con TBP mostraron niveles aumentados del ARNm de ANXA1 y GILZ, en relación a los observados en Co. Un análisis posterior según la severidad de la enfermedad dejó en claro que los pacientes moderados y severos presentaban una mayor expresión de ANXA1, mientras que los transcritos de GILZ aumentaron significativamente sólo en el grupo de pacientes moderados. Con respecto al ARNm de FKBP51 no hubo diferencias entre los distintos grupos de estudio (Fig. 7C).

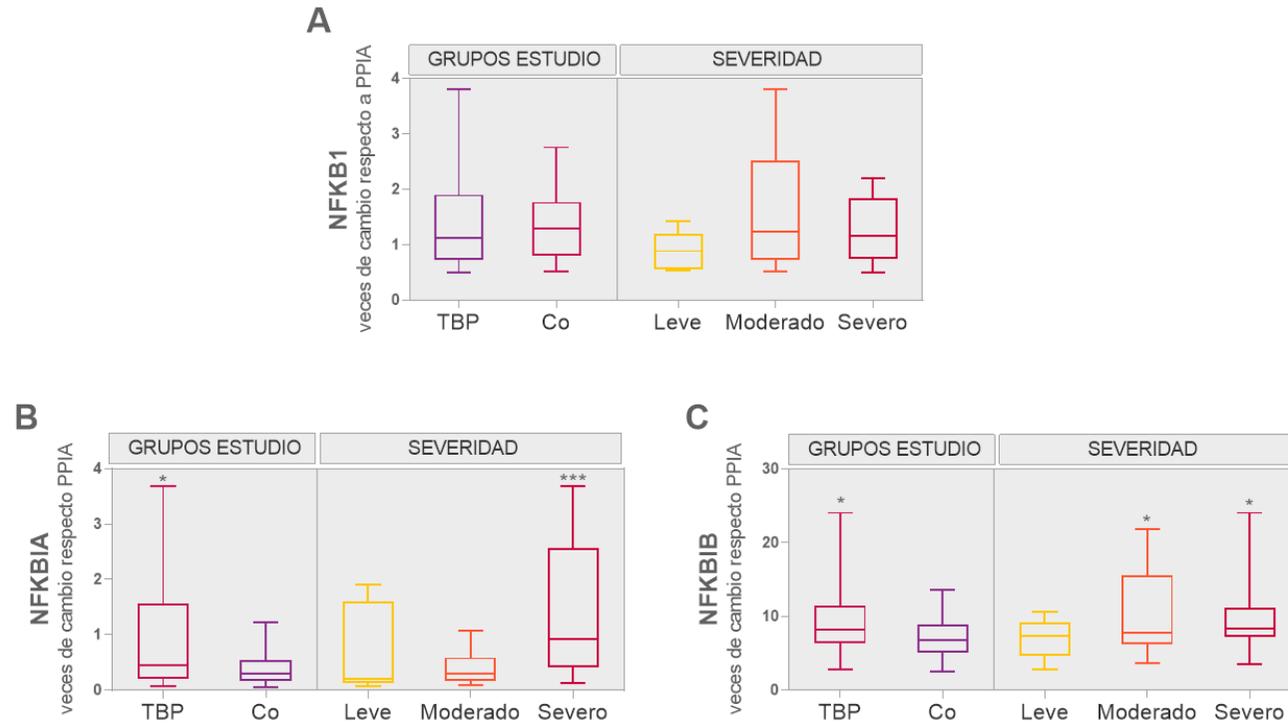
**Figura 7: Niveles de expresión génica de ANXA1 (A), GILZ (B), and FKBP51 (C) en CMP de controles sanos (Co), y pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP).**



Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcrito de PPIA (peptidil prolil isomerasa A); Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Kruskal-Wallis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de Co: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . Abreviaciones: ANXA1: Anexina A1; FKBP51: FKBP prolil isomerasa 51; GILZ: cremallera de leucina inducida por glucocorticoides.

Respecto a los inhibidores de NF- $\kappa$ B, factor transcripcional central en la inflamación, se halló un incremento en los niveles de expresión de ambos genes NFKBIA y NFKBIB en las CMP de pacientes con TBP respecto de Co (Fig. 8B y C, respectivamente). Además, se observó que los pacientes severos presentaron mayor expresión de ambos transcritos, mientras que en los TBP moderados sólo lo hicieron los de NFKBIB. A su vez, a fin de determinar si estas variaciones se veían acompañadas por modificaciones en la transcripción de uno de sus blancos, se cuantificaron los niveles del transcrito que codifica para el gen de NFKB1, sin observarse diferencias entre pacientes y Co (Fig.8A).

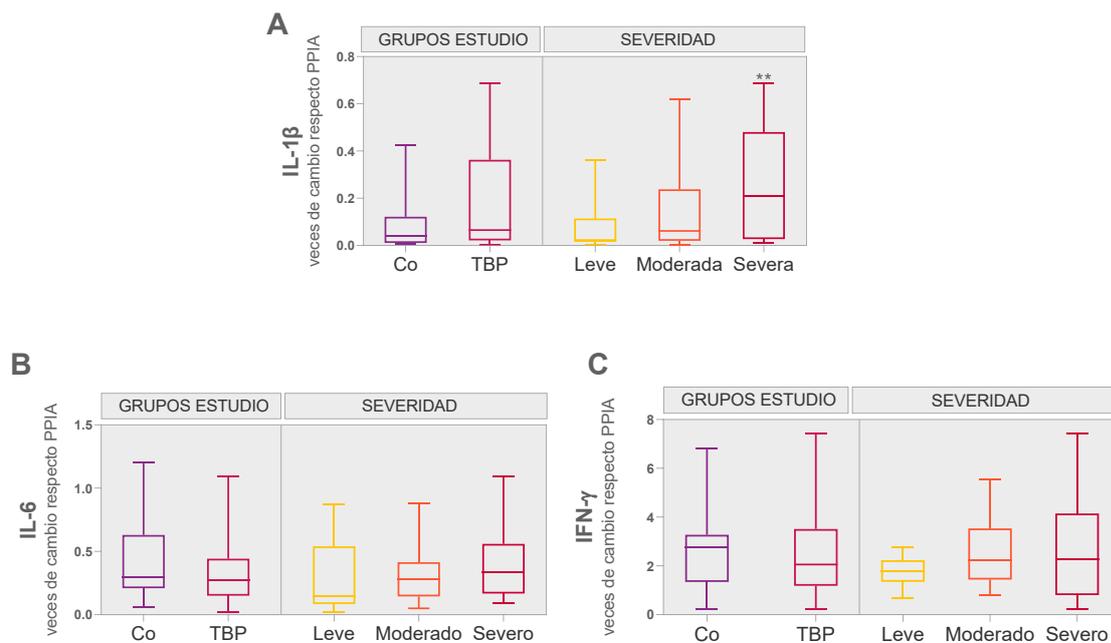
**Figura 8: Niveles de expresión génica de NF-κB (A), NFKBIA (B) y NFKBIB (C) en CMP de controles sanos (Co), y pacientes con TB pulmonar (TBP).**



Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcrito de PPIA (peptidil prolil isomerasa A). Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Kruskal-Wallis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de Co: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Abreviaciones: Co: Controles sanos; TBP: pacientes con Tuberculosis Pulmonar; NFKBIA: inhibidor de NF-κB alfa; NFKBIB: inhibidor de NF-κB beta; NFκB1: subunidad p105 de NF-κB.

Respecto a la expresión de los genes regulados negativamente, los transcritos para las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  (Figura. 9A, B y C) mostraron una disminución de los mismos en relación con los niveles hallados en el grupo Co. Sin embargo, en los pacientes con mayor compromiso pulmonar se determinó un incremento en el ARNm de IL-1 $\beta$  respecto del grupo Co (Fig. 9A).

**Figura 9: Niveles de expresión génica de IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), e IFN- $\gamma$  (C) en CMP de controles sanos (Co), y pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP).**



Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcrito de PPIA (peptidil proil isomerasa A). Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Kruskal-Wallis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de Co: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Abreviaciones: Co: Controles sanos; TBP: pacientes con Tuberculosis Pulmonar; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; IL-6; interleucina-6; IFN- $\gamma$ : interferón-gamma.

Según se muestra en la Figura 10, el estudio de la respuesta *in vitro* de los CMP contra el antígeno específico *Mtbi* reveló que los pacientes con TBP presentan una menor respuesta linfoproliferativa que los Co, a expensas de los resultados registrados en pacientes moderados y severos ( $p < 0.05$ , respectivamente).

**Figura 10: Capacidad linfoproliferativa de células mononucleares de sangre periférica (CMP) provenientes de controles sanos (Co) y de pacientes con Tuberculosis pulmonar (TBP) frente al estímulo específico con *Mtbi*.**



Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE): cociente entre cuentas por minuto (cpm) de cultivos estimulados y cpm de cultivos sin estimular. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Kruskal-Wallis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de Co  $*p < 0.05$ . Abreviaciones: CMP: células mononucleares de sangre periférica; Co: Controles sanos; TBP: Tuberculosis pulmonar.

#### **4.2.1.1 Análisis de asociación entre la expresión diferencial de genes regulados por el receptor de glucocorticoides y el perfil inmuno-endocrino en pacientes con tuberculosis pulmonar**

Como se mencionó, dado que el entorno inmuno-endocrino probablemente influya en el perfil transcripcional analizado, a fin de determinar potenciales relaciones entre los mismos, se realizaron análisis de correlación entre los mediadores inmuno-endocrino y los transcritos en estudio. En primer lugar, se observó una relación positiva entre la relación Cortisol/DHEA y la expresión de genes antiinflamatorios como ANXA1 y GILZ en pacientes con TBP moderada, una de ellas, la primera, también se manifestó en el grupo Co (Tabla 7). Por otro lado, la expresión de la isoforma RG $\alpha$  se correlacionó positivamente con los genes regulados por RG como ANXA1, GILZ, NFKBIB y FKBP51 en ambos grupos Co y TBP, de manera más notable en pacientes moderados, así como en el grupo de pacientes severos en el caso de ANXA1. Dentro de los pacientes moderados, la relación cortisol/DHEA se correlacionó directamente con la expresión de dos genes positivamente regulados por RG, ANXA1 ( $r=0.55$ ,  $p<0.05$ ) y GILZ ( $r=0.78$ ,  $p<0.01$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7: Análisis de correlación entre los niveles de expresión génica en CMP y los niveles plasmáticos de citocinas y hormonas en controles sanos (Co) y en pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP).**

	Co		TBP		Moderado		Severo	
	Valor de p	r <sub>s</sub>						
Cortisol/DHEA vs ANXA1	<0.05	0.38	ns	-	<0.05	0.55	ns	-
Cortisol/DHEA vs GILZ	ns	-	ns	-	<0.01	0.78	ns	-
RGα vs ANXA1	<0.0001	0.73	<0.0001	0.78	<0.0001	0.86	<0.01	0.77
RGα vs GILZ	<0.0001	0.64	<0.001	0.53	<0.001	0.73	ns	-
RGα vs NFKBIB	<0.0001	0.57	<0.0001	0.61	<0.0001	0.76	ns	-
RGα vs FKBP51	<0.0001	0.62	<0.001	0.55	<0.001	0.71	ns	-

El test de rango de Spearman fue utilizado para determinar la correlación entre las variables.

Abreviaciones: r<sub>s</sub>: coeficiente de correlación de Spearman; ns: no significativo. Co: controles sanos; TBP: pacientes con Tuberculosis pulmonar; RGα: receptor de glucocorticoides alfa; ANXA1: Anexina A1; GILZ: cremallera de leucina inducida por glucocorticoides; NFKBIB: inhibidor de NF-κB beta; FKBP51: FKBP prolil isomerasa 5; DHEA: dehidroepiandrosterona.

#### **4.2.2 Evaluación *in vitro* de la sensibilidad a glucocorticoides de células de pacientes con tuberculosis pulmonar y controles sanos**

Para llevar a cabo este ensayo se incluyeron en el estudio 8 pacientes con TBP y 8 individuos sanos que coincidían en sexo (6 Femeninos y 2 Masculinos) y edad (en años TBP:  $44 \pm 12$ ; Co:  $43 \pm 14$ ; media  $\pm$  desvío estándar). De cada muestra se realizaron cultivos de leucocitos totales y de CMP, que fueron estimulados tanto con LPS como con *Mtbi*, en el caso de los leucocitos totales, o sólo con *Mtbi*, para las CMPs. Además, las células fueron tratadas con DEX y Cortisol en diferentes rangos de concentración durante 24hs. Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo en los que luego se determinaron los niveles de IL-6 con el objetivo de analizar el efecto de los distintos tratamientos.

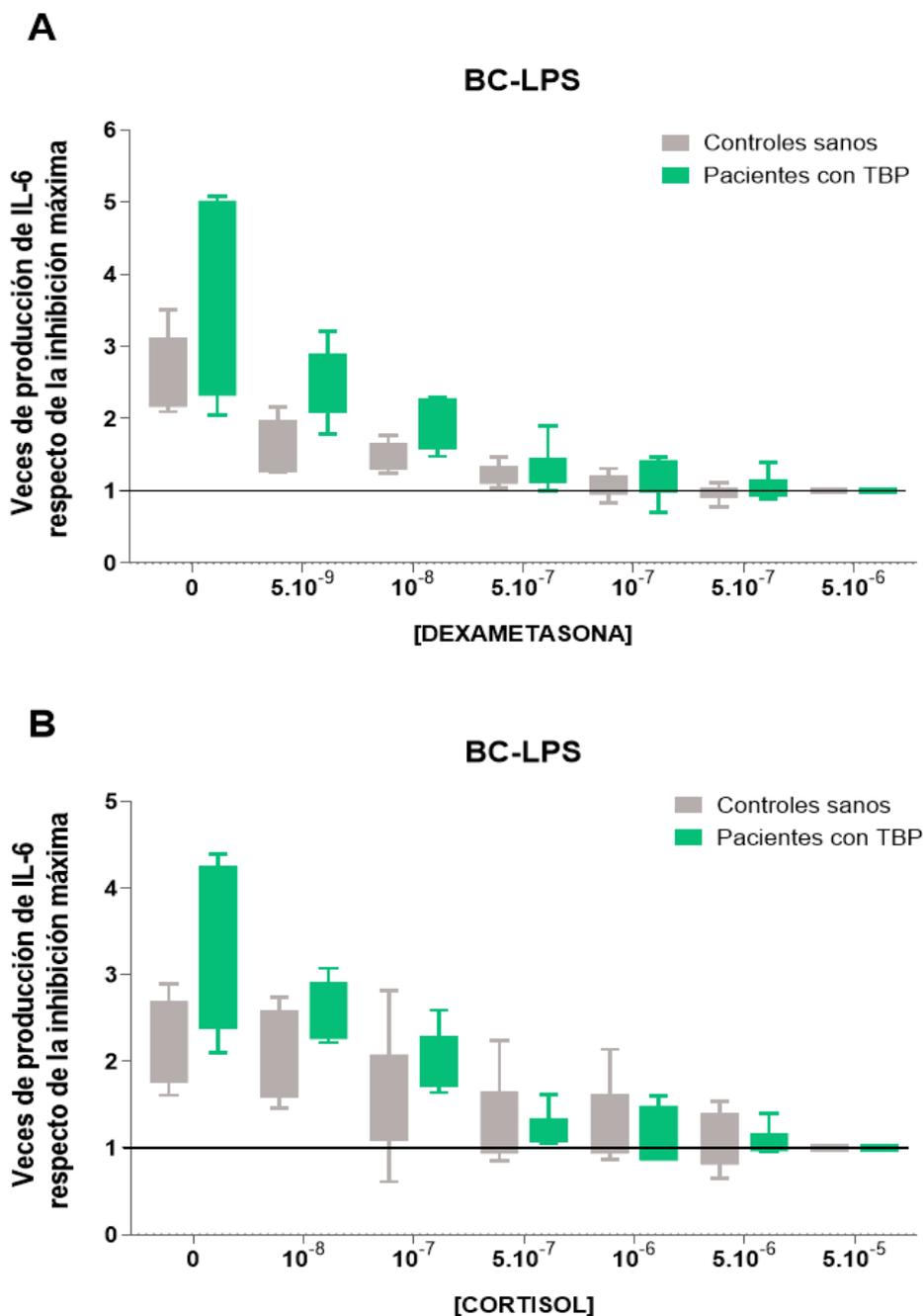
En base a los resultados obtenidos, y como era de esperar en función de trabajos previos, el tratamiento con GCs disminuyó significativamente la producción de IL-6, aunque los niveles de la citocina siempre fueron superiores respecto a de los cultivos sin estimular. Debido a la gran variabilidad de los datos obtenidos, para facilitar el análisis se optó por normalizar las concentraciones de IL-6 en los sobrenadantes. De esta forma los resultados se presentan como las veces de producción de la citocina en cada cultivo, respecto de los niveles de IL-6 hallados en los cultivos tratados con la mayor dosis de GCs, es decir, la mayor inhibición. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA a dos factores con medidas repetidas, que permite considerar dos fuentes de variación. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en función del tipo de cultivo celular analizado.

### **4.2.3 Evaluación de la sensibilidad a glucocorticoides de leucocitos provenientes de pacientes con tuberculosis pulmonar y controles sanos estimulados con LPS o *Mtbi*.**

Con el objetivo de analizar la resistencia a los GC en BC (leucocitos purificados), se llevó adelante un ensayo dosis-respuesta, estimulando estas células con LPS o *Mtbi*, y tratándolas en simultáneo con diferentes dosis de DEX o cortisol. Los resultados obtenidos para el caso de los cultivos de leucocitos estimulados con LPS e inhibidos con DEX se muestran en la primera gráfica (Figura 11, panel A), en tanto que el panel B muestra los correspondientes al tratamiento con cortisol. Como puede evidenciarse en ambas figuras, si bien el tratamiento con los GCs inhibió de manera dosis dependiente la producción de la citocina, el análisis de ANOVA a dos factores reveló que la capacidad inhibitoria de ambos GCs es diferente dependiendo de la procedencia de las CMP (Co o pacientes con TBP) Se observó que, tanto para los cultivos tratados con DEX o Cortisol, hay una menor capacidad inhibitoria de los esteroides sobre la producción de IL-6 en los cultivos de leucocitos provenientes de pacientes con TBP respecto de la ejercida sobre los de los Controles (DEX  $F=7.5$ ,  $P<0.001$ ; Cortisol  $F=7.6$ ,  $P<0.001$ )

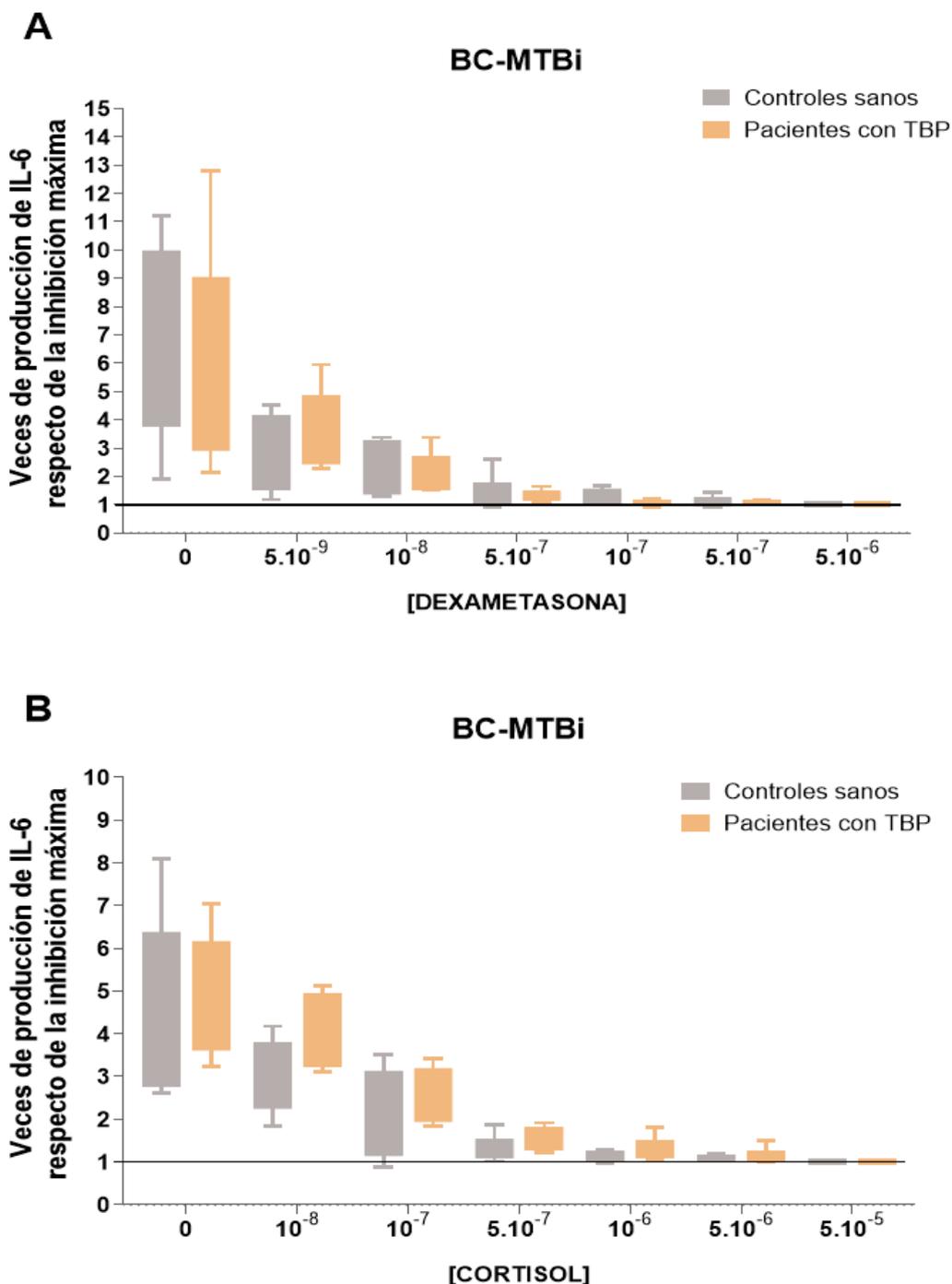
Como se puede observar en la Figura 12, cuando los leucocitos provenientes de ambos grupos son enfrentados al antígeno específico *Mtbi* y son tratados con las respectivas dosis de DEX y cortisol, al igual que en los cultivos anteriores se observó una inhibición dosis dependiente de ambos esteroides. Sin embargo, las células provenientes de pacientes con TBP presentan una menor sensibilidad sólo al tratamiento con Cortisol al compararlo con las células del grupo de control (Cortisol  $F=7.9$ ,  $P<0.0001$ ).

**Figura 11: Evaluación de la producción de IL-6 *in vitro* por parte de leucocitos provenientes de pacientes con TB pulmonar y de controles sanos estimuladas con Lipopolisacárido (LPS) y tratados con diferentes dosis de Cortisol o Dexametasona (DEX).**



Los valores de la producción de IL-6 se encuentran expresados como las veces de cambio de la concentración de IL-6 respecto del valor de la inhibición máxima. Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de dos vías con medidas repetidas.

Figura 12: Evaluación de la producción de IL-6 *in vitro* por parte de leucocitos provenientes de pacientes con TB pulmonar y de controles sanos estimuladas con *Mycobacterium tuberculosis* irradiado (*Mtbi*) y tratados con diferentes dosis de Cortisol o Dexametasona.



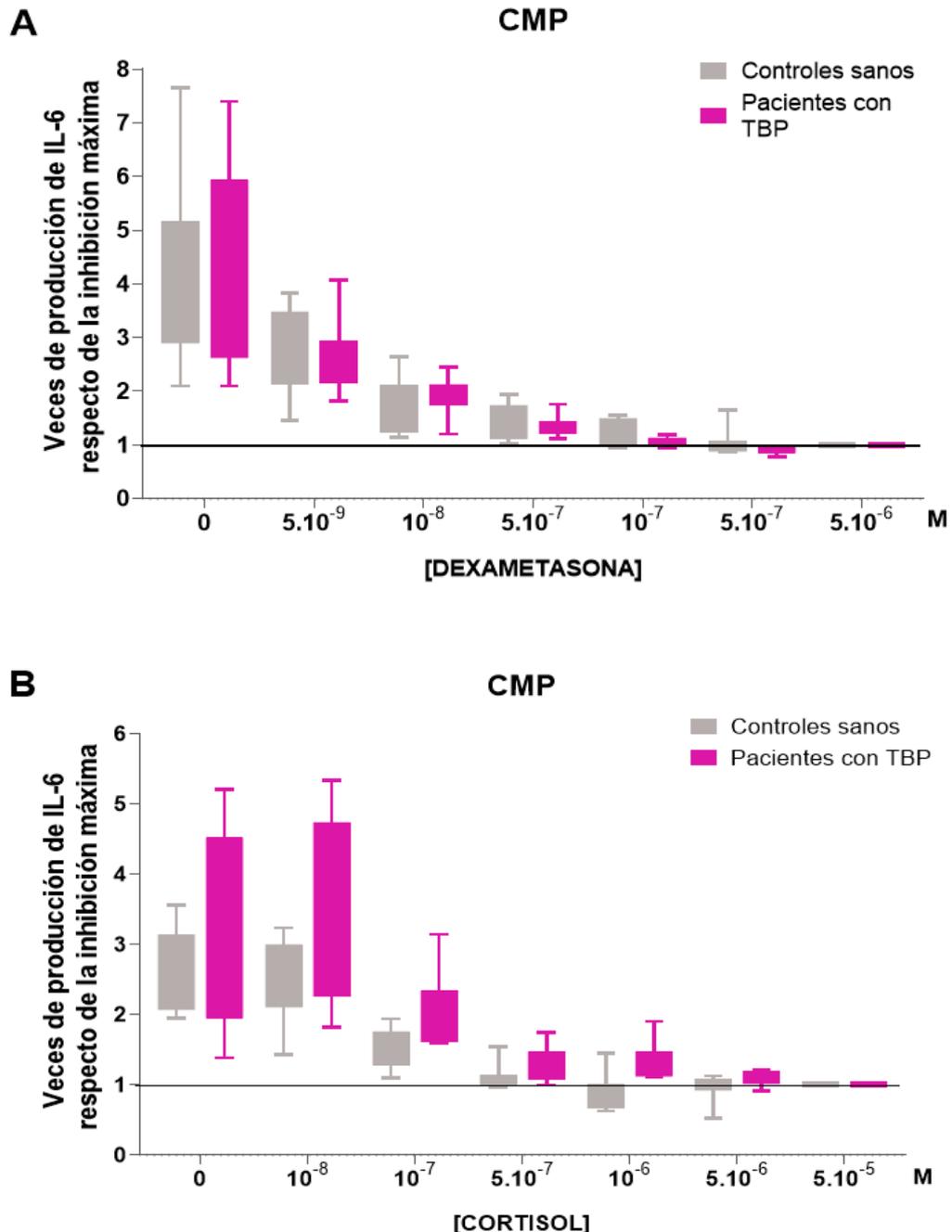
Los valores de la producción de IL-6 se encuentran expresados como las veces de cambio de la concentración IL-6 respecto el valor de la inhibición máxima. Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores

de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de dos vías con medidas repetidas.

#### **4.2.4 Evaluación de la sensibilidad a glucocorticoides de células mononucleares periféricas provenientes de pacientes con TBP y controles sanos estimulados con *Mtbi*.**

Los resultados relacionados al accionar del cortisol y DEX *in vitro* sobre CMP de pacientes con TBP y de Co estimuladas con *Mtbi* se encuentran representados en la figura 13. De forma similar a lo observado para las BC, y como era de esperar, en presencia de diferentes concentraciones de ambos GCs, se observó una disminución significativa de la producción de IL-6 de manera dosis-dependiente ( $F=12$ ,  $p<0.0001$  y  $F= 16.8$ ,  $p<0.0001$ , Figura 13 panel A y B respectivamente). Además, frente al agregado de cortisol, este efecto mostró ser dependiente del grupo al que pertenecía la muestra. [ $F=21$ ;  $p<0.0001$ ]. Es decir, el efecto inhibitorio del agregado de cortisol difiere en magnitud según las CMP provengan de pacientes con TBP o Co; para una misma dosis de cortisol, se observó una mayor capacidad inhibitoria sobre las CMP provenientes de Co respecto al ejercido sobre las de pacientes con TBP (Fig. 13 A y B).

**Figura 13: Evaluación de la producción de IL-6 *in vitro* por parte de las células mononucleares periféricas provenientes de pacientes con TB pulmonar (TBP) y de controles sanos estimuladas con *Mycobacterium tuberculosis irradiado (Mtb)* y tratados con diferentes dosis de Cortisol o Dexametasona.**



Los valores de la producción de IL-6 se encuentran expresados como las veces de cambio de la concentración IL-6 respecto al valor de la inhibición máxima. Los datos están representados mediante un diagrama de cajas donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de dos vías con medidas repetidas.



## 4.2.5 Discusión capítulo II

### DISCUSIÓN OBJETIVO 2.1

Como se mencionó en la introducción, el cortisol, principal GC en humanos, ejerce un importante rol como agente antiinflamatorio e inmunosupresor por medio de su principal receptor funcional en las células de SI, el RG $\alpha$ . Este receptor es capaz de actuar a través de múltiples mecanismos regulando la expresión génica positiva o negativamente<sup>397</sup>. En base a ello, una forma de evaluar la capacidad funcional del cortisol circulante podría ser midiendo la expresión de genes regulados por el RG $\alpha$ . Para expandir nuestro conocimiento sobre las alteraciones inmuno-endocrinas en la TB y la potencial resistencia a la acción moduladora de cortisol endógeno en los pacientes con TBP severa, determinamos la expresión de genes regulados positivamente (genes antiinflamatorios y relacionados con la funcionalidad del RG: ANXA1, GILZ, NFKBIA, NFKBIB y FKBP51) y negativamente (genes de citocinas inflamatorias y específica de la respuesta celular: IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) por el RG.

La ANXA1 es uno de los mediadores implicados en las acciones antiinflamatorias de los GC<sup>195</sup>. Varios estudios han demostrado que los GCs inducen su síntesis de *novo* así como también la translocación de ANXA1 a la membrana celular de CMP o monocitos/macrófagos<sup>398,399</sup>. En este trabajo se observó que la expresión de ANXA1 aumentó significativamente en pacientes con formas progresivas de la enfermedad (pacientes con TBP moderada y severa), lo que implicaría que se mantiene algún tipo de actividad antiinflamatoria en ambos grupos. En pacientes moderados este aumento se correlacionó positivamente con el incremento del cociente Cortisol/DHEA, pero no en los pacientes severos. Por otro lado, en modelos experimentales de TB se ha demostrado que ANXA1 ejerce un papel protector durante una etapa temprana de la infección; favoreciendo la actividad de las

CDs y el desarrollo de la respuesta adaptativa<sup>400,401</sup>. Tales resultados divergentes pueden conciliarse asumiendo que ANXA1 se comporta como una molécula pleiotrópica en diferentes etapas del proceso fisiopatológico durante la TB.

Por otro lado, GILZ es responsable de muchos de los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los GCs, ya que participa en la regulación de la diferenciación, la apoptosis y el ciclo celular de las células inmunes<sup>270,402</sup>. GILZ se asocia e inhibe la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B, mediando así efectos inmunosupresores y antiinflamatorios en LT, macrófagos y células epiteliales, entre otros<sup>403-405</sup>. El hecho de que la expresión de GILZ se encontrara aumentada en nuestra cohorte de pacientes moderados, pero no en casos graves, sugiere un estado de menor respuesta de estos últimos pacientes, en términos del funcionamiento de GILZ.

Asimismo, se ha observado en enfermedades inflamatorias crónicas como el lupus eritematoso, que la expresión de GILZ se correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad<sup>406,407</sup>. En línea con esto, solo se observó una correlación positiva entre el aumento de la relación cortisol/DHEA y la expresión de GILZ en pacientes moderados, aunque esta relación aumenta con la severidad y es mayor en el grupo con enfermedad avanzada.

El análisis de la expresión transcripcional de dos genes involucrados en la regulación de la funcionalidad de NF- $\kappa$ B (NFKBIA y NFKBIB) reveló niveles aumentados de NFKBIA en CMP de pacientes severos al igual que los ARNm de NFKBIB, que también aparecieron aumentados en casos moderados. Esta demostración está en línea con la visión propuesta anteriormente de un efecto inhibitorio indirecto sobre la actividad de NF- $\kappa$ B a través de una mayor presencia de inhibidores de NF- $\kappa$ B. Una de las principales diferencias entre ambos miembros de esta familia es que NFKBIA puede responder rápidamente a estímulos tempranos

como el estrés, mientras que NFKBIB reaccionaría a una respuesta persistente, principalmente en situaciones de inflamación crónica, infección, estrés o diferenciación celular<sup>312,317</sup>.

Tanto en pacientes moderados como severos, el aumento de la expresión de NFKBIB puede limitar la funcionalidad de NF-κB. Mientras que, en pacientes con TBP severos, el aumento de ambos inhibidores de NF-κB puede actuar de forma sinérgica a través de dos mecanismos de respuesta diferentes en el funcionamiento de NF-κB. Asimismo, los mayores niveles de compuestos inflamatorios que presentan los pacientes severos pueden inducir un incremento de la expresión de NFKBIA a través de NF-κB, ejerciendo una regulación negativa sobre sí mismo<sup>315</sup> no siendo modulada la transcripción de NFKBIB por NF-κB.

Dado que las proteínas NF-κB constituyen una familia de FT expresados de forma ubicua capaces de mediar muchos fenómenos biológicos diferentes<sup>298,408,409</sup> y que la regulación funcional de GC no se ejerce a niveles transcripcionales, solo evaluamos la subunidad 1 de NF-κB, ya que constituiría el representante más importante de esta familia. Los niveles de transcripción de NF-κB (p50) fueron muy similares en todos los grupos de estudio; compatible con el punto de vista de que la actividad antiflogística de los GCs puede no deberse a un efecto directo sobre la transcripción de NF-κB.

Las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52, están implicadas en una variedad de procesos biológicos (transcripción, conformación de las proteínas, tráfico de proteínas entre otros)<sup>410-412</sup> además de regular la translocación nuclear del complejo GC-RG<sup>413,414</sup>. Algunos autores también han sugerido que el análisis de los niveles de ARNm de FKBP51 en CMP puede ser aplicado como una herramienta útil para evaluar la sensibilidad a los GCs<sup>415</sup>. Sin embargo, en el escenario de una patología

como la TBP, los transcritos de FKBP51 no revelaron grandes diferencias con los niveles encontrados en Co.

En este trabajo demostramos que el ambiente de donde provienen las células está condicionando la expresión de sus genes y en parte está relacionado con su respuesta *in vitro*. Estos hallazgos se alinean con resultados anteriores en los que las CMP de pacientes con TBP con o sin estímulos de Mtb producen niveles significativamente más bajos de citocinas inflamatorias, como IFN- $\gamma$  con respecto a los controles<sup>363,373</sup>. Además, cuando se clasificaron en dos grupos de pacientes según la concentración de cortisol y los valores de la relación cortisol/DHEA, los pacientes con los niveles más altos de estos parámetros tenían la respuesta proliferativa y la producción de citocinas más bajas<sup>373</sup>.

En el contexto actual de aumento de la expresión de genes antiinflamatorios regulados positivamente por GCs y dada la alta proporción de cortisol/DHEA, se podría haber esperado que los niveles de transcritos de compuestos inflamatorios en las CMP de pacientes con TBP disminuyeran. Sin embargo, los niveles de expresión de IL-6 e IFN- $\gamma$  permanecieron preservados en pacientes con TBP, y los pacientes con TBP severa mostraron un aumento en el transcritos de IL-1 $\beta$ . Queda por establecer si esto está relacionado con el aumento de la expresión de RG $\beta$  y la disminución de la relación RG $\alpha$ /RG $\beta$ , asociado con la resistencia a GC. En cualquier caso, parece claro que la propia cronicidad de la TB coexiste con un profundo desequilibrio inmunoendocrino que impide alcanzar un estado homeostático. Sin embargo, la TB no es la única enfermedad con esta característica, ya que en diferentes procesos crónicos<sup>416</sup> se observó que el aumento de la cantidad circulante de mediadores proinflamatorios coexiste con niveles más elevados de cortisol y de la

relación cortisol/DHEA, en consonancia con una especie de fallo regulatorio de retroalimentación que perpetuaría el proceso.

Es probable que este desequilibrio, especialmente la relación cortisol/DHEA, influya en la expresión génica de las CMP generando un perfil transcripcional particular, relacionado con la gravedad de la enfermedad, que incluso podría afectar la funcionalidad celular, como la linfoproliferación específica. Un fenómeno que empieza a ser más claro en los pacientes moderados y se profundiza en el grupo severo con algunas evidencias que apuntan a una resistencia parcial a los GCs endógenos reflejada en el aumento de la expresión de  $RG\beta$  e IL-1 $\beta$  o la baja relación  $RG\alpha/RG\beta$ .

## **DISCUSIÓN OBJETIVO 2.2**

Entre los ensayos para la evaluación de la sensibilidad a GCs en diferentes patologías, uno de los más reconocidos es la evaluación *ex vivo* de leucocitos frente a un estímulo, el posterior tratamiento con GCs y la evaluación de algún parámetro relacionado a la activación inducida por el estímulo e inhibida por los GCs<sup>417,418</sup>. Aunque existen diferencias específicas en la expresión del RG entre tejidos y células del sistema inmunitario<sup>419</sup>, Lowy y colaboradores (1989) demostraron características similares en la función de RG en linfocitos y células pituitarias. No obstante, Yehuda y colaboradores<sup>420</sup> mostraron una correlación entre la supresión de dexametasona *in vivo* y la sensibilidad RG en mononucleares. Esta evidencia, otorga a este tipo de ensayos validez para la evaluación de la resistencia a GCs en diferentes tejidos, aunque en este caso, al trabajar con BC o CMP estas cuestiones quedan saldadas. En la mayoría de las publicaciones, se han utilizado leucocitos, por ser las células más accesibles del cuerpo humano para estudiar la funcionalidad de RG *in vitro*. A

través de su estimulación con la endotoxina bacteriana lipopolisacárido se induce la producción de citocinas proinflamatorias y, luego, mediante la adición de diferentes concentraciones de GCs se busca la inhibición de las mismas. Sin embargo, estos trabajos realizan ensayos utilizando sangre entera, sin el paso previo de purificación de los leucocitos. En esta tesis se planteó la necesidad de purificar los leucocitos, con el propósito de aislarlos del entorno inmunoendócrino condicional del cual provienen, evaluar su viabilidad y posteriormente sembrar un número exacto de células a fin de normalizar las condiciones de cultivo e independizarse de todas las diferencias intrínsecas de la muestra (principalmente mediadores plasmáticos y número de leucocitos totales circulantes). Además, se incorporó tanto el estímulo específico con *Mtbi* como la utilización de CMP a fin de valorar la resistencia sobre una población más restringida de células y sobre la cual se realizaron todas las valoraciones de expresión génica y capacidad proliferativa ya descritas por el grupo<sup>369,395,421</sup>.

Uno de los logros de esta tesis tiene que ver con la primera demostración de la resistencia a GCs en pacientes con TBP mediante un ensayo *in vitro* funcional tanto de leucocitos como de CMP. El primer resultado que se presentó, mediante un protocolo similar a los utilizados por diferentes grupos en la bibliografía, mostró que los leucocitos purificados provenientes de pacientes con TBP estimulados con LPS y tratados tanto con DEX como con cortisol presentan una menor respuesta inhibitoria frente a los esteroides respecto de las células provenientes de Co. Además, frente al estímulo específico con *Mtbi* sólo se evidenció el mismo comportamiento ante la inhibición con cortisol, y no con DEX. Esto podría deberse por un lado a que el estímulo antigénico es menor al logrado con LPS junto a que la capacidad inhibitoria de la DEX es alrededor de 30 veces mayor a la del cortisol<sup>422</sup>, logrando mayor efecto frente a un estímulo menor.

Por otra parte, se ha reportado ampliamente alteraciones del perfil inmunoendócrino en patologías crónicas, ya sean inflamatorias o infecciosas, así como la resistencia a GCs, particularmente en aquellas con patologías inflamatorias que requieren el tratamiento con GCs<sup>423,424</sup>. Sin embargo, las patologías infecciosas crónicas constituyen un campo mucho menos explorado.

Existen algunos trabajos de casi tres décadas atrás, en donde se reportó la resistencia a GCs en pacientes infectados con VIH, que plantean la resistencia no sólo clínica, presentando síntomas típicos de la enfermedad de Addison; sino también funcional en células leucocitarias<sup>425</sup>. En sepsis se plantea una visión más compleja por su misma fisiopatología<sup>426</sup> y se han reportado numerosos trabajos donde se proponen alteraciones tanto a nivel transcripcional como a nivel funcional del RG<sup>427-429</sup> y se proponen diferentes posturas en cuanto al uso y concentraciones del GCs exógenos en el tratamiento de esta patología<sup>426</sup>. En base a los resultados previos<sup>363,369,395</sup> y constatados en esta tesis (objetivo 1 y 2.1), era esperable un comportamiento similar de las CMP de pacientes con TBP. Además, el hecho de observar el mismo patrón de resistencia en los leucocitos totales purificados frente al estímulo con LPS, abre un portal a nuevas preguntas respecto del perfil de expresión génica descrito en el objetivo 2.1 y otros ensayos funcionales, particularmente en polimorfonucleares. Además, aunque en esta primera instancia sólo se cuantificó IL-6, se estima confirmar los resultados evaluando otras citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , y profundizar en los mecanismos involucrados.

## **CAPÍTULO III**

### **4.3 CAPITULO III**

Análisis del perfil transcripcional de genes regulados positiva y negativamente por el receptor de glucocorticoides en células mononucleares de pacientes con TBPL su relación con los perfiles inmuno-endócrinos sistémico y local.

#### **4.3.1 Características de los pacientes con TBPL**

Los pacientes considerados en el cumplimiento de este objetivo pertenecen al Servicio de Neumología del Hospital Provincial del Centenario (Rosario, Argentina). De un total de 15 pacientes que acudieron a la consulta con derrame pleural, solo 10 de ellos fueron diagnosticados con TBPL. La muestra estuvo conformada por 3 mujeres y 7 hombres, con edades comprendidas entre los 18 y 62 años (media= 39; desvío estándar= 16).

Como ya se explicitó, la TBPL permite indagar respecto a las diferencias en la Respuesta inmunológica a nivel local, así como periférico. Se realizó un análisis bioquímico de muestras tanto de exudado pleural como de sangre periférica. En la Tabla 8 se detallan las principales diferencias observadas entre ambos compartimentos. Como era de esperar, todos los derrames exudativos de TBPL fueron con predominio linfocitario. Con respecto a la concentración de proteínas totales, los niveles de albúmina se hallaron significativamente disminuidos mientras que la enzima LDH se encuentra aumentada en el fluido pleural respecto de los niveles circulantes. Estos resultados coincidieron con los descriptos para exudados pleurales tuberculosos<sup>17</sup>.

**Tabla 8 Principales parámetros de laboratorio de Fluido Pleural y Sangre periférica provenientes de pacientes con Tuberculosis pleural.**

Parámetros bioquímicos	TBPL (n= 10)	
	Fluido pleural	Sangre
Leucocitos (10 <sup>3</sup> )/μl	3200 (1760-3500)	7669 (6135- 8700)
Neutrófilos %	10 (10-20)	70 (66- 74)
Linfocitos %	90 (80-90)*	17 (13- 18)
Monocitos %	-	12 (7- 13)
Proteínas totales [g/dl]	5 (5,2-5,7) **	7.2 (7.1- 7.7)
Albúmina [g/dl]	3.0 (2.9-3.1) **	3.8 (3.5- 3.9) **
LDH [g/dl]	1132(599-1330) **	299 (254-308)

Los datos se presentan como mediana (rango intercuartil). Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Mann-Whitney. Los asteriscos indican: \*p<0.05; \*\*p<0.01. Abreviaciones: TBPL: pacientes con Tuberculosis Pleural; LDH: Lactado Deshidrogenasa.

#### **4.3.2 Perfil inmuno-endócrino a nivel plasmático y en pleura de pacientes con TBPL.**

Respecto a las concentraciones de citocinas pro y antiinflamatorias, así como de hormonas esteroideas en pacientes con TBPL, pueden observarse en la Tabla 9. Como se muestra, hay un incremento de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  en el sitio local de la infección en comparación con las concentraciones halladas en circulación (p<0.001, p<0.0004 y p<0.0001, respectivamente). En cuanto a las hormonas, se encontraron niveles más bajos de cortisol y DHEA en fluido pleural respecto a sangre periférica. Por otra parte, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la hormona DHEA-S, así como en la relación cortisol/DHEA (Tabla 9).

**Tabla 9: Niveles plasmáticos y pleurales de citocinas y hormonas en paciente con tuberculosis pleural.**

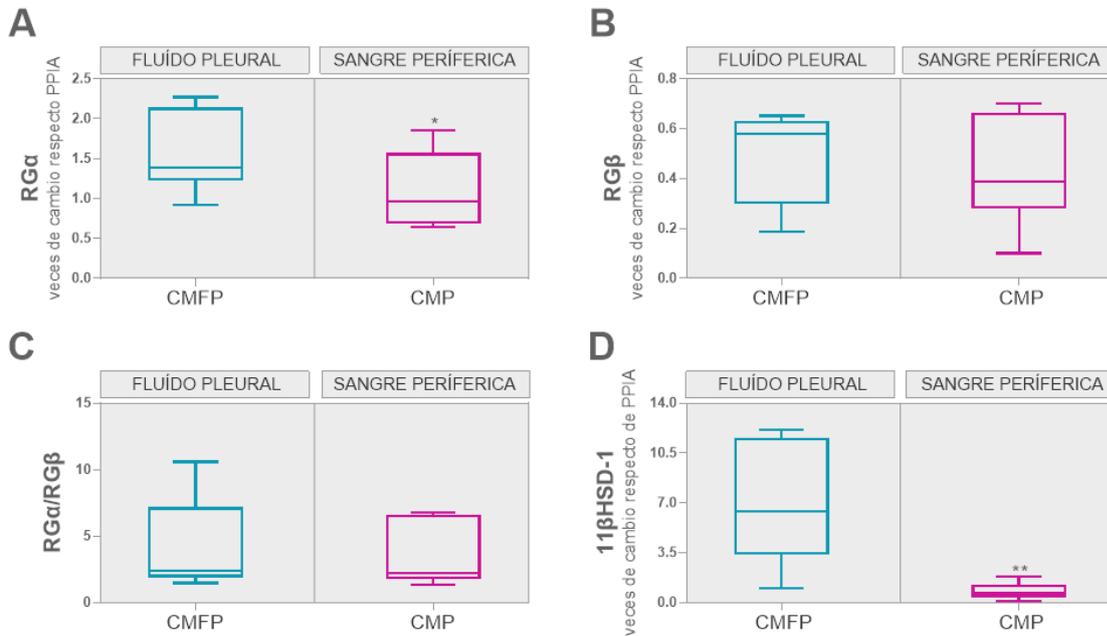
	Fluido pleural	Plasma	Valor de p
IL-1 $\beta$ [pg/ml]	2.8 (1.7-4.2)	0.2 (0.2-0.3)	<0.0013
IL-6 [pg/ml] <sup>a</sup>	100 (100-100)	22 (12-38)	<0.0004
IFN- $\gamma$ [pg/ml]	820 (720-849)	54 (35-65)	<0.0001
Cortisol [ng/ml]	102 (82-123)	179 (147-213)	<0.0008
DHEA-S [ng/ml]	0.6 (0.4-0.9)	0.7 (0.4-1.1)	ns
DHEA [ng/ml]	1.4 (1.2-1.7)	2.9 (1.4-3.2)	<0.05
Cortisol/DHEA	76 (37-90)	53 (33-63)	ns

Los datos están expresados como la mediana (rango intercuartil). Las comparaciones fueron realizadas usando el test de Mann-Whitney.

<sup>a</sup>Los valores de IL-6 son arbitrarios ya que todas las muestras excedieron las mayores concentraciones de la curva de calibración, aun realizando diluciones a la muestra. Abreviaciones: ns: no significativo; IL-6: interleucina-6; IFN- $\gamma$ : interferón-gamma; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; DHEA: Dehidroepiandrosterona.

Cuando se compararon los niveles de expresión de las dos isoformas del RG, se encontró un aumento de RG $\alpha$  en las de CMFP en comparación con las CMP de pacientes con TBPL ( $p < 0.05$ ) (Fig. 14A). No obstante, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la isoforma beta y la relación RG $\alpha$ /RG $\beta$  (Fig. 14 B y C). Asimismo, cuando se cuantificó la expresión de la enzima 11 $\beta$ -HSD1 se observó un incremento en las CMFP respecto a lo que sucede a nivel sistémico ( $p < 0.01$ ) (Fig. 14D).

**Figura 14: Niveles de expresión génica de las isoformas del receptor de glucocorticoides alfa (A), beta (B), la relación  $RG\alpha/RG\beta$  (C) y 11- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (D) en células mononucleares de fluido pleural (CMFP) y de sangre periférica (CMP) provenientes de pacientes con TB pleural (TBPL).**



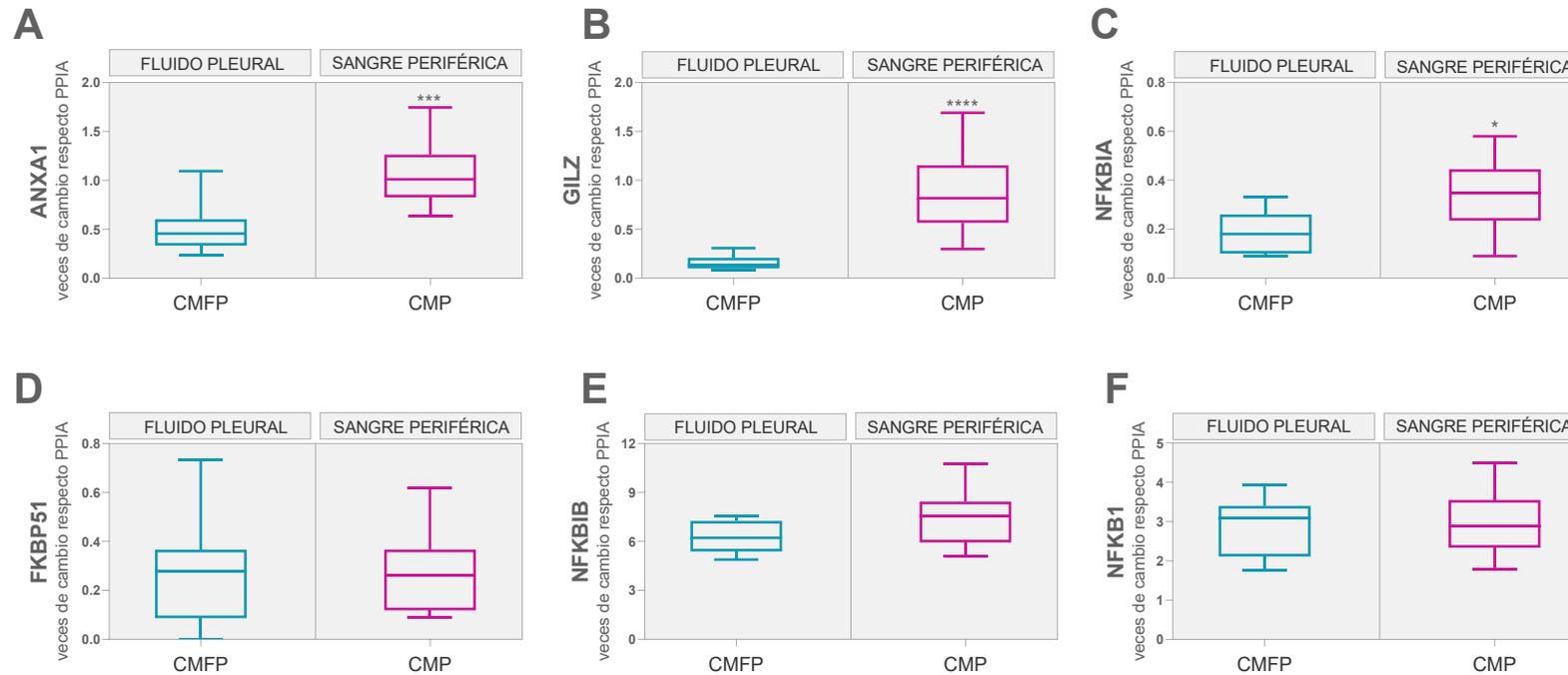
Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcrito de PPIA (peptidilprolil isomerasa A). Los datos están representados mediante un diagrama de caja donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Mann-Whitney. Los asteriscos indican: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Abreviaciones: RG $\alpha$ : receptor de glucocorticoides alfa; RG $\beta$ : receptor de glucocorticoides beta; RG $\alpha$ /RG $\beta$ : relación RG $\alpha$  y RG $\beta$ ; 11 $\beta$ -HSD1: 11 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1; PPIA peptidilprolil isomerasa A; CMP: células mononucleares de sangre periférica; CMFP: células mononucleares de fluido pleural.

#### 4.3.3 Cuantificación de los niveles de expresión de genes regulados por el receptor de glucocorticoides en células mononucleares de fluido pleural y sangre periférica en pacientes con TBPL

En esta sección se presentan los niveles de expresión de genes regulados positiva (ANXA1, GILZ, FKBP51, NFKBIA y NFKBIB) y negativamente (IL1- $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) por el RG, como así también del gen de la subunidad 1 del NF $\kappa$ B (NF $\kappa$ B1), en CMFP y CMP provenientes de pacientes con TBPL. Se encontró que las CMP mostraron un aumento en los niveles de expresión de los genes antiinflamatorios ANXA1 y GILZ respecto de las del espacio pleural CMFP ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.0001$ ); sin

observarse cambios en los de FKBP51 (Fig. 15 A, B y D; respectivamente). Además, también en las CMP se halló un incremento en los inhibidores de NF- $\kappa$ B, NFKBIA respecto las CMFP ( $p < 0.05$ ), mientras que no se hallaron diferencias significativas en la expresión de NF $\kappa$ B1 y NFKBIB (Fig. 15 E y F).

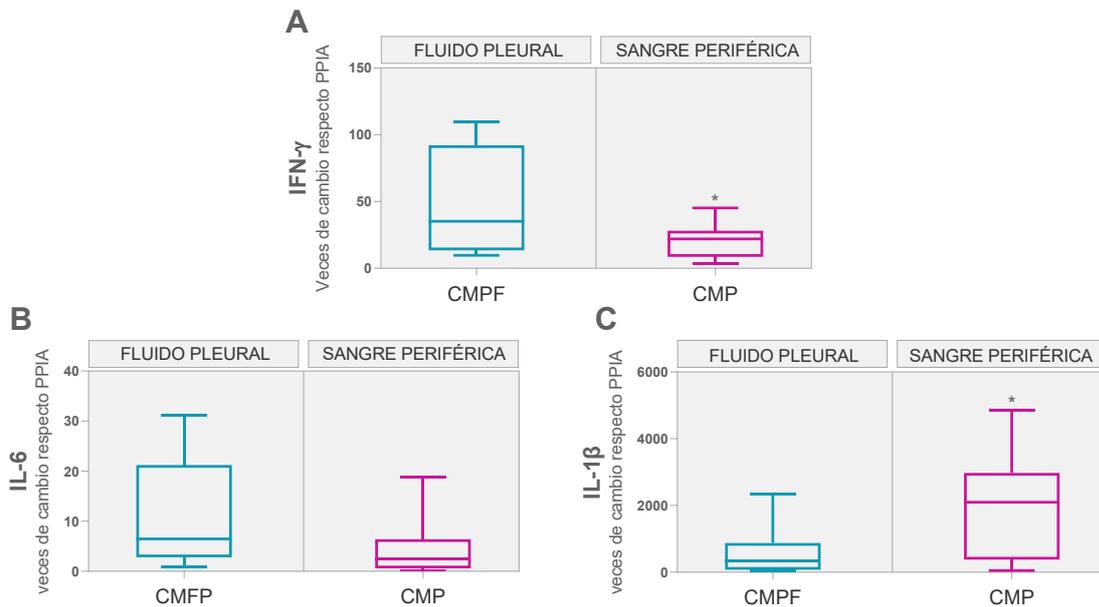
**Figura 15: Niveles de expresión génica de Anexina A1 (A), GILZ (B), NFKBIA (C), FKBP51 (D), NFKBIB (E) y NFKB1 (F), en células mononucleares de fluido pleural (CMFP) y de sangre periférica (CMP) provenientes de pacientes con TB pleural (TBPL).**



Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcrito de PPIA (peptidilprolil isomerasa A). Los datos están representados mediante un diagrama de caja donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Mann-Whitney. Los asteriscos indican: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Abreviaciones: ANXA1: Anexina A1; FKBP51: FKBP proil isomerasa 51; GILZ: cremallera de leucina inducida por glucocorticoides; NFKBIA: inhibidor de NF- $\kappa$ B alfa; NFKBIB: inhibidor de NF- $\kappa$ B beta; NFKB1: subunidad p105 de NF- $\kappa$ B; PPIA peptidilprolil isomerasa A; CMP: células mononucleares de sangre periférica; CMFP: células mononucleares de fluido pleural.

Por otro lado, con relación a los genes regulados negativamente por el RG, en las CM provenientes del sitio de lesión se encontraron mayores niveles de los transcritos de las citocinas IFN- $\gamma$  ( $p < 0.04$ ) e IL-6, mientras que los de IL-1 $\beta$  ( $p < 0.04$ ) se vieron disminuidos respecto a los hallados en CMP (Fig. 16 A, B y C).

**Figura 16: Niveles de expresión génica de las citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (C), en células mononucleares de fluido pleural (CMFP) y de sangre periférica (CMP) provenientes de pacientes con TB pleural (TBPL).**

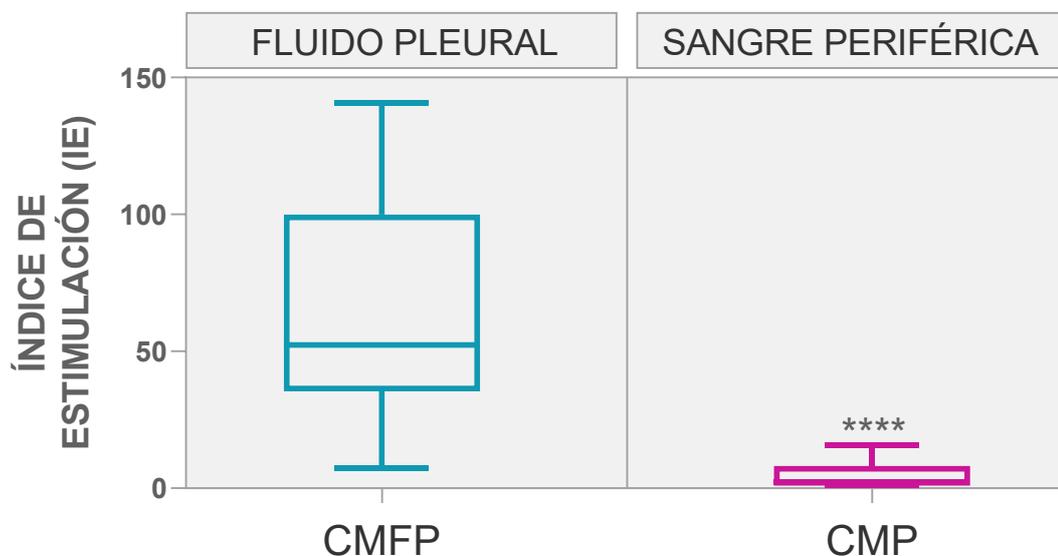


Los valores de la expresión relativa de los transcritos están normalizados respecto a la expresión relativa del transcrito de PPIA (peptidilprolil isomerasa A); Los datos están representados mediante un diagrama de caja donde se muestran los valores de la mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Mann-Whitney. Los asteriscos indican: \* $p < 0.05$ . Abreviaciones: IFN- $\gamma$ : interferón-gamma; IL-6; interleucina-6; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; PPIA peptidilprolil isomerasa A; CMP: células mononucleares de sangre periférica; CMFP: células mononucleares de fluido pleural.

#### 4.3.4 Evaluación de la capacidad linfoproliferativa frente al estímulo específico de *Mycobacterium Tuberculosis irradiado* en células mononucleares del fluido pleural y de sangre periférica provenientes de pacientes con tuberculosis pleural.

Se realizó un análisis de la capacidad proliferativa *in vitro* de las células de ambos compartimentos. Los resultados obtenidos indican que las CM provenientes del sitio de la infección, presentaban mayor capacidad linfoproliferativa respecto las CMP ( $p < 0.0001$ ).

**Figura 17: Capacidad linfoproliferativa de células mononucleares de fluido pleural (CMFP) y de sangre periférica (CMP) provenientes de pacientes con Tuberculosis pleural (TBPL) frente al estímulo específico con *Mtbi*.**



Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE): cociente entre cuentas por minuto (cpm) de cultivos estimulados y cpm de cultivos sin estimular. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentiles 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Las comparaciones fueron realizadas mediante test de Mann-Whitney. Los asteriscos indican: \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Abreviaciones: CMP: células mononucleares de sangre periférica; CMFP: células mononucleares de fluido pleural.

#### 4.3.5 Análisis de correlación entre la expresión diferencial de genes regulados por el receptor de glucocorticoides y el perfil inmuno-endocrino del sitio local de la infección y a nivel sistémico.

Finalmente, en esta sección se presentan las correlaciones significativas más relevantes entre mediadores inmuno-endócrinos y transcritos dentro de cada compartimento del grupo TBPL, es decir a nivel pleural o sistémico (Tabla 10). En relación a las correlaciones que se presentaron en sangre periférica, se observó una correlación positiva entre mediadores inflamatorios (IL-6 vs IFN- $\gamma$ ;  $r$  0.96,  $p < 0.003$ ). Además, se obtuvo una correlación negativa entre el transcrito de IL-1 $\beta$  y el de FKBP51. Por otro lado, a nivel del compartimento pleural, se observó una correlación negativa entre la relación Cortisol/DHEA y los niveles de IL-6, mientras que la capacidad proliferativa se relacionó positivamente con la expresión de IL-1 $\beta$ . Además, existe una correlación negativa entre el cortisol con NF-kB y la expresión de GILZ con la de IFN- $\gamma$ .

**Tabla 10: Análisis de correlación entre los niveles de expresión génica en células mononucleares de fluido pleural (CMFP) y de sangre periférica (CMP) provenientes de pacientes con Tuberculosis pleural (TBPL).**

<b>Mediadores Sangre periférica-CMP</b>	<b><math>r_s</math></b>	<b>Valor de P</b>
IL-6 vs IFN- $\gamma$	0.96	0.003
IL-1 $\beta$ ARNm vs FKBP51 ARNm	-0.65	0.05
<b>Mediadores Fluido pleural-CMFP</b>		
CORTISOL/DHEA-S vs IL-6	-0.9	0.02
IL-1 $\beta$ ARNm vs IE	0.8	0.02

RG $\alpha$ /RG $\beta$ vs NFKBIB ARNm	0.9	0.01
CORTISOL vs NFKB1 ARNm	-0.8	0.03
GILZ ARNm vs IFN- $\gamma$	-0.9	0.02

El test de rango de Spearman fue utilizado para determinar la correlación entre las variables. Abreviaciones: rs: coeficiente de correlación de Spearman; ns: no significativo. IL-6: interleucina-6; IFN- $\gamma$ : interferón-gamma; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; RG $\alpha$ : receptor de glucocorticoides alfa; GILZ: cremallera de leucina inducida por glucocorticoides; NFKBIB: inhibidor de NF- $\kappa$ B beta; FKBP51: FKBP prolil isomerasa 51; DHEA: dehidroepiandrosterona; NF $\kappa$ B1: subunidad p105 de NF- $\kappa$ B; CMFP: células mononucleares de fluido pleural; CMP: células mononucleares provenientes de sangre periférica; TBPL: pacientes con Tuberculosis pleural.

#### 4.3.6 Discusión Capítulo 3

Ahondar en el estudio de la respuesta inmuno-endocrina en el sitio local, donde el patógeno establece la infección, permite mejorar la comprensión de los mecanismos inmunológicos involucrados en el control y la progresión de la TB. Como se expresó previamente, los pacientes con TBPL a diferencia de los pacientes con TBP desarrollan una RI efectiva contra Mtb, ya que una considerable cantidad de los casos revierten el proceso infeccioso espontáneamente, sin necesidad del tratamiento específico<sup>23</sup>. Por lo tanto, esta manifestación de la TB constituye un buen modelo para estudiar las interacciones inmunoendócrinas en el ambiente en donde transcurre la infección, así como su correlato con la respuesta a nivel sistémico.

En diferentes trabajos se constató que el FP de pacientes con TBPL está compuesto por diversas subpoblaciones de linfocitos tales como: LT CD4<sup>+</sup> con un marcado perfil Th1<sup>430</sup>, LT $\gamma\delta$ <sup>431</sup> y células NK<sup>432</sup> lo que podría estar relacionado con los elevados niveles pleurales de IFN- $\gamma$ .

Al estudiar las citocinas presentes en el ambiente circundante de estas células, se encontró un incremento de las citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en el compartimento pleural respecto la periferia, lo cual podría deberse a las poblaciones celulares

presentes en el FP<sup>430</sup>. Las altas concentraciones de IFN- $\gamma$  en el FP de estos pacientes, podrían estar relacionadas con la magnitud de la RI celular protectora desarrollada en este sitio<sup>432-434</sup>. En cuanto a IL-1 $\beta$  e IL-6, sus niveles elevados son el sello distintivo de la inflamación, ya que desempeñan un papel crítico en la defensa contra patógenos bacterianos<sup>333,334</sup>.

Al estudiar las hormonas adrenales, se hallaron menores concentraciones de Cortisol y DHEA en el compartimiento pleural respecto a los niveles plasmáticos. Sin embargo, la relación Cortisol/DHEA no difiere entre el compartimiento pleural y la periferia. En tanto que en FP se halló una correlación inversa entre la relación Cortisol/DHEA y la concentración de IL-6, lo que sugiere que en el espacio pleural los bajos niveles de la relación no ejercerían un efecto inhibitorio sobre la producción de IL-6. El análisis de los parámetros de laboratorio mostró menores concentraciones de proteínas totales y albúmina en el FP respecto de los niveles sistémicos. Considerando que el Cortisol circula unido a la proteína CBG o albúmina<sup>227</sup>, las menores concentraciones de albúmina y proteínas totales observadas en FP, justificarían los bajos niveles de esta hormona a nivel pleural. Por otra parte, la DHEA se encontró disminuida en FP a diferencia de la concentración sistémica. Lo cual se explicaría al considerar que esta hormona es rápidamente metabolizada a nivel tisular<sup>435,436</sup>. Por el contrario, no se vieron modificados los niveles de DHEAS en FP respecto de las muestras de sangre periférica.

El estudio sobre la expresión de las distintas isoformas del RG evidencio que, a nivel pleural, el transcrito RG $\alpha$ , así como el de 11 $\beta$ -HSD1 en las CMFP estaban incrementados respecto de las CMP. Este aumento sugiere una respuesta que intenta optimizar el efecto modulador del Cortisol, presente en bajas concentraciones. Al analizar en mayor profundidad la expresión de genes modulados por el cortisol, se

observó una disminución en los transcritos para ANXA1, GILZ y NFKB1B en las CMFP respecto de las CMP. En cuanto a las citocinas estudiadas en las CMFP hubo un incremento en los niveles del transcripto IFN- $\gamma$  y una disminución en el ARNm de IL-1 $\beta$  respecto las CMP. Estos hallazgos podrían relacionarse con la diferencia de los niveles de cortisol hallados entre el compartimento pleural y la periferia. Una menor biodisponibilidad de cortisol en el sitio local de la infección influiría directamente en la actividad del RG. Si bien, la disponibilidad de cortisol intracelular en las CMFP se vería afectada por el aumento de la enzima 11 $\beta$ -HSD1, no estaría reflejado en la modulación de los genes regulados por RG. Además, la correlación negativa entre el cortisol con NF-kB1 y de la expresión de GILZ con los niveles de IFN- $\gamma$ , reflejan un entorno funcional sin restricciones para el RG, donde los bajos niveles de cortisol y de los genes antiinflamatorios regulados positivamente por él, generarían un ambiente permisivo para el desarrollo del gran proceso inflamatorio evidenciado en pleura.

Respecto a la capacidad linfoproliferativa en ambos sitios estudiados, las menores concentraciones de cortisol en el FP y el perfil de expresión génica puede que tengan cierto efecto en la mitogénesis de las CMFP, considerando que estas células presentan un mayor índice de estimulación respecto a las CMP. Al comparar las poblaciones celulares provenientes de la periferia y del FP se ha demostrado que, si bien los principales grupos de células estaban presentes en ambos tejidos, sus proporciones relativas varían de acuerdo a la ubicación anatómica. En el compartimento pleural se hallaron distintos subconjuntos de poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> con funciones efectoras específicas<sup>437</sup>, lo cual podría estar relacionado con esta elevada capacidad de respuesta específica por parte de las CMFP. Por otro lado, el aumento de cortisol sistémico modelaría un perfil transcripcional en las CMP,

de manera que cuando se las enfrenta con el estímulo específico condiciona su capacidad de respuesta reflejando una menor blastogénesis.

Estos resultados ponen en evidencia que el RG opera de una manera específica dependiendo del contexto. Ello no sólo se debe a una expresión diferente de las isoformas de la proteína RG, sino que también dependen de la disponibilidad del cortisol para modular las diferentes vías de señalización.

# **CONCLUSIONES**

## 5 CONCLUSIONES

### Conclusiones objetivo 1

Este estudio revela que los pacientes con TBP, preferentemente aquellos con enfermedad avanzada, son más propensos a presentar cantidades circulantes aumentadas de mediadores proinflamatorios y de la relación cortisol/DHEA en coexistencia con los niveles más altos de LPS. Este escenario sugiere la existencia de un círculo vicioso a nivel de la respuesta inflamatoria, que se vería perpetuada por el aumento de la permeabilidad intestinal y la consecuente circulación de endotoxina a nivel sistémico. En este contexto, la expresión de las isoformas del RG que brindarían cierto grado de resistencia a los elevados niveles de cortisol, contribuye al desequilibrio inmune-endocrino persistente y la inflamación crónica subyacente en la patogenia de la TBP progresiva.

### Conclusiones objetivo 2.1

Los pacientes con formas progresivas de TBP, particularmente los casos severos se caracterizan por una relación cortisol/DHEA desbalanceada, con CMP que presentan una expresión aumentada de genes antiinflamatorios regulados por el RG (ANXA1 e inhibidores de NF- $\kappa$ B), así como de IL-1 $\beta$  y de la isoforma RG $\beta$ , conjuntamente con la disminución de la capacidad proliferativa específica. Tales hallazgos sugieren una modulación activa del cortisol circulante, dependiente del grado de compromiso pulmonar de la TB, que puede verse como un intento no del todo exitoso de disminuir la inflamación, con alguna implicancia en la respuesta celular específica del antígeno.

### **Conclusiones objetivo 2.2**

Tanto los leucocitos totales como las CMP de pacientes con TBP fueron menos sensibles al tratamiento con GCs *in vitro* en comparación con las células del grupo de controles sanos., Estos resultados estarían en concordancia con hallazgos previos, sugiriendo que las CMP de estos pacientes presentan cierto grado de resistencia a la capacidad inmunomoduladora del cortisol.

### **Conclusiones objetivo 3**

En lo que concierne a la TBPL, las células del compartimento periférico presentan un marcado perfil de expresión de genes anti inflamatorios regulados por el receptor de glucocorticoides en relación con las células localizadas en el compartimento pleural. En tanto que los transcritos de citocinas muestran un patrón inverso. Ambos resultados estarían en consonancia con el perfil inmuno-endócrino observado en ambos compartimentos y la capacidad proliferativa.

# **ANEXO**

## 6 ANEXO 1

### 6.1 Optimización de las condiciones experimentales del ensayo *in vitro* para evaluar la sensibilidad a Glucocorticoides.

#### 6.1.1.1 Optimización de las condiciones experimentales del ensayo *in vitro* a partir de muestras de sangre entera.

Mediante un ensayo funcional descrito por de Rijk y col.<sup>417</sup> se pretendió estimar la sensibilidad a GCs en leucocitos de pacientes con TBP y Co. Este ensayo *in vitro* consiste en medir la sensibilidad en sangre periférica a GCs mediante la determinación de la capacidad de los esteroides para suprimir la producción de ciertas citocinas tras estimular las células con LPS. Mediante una serie de experimentos dosis-respuesta se estableció el tiempo de incubación, la concentración del estímulo (LPS - *Mtbi*) y el rango óptimo de dosis inhibitorias de los GCs dexametasona y cortisol, para llevar a cabo este ensayo.

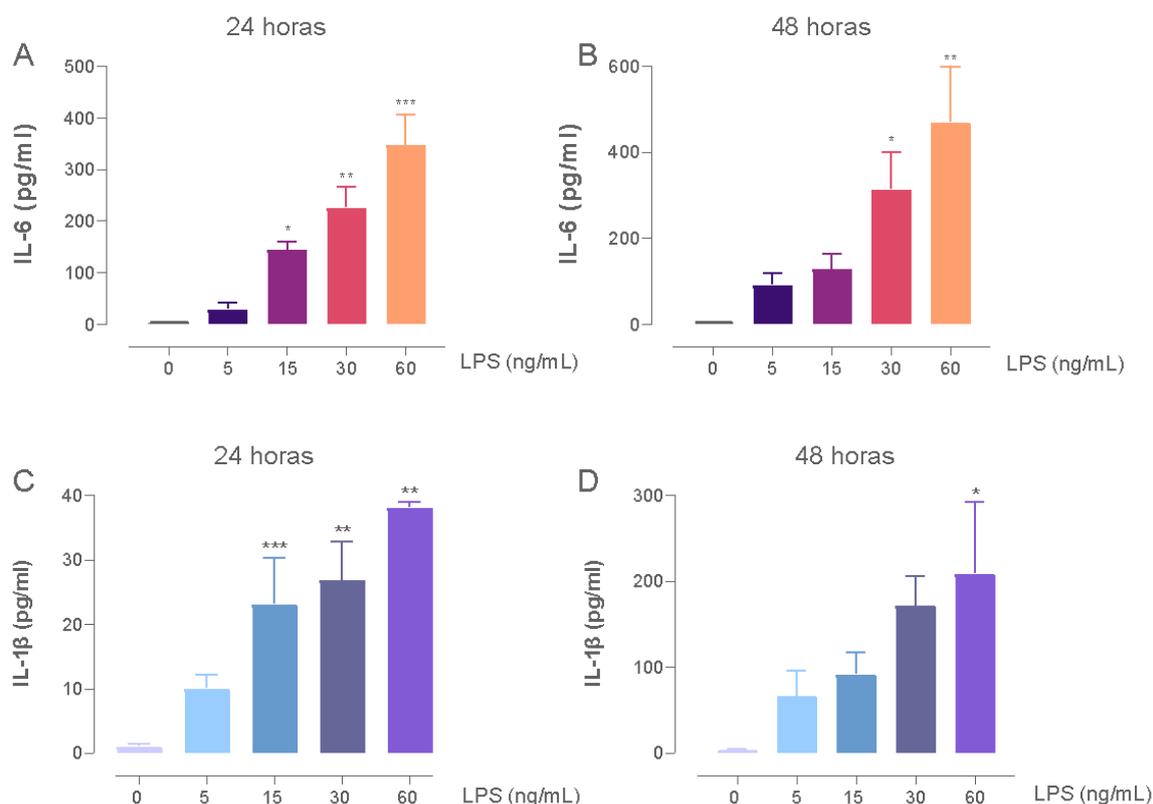
En una primera instancia, se determinó el tiempo de incubación, la dosis de LPS y la citoquina para medir la respuesta. En base a lo descrito por Rijk y col.<sup>417</sup> se sembraron 800 µl de sangre entera, de controles sanos (n=3) en placas de 24 pocillos con diferentes concentraciones de LPS (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 24 y 48 hs a 37°C en atmosfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Las concentraciones finales de LPS en el pocillo fueron 5, 15, 30, 60 ng/ml. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se recolectaron los sobrenadantes del cultivo y se cuantificaron las citocinas IL-6 e IL-1β con los kits comerciales mencionados en la sección 3.7.1.

En la figura 1 anexo, se puede observar que tras haber cultivado las muestras de sangre entera con diferentes concentraciones de LPS durante 24 y 48 hs, las células respondieron al estímulo de una manera dosis dependiente. A ambos tiempos,

la producción de IL-6 (Fig. 1 anexo paneles A y B) aumentó significativamente frente a diferentes concentraciones de LPS (15, 30 y 60 ng/ml) al compararla con la de los cultivos sin estimular ( $p < 0.001$ ).

Similar al comportamiento que se observó en la producción de IL-6, se mostró que el agregado de distintas concentraciones de LPS (5, 15, 30 y 60 ng/ml) induce un incremento dosis-dependiente en la producción de IL-1 $\beta$  (Fig. 1 anexo paneles C y D). A las 24hs de incubación se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando al cultivo de células se le agregaron 15, 30 y 60 ng/ml de LPS comparando con el cultivo sin estimular ( $F=11.4$ ,  $p < 0.001$ ), mientras que en los cultivos incubados durante 48 hs sólo se halló diferencia estadística a la dosis de 60 ng/ml de LPS ( $F=3.6$ ,  $p < 0.04$ ).

**Figura 1 anexo: Producción de IL-6 e IL-1 $\beta$  en cultivos de sangre entera, tras la exposición a diferentes concentraciones de LPS durante 24 y 48 horas de incubación.**



Los datos están representados en barras como la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=3$  controles sanos). El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA con test de comparaciones múltiples de Dunnett respecto al cultivo sin estimular, \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$ , \*  $p<0.05$ . Abreviaciones: IL-6: interleucina-6; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; LPS: lipopolisacárido.

De este primer ensayo, se puede concluir que si bien las células de sangre entera fueron capaces de secretar tanto IL-6 como IL-1 $\beta$  ante el agregado de un rango de LPS, se decide optar por cuantificar a la citoquina IL-6 como mediador de la respuesta ante el estímulo. Como se puede observar en los gráficos, esta citoquina es la que presenta un mayor rango de producción, lo cual es fundamental para realizar ensayos de inhibición del estímulo. Por otro lado, luego de analizar los resultados se seleccionó la dosis de LPS 30 ng/ml, debido a que a partir de los gráficos de índice de producción (figuras no mostradas) se comprobó estadísticamente que la misma

induce la mayor producción de citocinas antes de llegar al umbral de estímulo. Este hecho se constató tanto para los cultivos de 24 como de 48 hs de incubación. Asimismo, en la bibliografía también está reportada el uso de esta dosis para este ensayo <sup>438</sup>

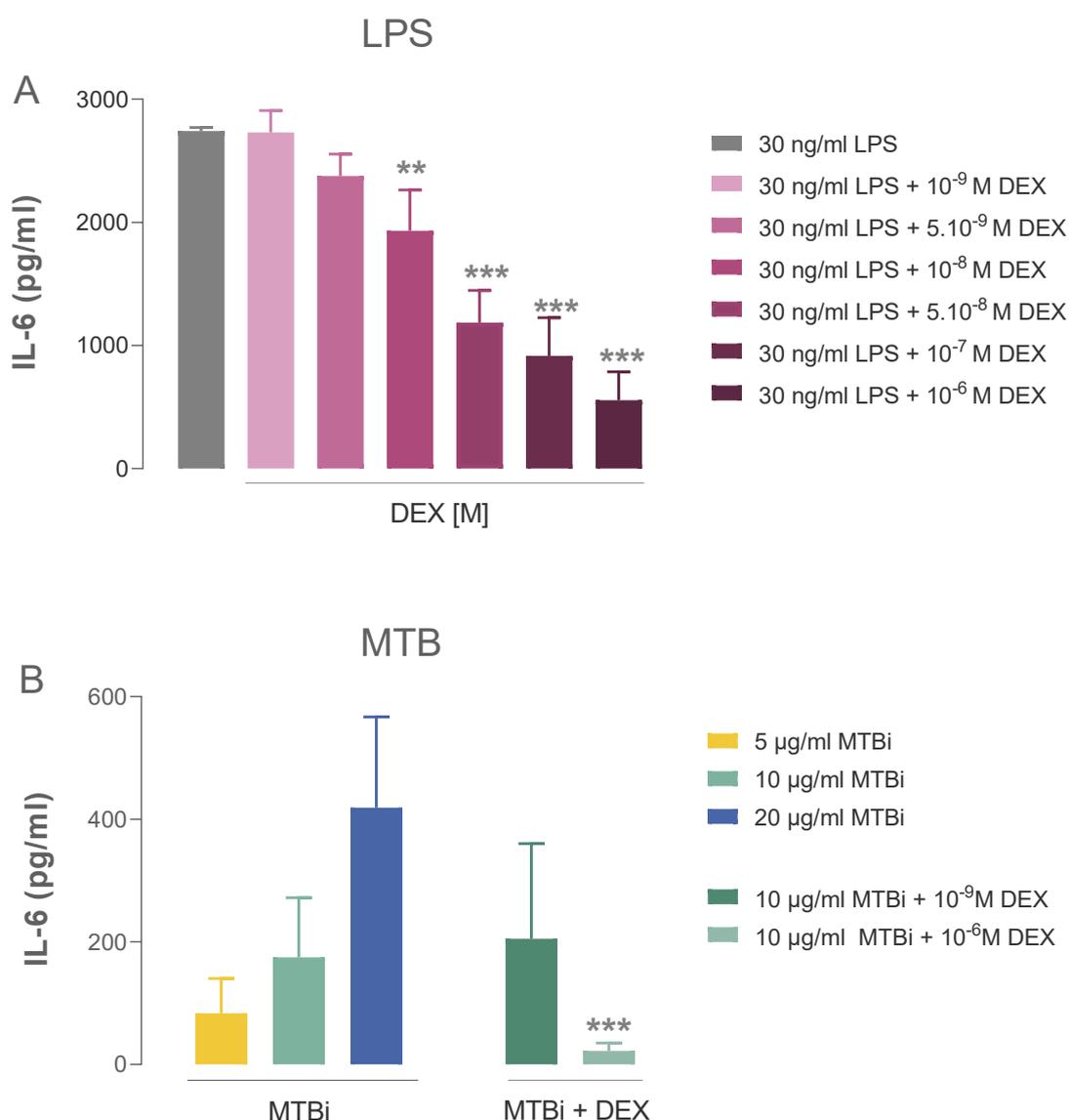
**Resumiendo, de este ensayo se estableció utilizar para los posteriores experimentos: una dosis de 30 ng/ml de LPS, un tiempo de incubación de 24hs y la citocina IL-6 como medida de respuesta ante el estímulo.**

En una segunda instancia, se decidió evaluar el efecto inhibitorio de un **rango de dosis de dexametasona (DEX, Sigma-Aldrich  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M)** sobre la producción de IL-6 tras estimular con LPS, utilizando el mismo protocolo mencionado en los primeros ensayos. El mismo procedimiento se realizó enfrentando las células con *Mtbi*, a fin de determinar la respuesta a GCs frente a un estímulo específico. En base a la experiencia en nuestro laboratorio de trabajar con *Mtbi* se estimularon las células con tres concentraciones del antígeno: 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ; dado que, en diferentes trabajos previos, la concentración de *Mtbi* siempre rondó entre los 8 y 10  $\mu\text{g/ml}$ <sup>439</sup>. Para evaluar el efecto inhibitorio sobre la producción de IL-6 frente al estímulo con *Mtbi* (10  $\mu\text{g/m}$ ) se probaron sólo la dosis mínima ( $10^{-9}$  M) y máxima ( $10^{-6}$  M) de DEX.

En la Figura 2 anexo panel A, se puede observar que del rango de dosis de DEX ( $10^{-6}$  - $10^{-9}$ M) que se utilizó induce efecto que oscilan desde una inhibición prácticamente nula, hasta una donde se acerca a un umbral. Como era de esperar, se comprobó una inhibición progresiva en la producción de IL-6 inducida por el estímulo con LPS (30 ng/ml) ante el agregado de concentraciones crecientes de DEX (F = 14, P<0.0001).

Por otra parte, en los ensayos de resistencia a GCs enfrentando las células al estímulo específico, se realizaron cultivos en paralelos en las mismas condiciones donde se evaluaron distintas dosis de *Mtbi*. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2 anexo, panel B. Como se puede observar, si bien se evidencia un aumento dosis dependiente, los mismos no difieren significativamente en parte por la dispersión de los resultados. Sí se evidenció un incremento significativo en la producción de IL-6 ante el agregado del estímulo específico respecto de los cultivos sin el agregado de DEX. Asimismo, el agregado de la dosis mínima ( $10^{-6}$  M) de DEX no se observó efecto sobre la producción de IL-6, mientras que la dosis máxima de DEX ( $10^{-9}$  M), inhibió de forma muy significativa la producción de la citocina.

**Figura 2 anexo: Evaluación del efecto inhibitorio de diferentes dosis de dexametasona sobre la producción de IL-6 por parte de muestras de sangre entera estimuladas con LPS (A) y *Mtbi* (B) durante 24hs.**



Los datos están representados en barras como la media  $\pm$  error estándar de la media (n=3 controles sanos). El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA con test de comparaciones múltiples de Dunnett respecto al cultivo sin el agregado de dexametasona, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \* p<0.05. Abreviaciones: IL-6: interleucina-6; IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta; LPS: lipopolisacárido; *Mtbi*: Mycobacterium Tuberculosis irradiado

La evaluación de esta serie de experimentos, los protocolos y resultados hallados, nos llevó a concluir que si bien se logró optimizar y reproducir el ensayo propuesto por De Rikj y col., es necesario destacar que el mismo presenta algunas

falencias al considerar las particularidades de la patología en estudio. En este sentido, los pacientes con TB se caracterizan por poseer aumentada la cantidad de glóbulos blancos respecto a los individuos sanos. Asimismo, estos pacientes poseen elevados niveles plasmáticos de cortisol y citocinas proinflamatorias, entre otras. Estas diferencias entre pacientes y controles nos condujeron a desestimar el protocolo optimizado en estas condiciones y descrito por De Rikj, debido a que en el mismo no se tienen en consideración los factores de confusión mencionados. Es por ello, que se decidió normalizar las condiciones de cultivo (concentración celular y de mediadores solubles) a fin de minimizar el efecto de estas variables. Para ello, en lugar de utilizar sangre entera, se decidió aislar los leucocitos totales y CMP (independizarnos de las concentraciones plasmáticas de mediadores inmunoendócrinos) evaluar la viabilidad de las muestras y sembrar un número definido de células. A continuación, se detallan los ensayos para optimizar las condiciones de estos cultivos.

### **6.1.2 Optimización de las condiciones experimentales del ensayo *in vitro* a partir de leucocitos totales y células mononucleares de sangre periférica.**

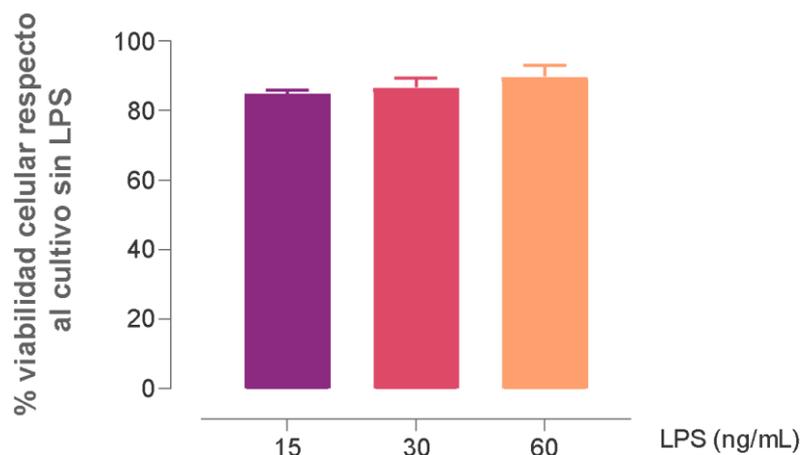
Para la estandarización del ensayo, en base a experiencias previas y bibliografía sembraron dos concentraciones de leucocitos:  $0,5 \cdot 10^6$  y  $1 \cdot 10^6$  en un volumen final de 600  $\mu$ l de medio de cultivo completo [MCC: RPMI 1640 adicionado con ATB y 5 % de suero fetal bovino (Gibco)]. A ambas concentraciones de células se las estimuló con diferentes dosis de LPS (5, 15 y 30 ng/ml) y de *Mtbi* (5, 10 y 20  $\mu$ g/ml) durante 24hs en placas de 24 pocillos. a fin de confirmar las condiciones ya definidas con las muestras de sangre entera. Luego de las 24hs se recolectó el sobrenadante y se cuantificó IL-6. Asimismo, también se probó el mismo protocolo

con CMP estimulándolas solamente con el antígeno específico *Mtbi* e inhibiendo la producción de IL-6 con las mismas concentraciones de DEX y Cortisol.

## **6.2 Evaluación del efecto de las concentraciones de estímulo con Lipopolisacárido y de los disolventes de DEX sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica.**

Para determinar si el estímulo con LPS, así como la concentración de etanol (solvente en el que se disuelve la DEX) afectan la viabilidad de las células en cultivo, se realizaron ensayos convencionales de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio) los cuales no se podían realizar cuando se trabajaba con sangre entera. Se cultivaron 50.000 CMP de Co (n=3) por cuadruplicado en placas de 96 pocillos con y sin el agregado de diferentes concentraciones de LPS (15, 30 y 60 ng/ml) o etanol (0.1%, 0.5%, 2.5% v/v) durante 24 hs a 37°C. Al final de la incubación, se agregaron 10 µl de MTT (5 mg/ml en BFS; Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubaron durante 3 horas más a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante de cada pocillo y se les adicionó 100 µL de buffer de lisis (DMSO o HCl 0,04 N en isopropanol o SDS 10% en HCl 0,01 N) a cada uno y se homogeniza a fin de disolver los cristales de azul de Formazán. Finalmente, este ensayo colorimétrico se cuantificó a una densidad óptica de 570/630 nm. La viabilidad celular se calculó como porcentaje referido a la absorbancia media del cultivo sin estimular, a la cual se le asignó un valor de viabilidad de referencia del 100%.

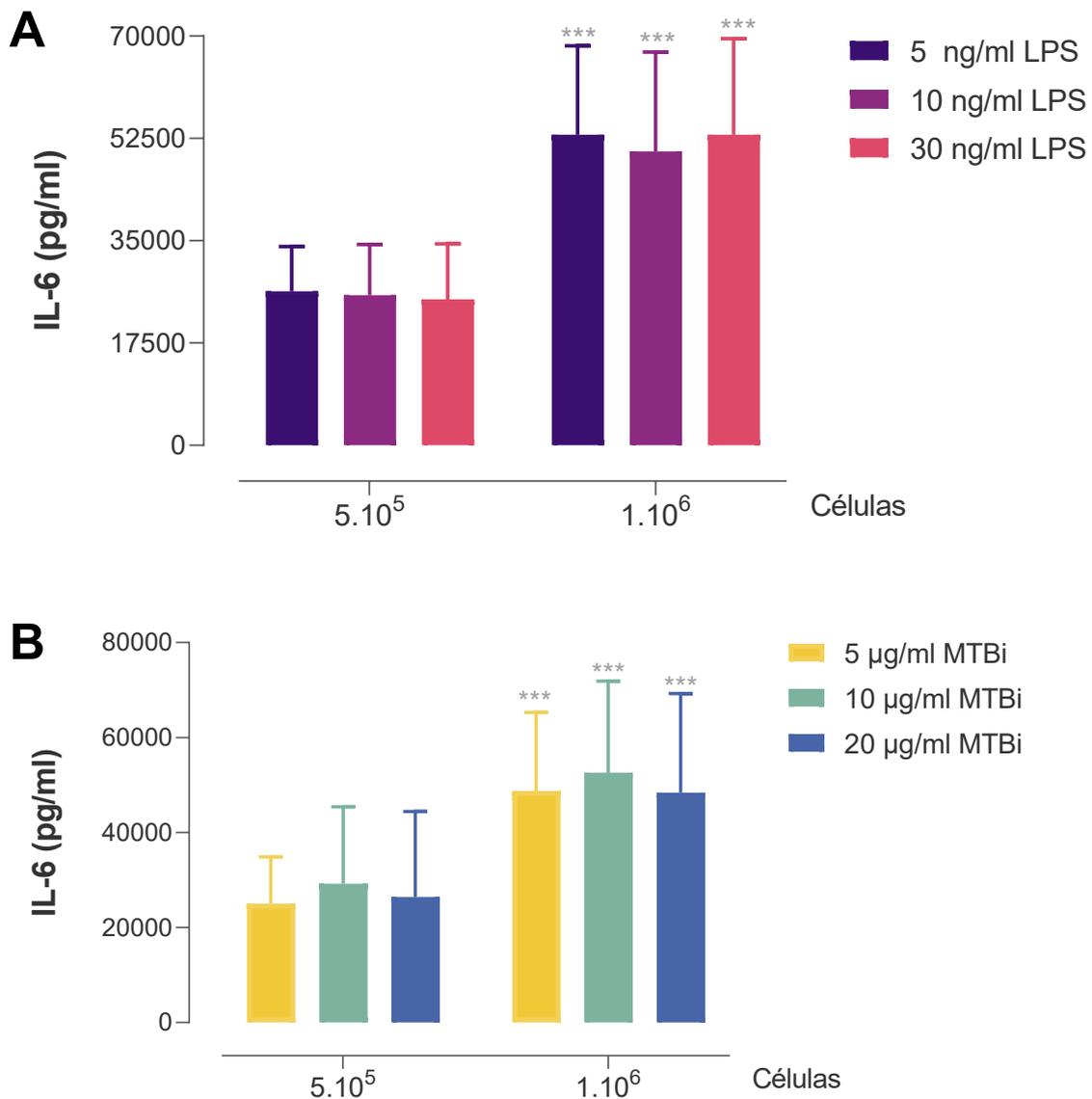
**Figura 3 anexo: Evaluación de efecto de las diferentes concentraciones con Lipopolisacárido, utilizadas como estímulo durante 24 horas, sobre la viabilidad celular.**



Abreviaciones: LPS: lipopolisacárido. La viabilidad celular se calculó como porcentaje referido a la absorbancia promedio de los cultivos sin estimular, a la cual se le asignó un valor de viabilidad de referencia del 100%. Los datos están representados en barras como la media  $\pm$  error estándar de la media. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA (n=6).

Posteriormente debido a lo mencionado en la sección anterior, se decidió normalizar la cantidad de células que se disponen en cada pocillo. Para llevar a cabo la estandarización del ensayo, se evaluó la respuesta de leucocitos tras estimularlos con diferentes concentraciones de LPS y *Mtbi*. Como se puede observar en la Figura 4 al duplicar la cantidad de células se incrementa la producción de IL-6 del mismo modo. El análisis de ANOVA de dos factores reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas cantidades de células ( $F= 103.5$ ,  $P<0.0001$ ). Respecto a las distintas concentraciones del estímulo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas. El mismo comportamiento fue observado cuando las células fueron estimuladas con *Mtbi*.

**Figura 4 anexo: Evaluación de la producción de interleucina-6 tras estimular las células con distintas concentraciones de lipopolisacárido y *Mycobacterium tuberculosis* irradiado.**



Los datos están representados en barras como la media  $\pm$  error estándar de la media (n=3 controles sanos). El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA \*\*\*p<0.001. Abreviaciones: IL-6: interleucina-6; LPS: lipopolisacárido; *Mtbi*: *Mycobacterium Tuberculosis* irradiado

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Furin, J., Cox, H. & Pai, M. Tuberculosis. *The Lancet* **393**, 1642–1656 (2019).
2. Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U, H. HG. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy Contribution of job control to social gradient in. **350**, 1404 (1997).
3. Zink, A. R. *et al.* Characterization of Mycobacterium tuberculosis Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. *J Clin Microbiol* **41**, 359 (2003).
4. Comas, I. *et al.* Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nat Genet* **45**, 1176–1182 (2013).
5. van Doren, T. P. Biocultural perspectives of infectious diseases and demographic evolution: Tuberculosis and its comorbidities through history. *Evolutionary Anthropology* Preprint at <https://doi.org/10.1002/evan.21970> (2022).
6. Ryckman, T. *et al.* Ending tuberculosis in a post-COVID-19 world: a person-centred, equity-oriented approach. *Lancet Infect Dis* **23**, e59–e66 (2023).
7. Global Tuberculosis report 2022. Geneva: World Health organization. licence: CC- BY-NC-SA 3.0 IGO. (2022).
8. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín N°6-Tuberculosis en la Argentina. (2023).
9. de Abreu E Silva, M., Di Lorenzo Oliveira, C., Teixeira Neto, R. G. & Camargos, P. A. Spatial distribution of tuberculosis from 2002 to 2012 in a midsize city in Brazil. *BMC Public Health* **16**, 912 (2016).

10. Bossio, J. C., Arias, S. J. & Fernández, H. R. Tuberculosis en Argentina: Desigualdad social y de género. *Salud Colect* **8**, 77–91 (2012).
11. Golden, M. P. & Vikram, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *Am Fam Physician* **72**, 1761–1768 (2005).
12. Moudgil, H., Sridhar, G. & Leitch, A. G. *Reactivation disease: the commonest form of tuberculous pleural effusion in Edinburgh, 1980-1991*. *Respiratory Medicine* vol. 88 (1994).
13. Shaw, J. A. & Koegelenberg, C. F. N. Pleural Tuberculosis. *Clin Chest Med* **42**, 649–666 (2021).
14. Nachiappan, A. C. *et al.* Pulmonary Tuberculosis: Role of Radiology in Diagnosis and Management. *Radiographics* **37**, 52–72 (2017).
15. European Centre for Disease Prevention and Control, W. R. O. for Europe. T. surveillance and monitoring in E. 2022 – 2020 data. C. W. R. O. for E. and S. *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2022*. (2022).
16. Gong, X., He, Y., Zhou, K., Hua, Y. & Li, Y. Efficacy of Xpert in tuberculosis diagnosis based on various specimens: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol* **13**, 1149741 (2023).
17. Migliori, G. B., Lange, C. & Light, R. W. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* **15**, 451–458 (2010).
18. Zhai, K., Lu, Y. & Shi, H.-Z. Tuberculous pleural effusion. *J Thorac Dis* **8**, E486-94 (2016).
19. Wong, C. F. Early diagnosis of tuberculous pleural effusion: apart from pleural fluid adenosine deaminase, pleural biopsy still has a role. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi* vol. 24 316–317 Preprint at <https://doi.org/10.12809/hkmj187289> (2018).

20. Aggarwal, A. N. *et al.* Pleural fluid interleukins for diagnosis of tuberculous pleural effusion: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* **159**, (2022).
21. Lange, C. *et al.* 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Lancet Infect Dis* **22**, e2–e12 (2022).
22. Trunz, B. B., Fine, P. & Dye, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* **367**, 1173–1180 (2006).
23. Shaw, J. A., Diacon, A. H. & Koegelenberg, C. F. N. Tuberculous pleural effusion. *Respirology* vol. 24 962–971 Preprint at <https://doi.org/10.1111/resp.13673> (2019).
24. Huang, L., Nazarova, E. V., Tan, S., Liu, Y. & Russell, D. G. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J Exp Med* **215**, 1135–1152 (2018).
25. Ravesloot-Chávez, M. M., Dis, E. Van & Stanley, S. A. The Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. (2021) doi:10.1146/annurev-immunol-093019.
26. Henry Boom, W., Schaible, U. E. & Achkar, J. M. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Invest* **131**, (2021).
27. Pai, M. *et al.* Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers* **2**, (2016).
28. Turner, R. D. & Bothamley, G. H. Cough and the transmission of tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases* **211**, 1367–1372 (2015).
29. Torrelles, J. B. & Schlesinger, L. S. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. *Trends Microbiol* **xx**, 1–10 (2017).

30. Byrne, A. J., Mathie, S. A., Gregory, L. G. & Lloyd, C. M. Pulmonary macrophages: Key players in the innate defence of the airways. *Thorax* **70**, 1189–1196 (2015).
31. Lee, W., VanderVen, B. C., Fahey, R. J. & Russell, D. G. Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* exploits host-derived fatty acids to limit metabolic stress. *J Biol Chem* **288**, 6788–6800 (2013).
32. VanderVen, B. C. *et al.* Novel Inhibitors of Cholesterol Degradation in *Mycobacterium tuberculosis* Reveal How the Bacterium's Metabolism Is Constrained by the Intracellular Environment. *PLoS Pathog* **11**, e1004679 (2015).
33. Henderson, R. A., Watkins, S. C. & Flynn, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* **159**, 635–643 (1997).
34. Bermudez, L. E. & Goodman, J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* **64**, 1400–1406 (1996).
35. Hernández-Pando, R. *et al.* Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* **356**, 2133–2138 (2000).
36. Cohen, S. B. *et al.* Alveolar macrophages provide an early *Mycobacterium tuberculosis* niche and initiate dissemination. *Cell Host Microbe* **24**, 439 (2018).
37. Sköld, M. & Behar, S. M. Tuberculosis Triggers a Tissue-Dependent Program of Differentiation and Acquisition of Effector Functions by Circulating Monocytes. *The Journal of Immunology* **181**, 6349–6360 (2008).
38. Hume, P. S. *et al.* Localization of Macrophages in the Human Lung via Design-based Stereology. *Am J Respir Crit Care Med* **201**, 1209–1217 (2020).

39. Guilliams, M. & Svedberg, F. R. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nat Immunol* **22**, 118–127 (2021).
40. Srivastava, S., Ernst, J. D. & Desvignes, L. Beyond macrophages: The diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunol Rev* **262**, 179–192 (2014).
41. Corleis, B. *et al.* Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cell Microbiol* **14**, (2012).
42. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (1979) **303**, 1532–1535 (2004).
43. Ramos-Kichik, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **89**, 29–37 (2009).
44. Filio-Rodríguez, G. *et al.* In vivo induction of neutrophil extracellular traps by *Mycobacterium tuberculosis* in a Guinea pig model. *Innate Immun* **23**, 625–637 (2017).
45. Braian, C., Hogeia, V. & Stendahl, O. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Neutrophil Extracellular Traps Activate Human Macrophages. *J Innate Immun* **5**, 591 (2013).
46. Saffarzadeh, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* **7**, (2012).
47. Upadhyay, S., Mittal, E. & Philips, J. A. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathog Dis* **76**, (2018).
48. Zuiga, J. *et al.* Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol* **2012**, 193923 (2012).
49. Kinsella, R. L. *et al.* Perspectives and Advances in the Understanding of Tuberculosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **16**, 377–408 (2021).

50. Weiss, G. & Schaible, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* **264**, 182–203 (2015).
51. Biswas, S. K., Chittechath, M., Shalova, I. N. & Lim, J. Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res* **53**, 11–24 (2012).
52. Marimani, M., Ahmad, A. & Duse, A. The role of epigenetics, bacterial and host factors in progression of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* **113**, 200–214 (2018).
53. Roy, S. *et al.* Transcriptional landscape of *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages. *Sci Rep* **8**, 6758 (2018).
54. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* **79**, 541–566 (2017).
55. Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A. & Khan, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflammation Research* **65**, 1–11 (2016).
56. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13 (2014).
57. Mishra, B. B. *et al.* Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 $\beta$ . *Nat Immunol* **14**, 52–60 (2013).
58. Kim, Y. S. *et al.* PPAR- $\alpha$  Activation Mediates Innate Host Defense through Induction of TFEB and Lipid Catabolism. *J Immunol* **198**, 3283–3295 (2017).
59. Peyron, P. *et al.* Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* **4**, (2008).
60. Knight, M., Braverman, J., Asfaha, K., Gronert, K. & Stanley, S. Lipid droplet formation in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages requires IFN-

- $\gamma$ /HIF-1 $\alpha$  signaling and supports host defense. *PLoS Pathog* **14**, e1006874 (2018).
61. Wilburn, K. M., Fieweger, R. A. & VanderVen, B. C. Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathog Dis* **76**, (2018).
  62. Allen, M. *et al.* Mechanisms of control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK cells: Role of glutathione. *Front Immunol* **6**, 508 (2015).
  63. Esin, S. & Batoni, G. Natural killer cells: a coherent model for their functional role in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Innate Immun* **7**, 11–24 (2015).
  64. Roy Chowdhury, R. *et al.* A multi-cohort study of the immune factors associated with *M. tuberculosis* infection outcomes. *Nature* **560**, 644–648 (2018).
  65. Dhiman, R. *et al.* IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing phagolysosomal fusion. *J Immunol* **183**, 6639–6645 (2009).
  66. Miller, J. L., Velmurugan, K., Cowan, M. J. & Briken, V. The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- $\alpha$ -mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog* **6**, e1000864 (2010).
  67. Cella, M. *et al.* A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* **457**, 722–725 (2009).
  68. Tailleux, L. *et al.* Constrained Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **170**, 1939–1948 (2003).

69. Giacomini, E. *et al.* Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* **166**, 7033–7041 (2001).
70. Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255–258 (2001).
71. Khader, S. A. *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* **203**, 1805 (2006).
72. Kim, J.-S. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* RpfB drives Th1-type T cell immunity via a TLR4-dependent activation of dendritic cells. *J Leukoc Biol* **94**, 733–749 (2013).
73. Gopal, R. *et al.* Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 Infection. *PLoS Pathog* **10**, e1004099 (2014).
74. Dorhoi, A., Reece, S. T. & Kaufmann, S. H. E. For better or for worse: The immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol Rev* **240**, 235–251 (2011).
75. Lin, M. L., Zhan, Y., Villadangos, J. A. & Lew, A. M. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* **86**, 353–362 (2008).
76. Watson, V. E. *et al.* Apoptosis in *mycobacterium tuberculosis* infection in mice exhibiting varied immunopathology. *J Pathol* **190**, 211–220 (2000).
77. Wolf, A. J. *et al.* Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 105–115 (2008).

78. Cooper, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology* vol. 27 393–422 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703> (2009).
79. Flynn, J. L., Chan, J. & Lin, P. L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol* **4**, 271–278 (2011).
80. North, R. J. & Jung, Y. J. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **22**, 599–623 (2004).
81. Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* **12**, 352–366 (2012).
82. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**, 591–619 (2009).
83. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227–242 (2013).
84. Attanasio, J. & Wherry, E. J. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* **44**, 1052–1068 (2016).
85. Sia, J. K. & Rengarajan, J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
86. Nunes-Alves, C. *et al.* In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature reviews. Microbiology* vol. 12 289–299 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrmicro3230> (2014).
87. Ernst, J. D. Mechanisms of *M. tuberculosis* Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. *Cell Host Microbe* **24**, 34–42 (2018).
88. Shimokata, K., Kishimoto, H., Takagi, E. & Tsunekawa, H. Determination of the T-cell subset producing gamma-interferon in tuberculous pleural effusion. *Microbiol Immunol* **30**, 353–361 (1986).

89. North, R. J. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection. *Cell Immunol* **7**, 166–176 (1973).
90. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol* **15**, 749–795 (1997).
91. Rosain, J. *et al.* Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update. *Immunol Cell Biol* **97**, 360–367 (2019).
92. Domingo-Gonzalez, R., Prince, O., Cooper, A. & Khader, S. A. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Microbiol Spectr* **4**, (2016).
93. Flynn, J. A. L. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* **2**, 561–572 (1995).
94. Caruso, A. M. *et al.* Mice Deficient in CD4 T Cells Have Only Transiently Diminished Levels of IFN- $\gamma$ , Yet Succumb to Tuberculosis. *The Journal of Immunology* **162**, 5407–5416 (1999).
95. Delahaye, J. L. *et al.* Cutting Edge: Bacillus Calmette–Guérin–Induced T Cells Shape Mycobacterium tuberculosis Infection before Reducing the Bacterial Burden. *The Journal of Immunology* **203**, 807–812 (2019).
96. Chávez-Galán, L. *et al.* Tuberculosis patients display a high proportion of CD8+ T cells with a high cytotoxic potential. *Microbiol Immunol* **63**, 316 (2019).
97. Lu, Y. J. *et al.* CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Cell Rep* **36**, (2021).
98. Lin, P. L. & Flynn, J. A. L. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunopathol* **37**, 239 (2015).

99. Canaday, D. H. *et al.* CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol* **167**, 2734–2742 (2001).
100. Jacobs, A. J., Mongkolsapaya, J., Sreaton, G. R., McShane, H. & Wilkinson, R. J. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **101**, 102–113 (2016).
101. Joosten, S. A. *et al.* Patients with Tuberculosis Have a Dysfunctional Circulating B-Cell Compartment, Which Normalizes following Successful Treatment. *PLoS Pathog* **12**, e1005687 (2016).
102. Kozakiewicz, L., Phuah, J., Flynn, J. & Chan, J. The Role of B Cells and Humoral Immunity in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Adv Exp Med Biol* **783**, 225 (2013).
103. Chan, J. *et al.* The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunol* **26**, 588–600 (2014).
104. Bao, Y. *et al.* Identification of IFN- $\gamma$ -producing innate B cells. *Cell Res* **24**, 161 (2014).
105. Daniel, T. M., Oxtoby, M. J., Pinto, E. & Moreno, E. The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease* **123**, 556–559 (1981).
106. Chakravarty, S. D. *et al.* Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infect Immun* **76**, 916–926 (2008).
107. Kim, M. J. *et al.* Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol Med* **2**, 258–274 (2010).
108. Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. & Dye, C. Tuberculosis. *Lancet* **362**, 887–899 (2003).

109. Davis, J. M. & Ramakrishnan, L. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell* **136**, 37–49 (2009).
110. Lugo-Villarino, G., Hudrisier, D., Benard, A. & Neyrolles, O. Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. *Front Immunol* **3**, 405 (2012).
111. Hwanga, E. H. *et al.* TLR2 contributes to trigger immune response of pleural mesothelial cells against Mycobacterium bovis BCG and M. tuberculosis infection. *Cytokine* **95**, 80–87 (2017).
112. Dlugovitzky, D. *et al.* Levels of interleukin-8 in tuberculous pleurisy and the profile of immunocompetent cells in pleural and peripheral compartments. *Immunol Lett* **55**, 35–39 (1997).
113. D'attilio, L. *et al.* The neuro-endocrine-immune relationship in pulmonary and pleural tuberculosis: A better local profile in pleural fluid. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **22**, 321–327 (2018).
114. Hoheisel, G. *et al.* Compartmentalization of pro-inflammatory cytokines in tuberculous pleurisy. *Respir Med* **92**, 14–17 (1998).
115. Flynn, J. A. L. *et al.* An essential role for interferon  $\gamma$  in resistance to mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine* **178**, 2249–2254 (1993).
116. Wang, J., Wakeham, J., Harkness, R. & Xing, Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *Journal of Clinical Investigation* **103**, 1023–1029 (1999).
117. KA, M. *et al.* Mycobacterium-mediated chemokine expression in pleural mesothelial cells: role of C-C chemokines in tuberculous pleurisy. *J Infect Dis* **178**, 1450–1456 (1998).

118. Nasreen, N., Mohammed, K. A., Ward, M. J. & Antony, V. B. Mycobacterium-induced transmesothelial migration of monocytes into pleural space: role of intercellular adhesion molecule-1 in tuberculous pleurisy. *J Infect Dis* **180**, 1616–1623 (1999).
119. Antony, V. B., Sahn, S. A., Antony, A. C. & Repine, J. E. Bacillus Calmette-Guérin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 1514 (1985).
120. Porcel, J. M. Tuberculous pleural effusion. *Lung* **187**, 263–270 (2009).
121. Besedovsky, H. O. & Del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. *Endocr Rev* **17**, 64–102 (1996).
122. Smith, S. M. & Vale, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.31887/dcns.2006.8.4/ssmith> (2006).
123. Oster, H. *et al.* The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocr Rev* **38**, 3–45 (2017).
124. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. & Rivier, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and  $\beta$ -endorphin. *Science (1979)* **213**, 1394–1397 (1981).
125. Antoni, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* **7**, 351–378 (1986).
126. DALLMAN, M. F. *et al.* Characterization of Corticosterone Feedback Regulation of ACTH Secretion. *Ann N Y Acad Sci* **512**, 402–414 (1987).

127. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* **32**, 81–151 (2011).
128. Lightman, S. L. & Conway-Campbell, B. L. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* **11**, 710–718 (2010).
129. Keller-Wood, M. E. & Dallman, M. F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* **5**, 1–24 (1984).
130. Engler, D. *et al.* Studies of the regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenal axis in sheep with hypothalamic-pituitary disconnection. li. evidence for in vivo ultradian hypersecretion of proopiomelanocortin peptides by the isolated anterior and intermediate pituitary. *Endocrinology* **127**, 1956–1966 (1990).
131. Webster, J. I., Tonelli, L. & Sternberg, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* **20**, 125–163 (2002).
132. Mueller, J. W., Gilligan, L. C., Idkowiak, J., Arlt, W. & Foster, P. A. The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. *Endocr Rev* **36**, 526–563 (2015).
133. Webb, S. J., Geoghegan, T. E., Prough, R. A. & Miller, K. K. M. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev* **38**, 89–116 (2006).
134. Clark, B. J., Prough, R. A. & Klinge, C. M. *Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone*. *Vitamins and Hormones* vol. 108 (Elsevier Inc., 2018).
135. Straub, R. H., Paimela, L., Peltomaa, R., Schölmerich, J. & Leirisalo-Repo, M. 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**, 654–662 (2002).
136. Loria, R. M., Inge, T. H., Cook, S. S., Szakal, A. K. & Regelson, W. Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Med Virol* **26**, 301–314 (1988).
137. Ben-Nathan, D., Padgett, D. A. & Loria, R. M. Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *J Med Microbiol* **48**, 425–431 (1999).
138. Araneo, B. & Daynes, R. Dehydroepiandrosterone functions as more than an antiglucocorticoid in preserving immunocompetence after thermal injury. *Endocrinology* **136**, 393–401 (1995).
139. Blauer, K. L., Poth, M., Rogers, W. M. & Bernton, E. W. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* **129**, 3174–3179 (1991).
140. Suzuki, T., Suzuki, N., Daynes, R. A. & Engleman, E. G. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* **61**, 202–211 (1991).
141. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**, 223–246 (2003).
142. Martínez-Taboada, V. *et al.* Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Mech Ageing Dev* **123**, 1477–1486 (2002).
143. Hammer, F. *et al.* Sex steroid metabolism in human peripheral blood mononuclear cells changes with aging. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6283–6289 (2005).

144. Hennebold, J. D. & Daynes, R. A. Regulation of macrophage dehydroepiandrosterone sulfate metabolism by inflammatory cytokines. *Endocrinology* **135**, 67–75 (1994).
145. Dluhy, R. G. The growing spectrum of HIV-related endocrine abnormalities. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* vol. 70 563–565 Preprint at <https://doi.org/10.1210/jcem-70-3-563> (1990).
146. Reincke, M. *et al.* Impairment of adrenocortical function associated with increased plasma tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations in African trypanosomiasis. *Neuroimmunomodulation* **1**, 14–22 (1994).
147. Rey, A. del *et al.* Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun* **21**, 171–179 (2007).
148. Cárdenas, G. *et al.* Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol* **42**, 171–176 (2012).
149. Rook, G. A. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **13**, 567–581 (1999).
150. Cherrington, A. D. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* **48**, 1198–1214 (1999).
151. Cruz-Topete, D. & Cidlowski, J. A. One hormone, two actions: Anti- And pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* **22**, 20–32 (2014).
152. Vegiopoulos, A. & Herzig, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* **275**, 43–61 (2007).

153. Nussinovitch, U., Freire de Carvalho, J., Maria R. Pereira, R. & Shoenfeld, Y. Glucocorticoids and the Cardiovascular System: State of the Art. *Curr Pharm Des* **16**, 3574–3585 (2010).
154. Cruz-Topete, D., Myers, P. H., Foley, J. F., Willis, M. S. & Cidlowski, J. A. Corticosteroids are essential for maintaining cardiovascular function in male mice. *Endocrinology* **157**, 2759–2771 (2016).
155. Farrell, C. & O’Keane, V. Epigenetics and the glucocorticoid receptor: A review of the implications in depression. *Psychiatry Res* **242**, 349–356 (2016).
156. De Alcubierre, D. *et al.* Glucocorticoids and cognitive function: a walkthrough in endogenous and exogenous alterations. *J Endocrinol Invest* (2023) doi:10.1007/S40618-023-02091-7.
157. Whirledge, S. D. *et al.* Generating diversity in human glucocorticoid signaling through a racially diverse polymorphism in the beta isoform of the glucocorticoid receptor. *Lab Invest* **97**, 1282–1295 (2017).
158. Fowden, A. L. & Forhead, A. J. Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. *Exp Physiol* **100**, 1477–1487 (2015).
159. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* **32**, 81–151 (2011).
160. Chan, S. & Debono, M. Review: Replication of cortisol circadian rhythm: New advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab* **1**, 129–138 (2010).
161. Dimitrov, S. *et al.* Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* **113**, 5134–5143 (2009).

162. Hu, X., Li, W.-P., Meng, C. & Ivashkiv, L. B. Inhibition of IFN- $\gamma$  Signaling by Glucocorticoids. *The Journal of Immunology* **170**, 4833–4839 (2003).
163. Wieggers, G. J. & Reul, J. M. H. M. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: Functional and pathological significance. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 317–321 (1998).
164. Cain, D. W. & Cidlowski, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* **17**, 233–247 (2017).
165. Gustafsson, J. A. Historical overview of nuclear receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **157**, 3–6 (2016).
166. Farman, N. & Rafestin-Oblin, M. E. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F181-92 (2001).
167. Reul, J. M. H. M. & De Kloet, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **117**, 2505–2511 (1985).
168. R. Oakley, J. C. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanism in Health and Disease. *J allergy clin immunol* **132**, 1033–1044 (2013).
169. Turner, J. D. *et al.* Transcriptional control of the glucocorticoid receptor : CpG islands , epigenetics and more. *Biochem Pharmacol* **80**, 1860–1868 (2010).
170. Presul, E., Schmidt, S., Kofler, R. & Helmberg, A. Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* **38**, 79–90 (2007).
171. Geng, C.-D. & Vedeckis, W. V. Steroid-Responsive Sequences in the Human Glucocorticoid Receptor Gene 1A Promoter. (2004) doi:10.1210/me.2003-0157.

172. Bockühl, Y. *et al.* Differential regulation and function of 5' untranslated GR-exon 1 transcripts. *Molecular Endocrinology* **25**, 1100–1110 (2011).
173. Zong, J., Ashraf, J. & Thompson, E. B. The promoter and first, untranslated exon of the human glucocorticoid receptor gene are GC rich but lack consensus glucocorticoid receptor element sites. *Mol Cell Biol* **10**, 5580 (1990).
174. Govindan, M. V., Pothier, F., Leclerc, S., Palaniswami, R. & Xie, B. Human glucocorticoid receptor gene promoter-homologous down regulation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 317–323 (1991).
175. LeClerc, S., Palaniswami, R., Xie, B. X. & Govindan, M. V. Molecular cloning and characterization of a factor that binds the human glucocorticoid receptor gene and represses its expression. *J Biol Chem* **266**, 17333–17340 (1991).
176. Webster, J. C., Oakley, R. H., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 6865–6870 (2001).
177. Geng, C. D., Schwartz, J. R. & Vedeckis, W. V. A conserved molecular mechanism is responsible for the auto-up-regulation of glucocorticoid receptor gene promoters. *Molecular Endocrinology* **22**, 2624–2642 (2008).
178. Burnstein, K. L., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 7284–7291 (1990).
179. Cao-Lei, L. *et al.* Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: Identification and analysis of alternative promoter regions. *Hum Genet* **129**, 533–543 (2011).

180. Bartlett, A. A., Lapp, H. E. & Hunter, R. G. Epigenetic Mechanisms of the Glucocorticoid Receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **30**, 807–818 (2019).
181. Kino, T. *et al.* Glucocorticoid Receptor (GR)  $\beta$  Has Intrinsic, GR $\alpha$ -independent Transcriptional Activity. *Biochem Biophys Res Commun* **381**, 671 (2009).
182. Lewis-Tuffin, L. J. & Cidlowski, J. A. The physiology of human glucocorticoid receptor  $\beta$  (hGR $\beta$ ) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* **1069**, 1–9 (2006).
183. Ray, D. W., Davis, J. R. E., White, A. & Clark, A. J. L. Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* **56**, 3276–3280 (1996).
184. De Lange, P. *et al.* Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res* **61**, 3937–3941 (2001).
185. Gaitan, D. *et al.* Glucocorticoid receptor structure and function in an adrenocorticotropin-secreting small cell lung cancer. *Mol Endocrinol* **9**, 1193–1201 (1995).
186. Patel, R., Williams-Dautovich, J. & Cummins, C. L. Minireview: New molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. *Molecular Endocrinology* **28**, 999–1011 (2014).
187. Jitrapakdee, S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **44**, 33–45 (2012).

188. Finsterwald, C. & Alberini, C. M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem* **112**, 17–29 (2014).
189. Perlstein, R. S., Whitnall, M. H., Abrams, J. S., Mougey, E. H. & Neta, R. Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *Endocrinology* **132**, 946–952 (1993).
190. Mikhaylova, I. V., Kuulasmaa, T., Jääskeläinen, J. & Voutilainen, R. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates steroidogenesis, apoptosis, and cell viability in the human adrenocortical cell line NCI-H295R. *Endocrinology* **148**, 386–392 (2007).
191. Engström, L. *et al.* Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology* **149**, 1436–1450 (2008).
192. Meduri, G. U. *et al.* Effects of methylprednisolone on intracellular bacterial growth. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 1156–1163 (2001).
193. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. **35**, 671–693 (2014).
194. Busillo, J. M. & Cidlowski, J. A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **24**, 109–119 (2013).
195. Perretti, M. & D'Acquisto, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **9**, 62–70 (2009).
196. Vago, J. P. *et al.* The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *J Immunol* **194**, 4940–4950 (2015).

197. Vago, J. P. *et al.* The Role and Effects of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper in the Context of Inflammation Resolution. *The Journal of Immunology* **194**, 4940–4950 (2015).
198. Liu, Y. *et al.* Glucocorticoids Promote Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *The Journal of Immunology* **162**, 3639–3646 (1999).
199. Heasman, S. J. *et al.* Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: Implications for the resolution of inflammation. *Journal of Endocrinology* **178**, 29–36 (2003).
200. McColl, A. *et al.* Glucocorticoids Induce Protein S-Dependent Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Human Macrophages. *The Journal of Immunology* **183**, 2167–2175 (2009).
201. Oakley, R. H., Webster, J. C., Sar, M., Parker, C. R. & Cidlowski, J. A. Expression and subcellular distribution of the  $\beta$ -isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology* **138**, 5028–5038 (1997).
202. Yudt, M. R. & Cidlowski, J. A. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* **16**, 1719–1726 (2002).
203. Li, L., Leung, D. Y. M., Hall, C. F. & Goleva, E. Divergent expression and function of glucocorticoid receptor  $\beta$  in human monocytes and T cells. *J Leukoc Biol* **79**, 818–827 (2006).
204. Oakley, R. H., Sar, M. & Cidlowski, J. A. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* **271**, 9550–9559 (1996).
205. Oakley, R. H., Jewell, C. M., Yudt, M. R., Bofetiado, D. M. & Cidlowski, J. A. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta

- isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* **274**, 27857–27866 (1999).
206. Charmandari, E. *et al.* The human glucocorticoid receptor (hGR)  $\beta$  isoform suppresses the transcriptional activity of hGR $\alpha$  by interfering with formation of active coactivator complexes. *Molecular Endocrinology* **19**, 52–64 (2005).
207. Min, J. *et al.* Probing Dominant Negative Behavior of Glucocorticoid Receptor  $\beta$  through a Hybrid Structural and Biochemical Approach. *Mol Cell Biol* **38**, (2018).
208. Bhavsar, P. *et al.* Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* **63**, 784–790 (2008).
209. Hew, M. *et al.* Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **174**, 134–141 (2006).
210. Hiraki, M. *et al.* Aberrant gene methylation is a biomarker for the detection of cancer cells in peritoneal wash samples from advanced gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* **18**, 3013–3019 (2011).
211. Sousa, A. R., Lane, S. J., Cidlowski, J. A., Staynov, D. Z. & Lee, T. H. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor  $\beta$ -isoform. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 943–950 (2000).
212. Bergeron, C. *et al.* Increased glucocorticoid receptor-beta expression, but not decreased histone deacetylase 2, in severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* vol. 117 703–705 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.1344> (2006).

213. Goecke, A. & Guerrero, J. Glucocorticoid receptor  $\beta$  in acute and chronic inflammatory conditions: Clinical implications. *Immunobiology* **211**, 85–96 (2006).
214. Orii, F. *et al.* Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 1286–94 (2002).
215. Piotrowski, P. *et al.* Glucocorticoid receptor beta splice variant expression in patients with high and low activity of systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem Cytobiol* **45**, 339–342 (2007).
216. Yan, X. B. *et al.* Alternative splicing in exon 9 of glucocorticoid receptor pre-mRNA is regulated by SRp40. *Mol Biol Rep* **37**, 1427–1433 (2010).
217. Xu, Q., Leung, D. Y. M. & Kisich, K. O. Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor  $\beta$  in neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 27112–27118 (2003).
218. Jain, A., Wordinger, R. J., Yorio, T. & Clark, A. F. Role of the Alternatively Spliced Glucocorticoid Receptor Isoform GR b in Steroid Responsiveness and Glaucoma. **30**, 121–127 (2014).
219. Tliba, O., Cidlowski, J. A. & Amrani, Y. CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform. *Mol Pharmacol* **69**, 588–596 (2006).
220. Buoso, E. *et al.* Role of spliceosome proteins in the regulation of glucocorticoid receptor isoforms by cortisol and dehydroepiandrosterone. *Pharmacol Res* **120**, 180–187 (2017).

221. Pinto, A. *et al.* DHEA modulates the effect of cortisol on RACK1 expression via interference with the splicing of the glucocorticoid receptor. *Br J Pharmacol* **172**, 2918–2927 (2015).
222. Lewis-Tuffin, L. J., Jewell, C. M., Bienstock, R. J., Collins, J. B. & Cidlowski, J. A. Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. *Mol Cell Biol* **27**, 2266–2282 (2007).
223. Kelly, A. *et al.* The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J Allergy Clin Immunol* **121**, (2008).
224. He, B., Cruz-Topete, D., Oakley, R. H., Xiao, X. & Cidlowski, J. A. Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Regulates Gluconeogenesis and Inflammation in Mouse Liver. *Mol Cell Biol* **36**, 714–730 (2016).
225. Ramos-ramírez, P. & Tliba, O. Glucocorticoid receptor  $\beta$  (GR $\beta$ ): Beyond its dominant-negative function. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
226. Marino, J. S. *et al.* Glucocorticoid receptor  $\beta$  induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* **291**, 25776–25788 (2016).
227. Hammond, G. L. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J Endocrinol* **230**, R13–R25 (2016).
228. Cooper, M. S. & Stewart, P. M. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4645–4654 (2009).
229. Stimson, R. H. *et al.* Cortisol release from adipose tissue by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in humans. *Diabetes* **58**, 46–53 (2009).

230. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic* vol. 13 364–374 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x> (2012).
231. Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P. R. & Agard, D. A. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* **157**, 1685–1697 (2014).
232. Smith, D. F. & Toft, D. O. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* **7**, 4–11 (1993).
233. Riggs, D. L. *et al.* The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J* **22**, 1158–1167 (2003).
234. Panettieri, R. A. *et al.* Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 38–49 (2019).
235. Kokkinopoulou, I. & Moutsatsou, P. Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
236. Schiller, B. J., Chodankar, R., Watson, L. C., Stallcup, M. R. & Yamamoto, K. R. Glucocorticoid receptor binds half sites as a monomer and regulates specific target genes. *Genome Biol* **15**, (2014).
237. Presman, D. M. *et al.* DNA binding triggers tetramerization of the glucocorticoid receptor in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 8236–8241 (2016).
238. Strahle, U., Klock, G. & Schutz, G. A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7871 (1987).
239. Yamamoto, K. R., Darimont, B. D., Wagner, R. L. & Iñiguez-Lluhí, J. A. Building transcriptional regulatory complexes: Signals and surfaces. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 587–598 (1998).

240. Hudson, W. H., Youn, C. & Ortlund, E. A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 53–58 (2013).
241. Surjit, M. *et al.* Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* **145**, 224–241 (2011).
242. Biddie, S. C., John, S. & Hager, G. L. Genome-wide mechanisms of nuclear receptor action. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 3–9 (2010).
243. John, S. *et al.* Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nature Genetics* vol. 43 264–268 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ng.759> (2011).
244. Reddy, T. E. *et al.* Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res* **19**, 2163–2171 (2009).
245. Ratman, D. *et al.* How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol* **380**, 41–54 (2013).
246. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* **24**, 488–522 (2003).
247. Revollo, J. R. & Cidlowski, J. A. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1179**, 167–178 (2009).
248. Lim, H. W. *et al.* Genomic redistribution of GR monomers and dimers mediates transcriptional response to exogenous glucocorticoid in vivo. *Genome Res* **25**, 836–844 (2015).

249. Hudson, W. H. *et al.* Cryptic glucocorticoid receptor-binding sites pervade genomic NF- $\kappa$ B response elements. *Nat Commun* **9**, (2018).
250. Sheppard, K. A. *et al.* Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* **273**, 29291–29294 (1998).
251. Bhandare, R. *et al.* Glucocorticoid receptor interacting protein-1 restores glucocorticoid responsiveness in steroid-resistant airway structural cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 9–15 (2010).
252. Weikum, E. R. *et al.* Tethering not required: The glucocorticoid receptor binds directly to activator protein-1 recognition motifs to repress inflammatory genes. *Nucleic Acids Res* **45**, 8596–8608 (2017).
253. Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K. & Baldwin, A. S. Role of Transcriptional Activation of I  $\kappa$  B ~ in Mediation of Immunosuppression by Glucocorticoids. *Science (1979)* **26**, 3–6 (1995).
254. Chakravarti, D. *et al.* Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**, 99–103 (1996).
255. Nicolaidis, N. C. *et al.* A novel point mutation of the human glucocorticoid receptor gene causes primary generalized glucocorticoid resistance through impaired interaction with the LXXLL motif of the p160 coactivators: dissociation of the transactivating and transrepressive activities. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, (2014).
256. Rao, N. A. S. *et al.* Coactivation of GR and NF $\kappa$ B alters the repertoire of their binding sites and target genes. *Genome Res* **21**, 1404–1416 (2011).
257. Morand, E. F. *et al.* Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* **76**, 195–202 (1995).

258. Perretti, M. *et al.* Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int* **24**, 163–174 (2000).
259. Mulla, A., LeRoux, C., Solito, E. & Buckingham, J. C. Correlation between the Antiinflammatory Protein Annexin 1 (Lipocortin 1) and Serum Cortisol in Subjects with Normal and Dysregulated Adrenal Function. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 557–562 (2005).
260. Goulding, N. J. *et al.* Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *The Lancet* **335**, 1416–1418 (1990).
261. Cristante, E. *et al.* Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 832–841 (2013).
262. Purvis, G. S. D., Chiazza, F., Collino, M., Solito, E. & Thiemermann, C. Endogenous Annexin-A1 is a Protective Determinant in HFD-induced Insulin Resistance and Diabetic Nephropathy. *The FASEB Journal* **31**, 853.3-853.3.
263. Yazid, S., Norling, L. V & Flower, R. J. Anti-inflammatory drugs, eicosanoids and the annexin A1/FPR2 anti-inflammatory system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **98**, 94–100 (2012).
264. Hayhoe, R. P. G. *et al.* Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood* **107**, 2123–2130 (2006).
265. Solito, E., Romero, I. A., Marullo, S., Russo-Marie, F. & Weksler, B. B. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular

- endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol* **165**, 1573–1581 (2000).
266. Côté, M. C. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. *J Biol Chem* **285**, 8013–8021 (2010).
267. Ng, F. S. P. *et al.* Annexin-1-deficient mice exhibit spontaneous airway hyperresponsiveness and exacerbated allergen-specific antibody responses in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy* **41**, 1793–1803 (2011).
268. D'Acquisto, F. *et al.* Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* **109**, 1095–1102 (2007).
269. Ayroldi, E. & Riccardi, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal* **23**, 3649–3658 (2009).
270. Beaulieu, E. & Morand, E. F. Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**, 340–348 (2011).
271. Bereshchenko, O., Migliorati, G., Bruscoli, S. & Riccardi, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper: A Novel Anti-inflammatory Molecule. *Front Pharmacol* **10**, 308 (2019).
272. Ronchetti S, Migliorati G, R. C. GILZ as a mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**, 170 (2015).
273. Tamura, T. *et al.* Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones stimulated with anti-CD3. Roles of protein tyrosine kinases in the signal for IL-2 and IL-4 production. *J Immunol* **155**, 4692–4701 (1995).
274. Lea, T., Rasmussen, A. M. & Michaelsen, T. E. Differentiation antigens in human T-cell activation: Evidence that anti-VH antibodies react with a membrane

- structure on human T Lymphocytes distinct from the antigens detected by monoclonal antibodies of the OKT and Leu series. *Cell Immunol* **81**, 209–218 (1983).
275. Cannarile, L. *et al.* Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines. **107**, 1039–1047 (2006).
276. Cohen, N. *et al.* GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* **107**, 2037–2044 (2006).
277. Benkhoucha, M. *et al.* Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells. *J Immunol* **193**, 2743–2752 (2014).
278. Zimmer, A. *et al.* A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 1020–1030 (2012).
279. Ricci, E. *et al.* Role of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene in dexamethasone-induced inhibition of mouse neutrophil migration via control of annexin A1 expression. *FASEB Journal* **31**, 3054–3065 (2017).
280. Sinars, C. R. *et al.* Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 868–873 (2003).
281. Smith, D. F. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress and Chaperones* vol. 9 109–121 Preprint at <https://doi.org/10.1379/CSC-31.1> (2004).

282. Wu, B. *et al.* 3D structure of human FK506-binding protein 52: Implication for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8348–8353 (2004).
283. Smith, D. F., Faber, L. E. & Toft, D. O. Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 3996–4003 (1990).
284. Sanchez, E. R. Hsp56: A novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 22067–22070 (1990).
285. Davies, T. H., Ning, Y. M. & Sánchez, E. R. A new first step in activation of steroid receptors. Hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 4597–4600 (2002).
286. Riggs, D. L. *et al.* The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J* **22**, 1158–1167 (2003).
287. Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R. & Pratt, W. B. Evidence that the Peptidylprolyl Isomerase Domain of the hsp90-binding Immunophilin FKBP52 is Involved in Both Dynein Interaction and Glucocorticoid Receptor Movement to the Nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14884–14889 (2001).
288. Vermeer, H., Hendriks-Stegeman, B. I., Van Der Burg, B., Van Buul-Offers, S. C. & Jansen, M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: A potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 277–284 (2003).

289. Zabel, U., Schreck, R. & Baeuerle, P. A. DNA binding of purified transcription factor NF- $\kappa$ B. Affinity, specificity, Zn<sup>2+</sup> dependence, and differential half-site recognition. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 252–260 (1991).
290. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF- $\kappa$ B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225–260 (1998).
291. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
292. Beinke, S. & Ley, S. C. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochemical Journal* **382**, 393–409 (2004).
293. Rajeevan, M. S. *et al.* Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes associated with chronic fatigue syndrome. *Genes Brain Behav* **6**, 167–176 (2007).
294. Xiao, G., Harhaj, E. W. & Sun, S. C. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* **7**, 401–409 (2001).
295. Lin, L., DeMartino, G. N. & Greene, W. C. Cotranslational biogenesis of NF- $\kappa$ B p50 by the 26S proteasome. *Cell* **92**, 819–828 (1998).
296. Bours, V. *et al.* The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through  $\kappa$ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* **72**, 729–739 (1993).
297. Fujita, T., Nolan, G. P., Liou, H. C., Scott, M. L. & Baltimore, D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* **7**, 1354–1363 (1993).
298. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2017 2:1 2**, 1–9 (2017).

299. Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280–288 (2004).
300. Gilmore, T. D. Introduction to NF- $\kappa$ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
301. Monaco, C. *et al.* Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5634–5639 (2004).
302. Shih, V. F.-S., Tsui, R., Caldwell, A. & Hoffmann, A. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* **21**, 86–102 (2011).
303. Poladian, N. *et al.* Role of NF- $\kappa$ B during Mycobacterium tuberculosis Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 1772 **24**, 1772 (2023).
304. Xia, A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Rv0927c Inhibits NF- $\kappa$ B Pathway by Downregulating the Phosphorylation Level of I $\kappa$ B $\alpha$  and Enhances Mycobacterial Survival. **12**, 1–11 (2021).
305. Ray, A. & Prefontaine, K. E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 752–756 (1994).
306. McKay, L. I. & Cidlowski, J. A. Cross-talk between nuclear factor- $\kappa$ B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* **12**, 45–56 (1998).
307. Deroo, B. J. & Archer, T. K. Glucocorticoid receptor activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  promoter within chromatin. *Mol Biol Cell* **12**, 3365–3374 (2001).

308. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A. & Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* (1979) **270**, 286–290 (1995).
309. Hayden, M. S., West, A. P. & Ghosh, S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* **25**, 6758–6780 (2006).
310. Zabel, U. & Baeuerle, P. A. Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* **61**, 255–265 (1990).
311. Nolan, G. P., Ghosh, S., Liou, H. C., Tempst, P. & Baltimore, D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* **64**, 961–969 (1991).
312. Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Ghosh, S. I $\kappa$ B- $\beta$  regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* **80**, 573–582 (1995).
313. Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. & Ghosh, G. I $\kappa$ B $\beta$ , but not I $\kappa$ B $\alpha$ , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* **276**, 45225–45235 (2001).
314. Inoue, J., Kerr, L. D., Kakizuka, A. & Verma, I. M. I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell* (1992).
315. Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R. & Israel, A. Promoter analysis of the gene encoding the I $\kappa$ B- $\alpha$ /MAD3 inhibitor of NF- $\kappa$ B: Positive regulation by members of the rel/NF- $\kappa$ B family. *EMBO Journal* **12**, 5043–5049 (1993).

316. Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W. & Greene, W. C. NF- $\kappa$ B controls expression of inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ : Evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* (1979) **259**, 1912–1915 (1993).
317. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science* (1979) **298**, 1241–1245 (2002).
318. Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K. & Baldwin, A. S. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**, 283–286 (1995).
319. Valovka, T. & Hottiger, M. O. p65 controls NF- $\kappa$ B activity by regulating cellular localization of I $\kappa$ B $\beta$ . *Biochem J* **434**, 253–263 (2011).
320. Tam, W. F. & Sen, R. I $\kappa$ B Family Members Function by Different Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7701–7704 (2001).
321. Huang, T. T. & Miyamoto, S. Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I kappa B alpha. *Mol Cell Biol* **21**, 4737–4747 (2001).
322. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 878–888 (2011).
323. Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-john, S. & Scheller, J. European Journal of Cell Biology The soluble Interleukin 6 receptor : Generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* **90**, 484–494 (2011).
324. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* **1**, 510–514 (2000).

325. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033–1036 (2003).
326. Hurst, S. M. *et al.* IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* **14**, 705–714 (2001).
327. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**, 16–34 (2011).
328. Ndlovu, 'Matladi N. *et al.* Hyperactivated NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **29**, 5488–5504 (2009).
329. Kang, S. H. *et al.* Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promoter. *J Biol Chem* **271**, 7330–7335 (1996).
330. Akira, S. *et al.* A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* **9**, 1897–1906 (1990).
331. Waage, A., Slupphaug, G. & Shalaby, R. Glucocorticoids inhibit the production of IL 6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* **20**, 2439–2443 (1990).
332. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7251–7255 (1987).
333. Chen, Q. *et al.* Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. *Nat Immunol* **7**, 1299–1308 (2006).

334. Rose-John, S. & Neurath, M. F. IL-6 trans-signaling: the heat is on. *Immunity* **20**, 2–4 (2004).
335. Atreya, R. *et al.* Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* **6**, 583–588 (2000).
336. M. Okada *et al.* BSF-2/IL-6 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *Int J Immunopharmacol* **10**, 131 (1988).
337. Dienz, O. & Rincon, M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol* **130**, 27–33 (2009).
338. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519–550 (2009).
339. Gery, I., Gershon, R. K. & Waksman, B. H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* **136**, 128–142 (1972).
340. Rosenstreich, D. L., Vogel, S. N., Jacques, A. R., Wahl, L. M. & Oppenheim, J. J. Macrophage sensitivity to endotoxin: genetic control by a single codominant gene. *J Immunol* **121**, 1664–1670 (1978).
341. Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M. & Garlanda, C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity* **50**, 778–795 (2019).
342. Liu, X. & Quan, N. Microglia and CNS interleukin-1: Beyond immunological concepts. *Front Neurol* **9**, 8 (2018).
343. Kostura, M. J. *et al.* Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5227–5231 (1989).
344. Thornberry, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* **356**, 768–774 (1992).

345. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
346. Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S. & Zhang, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci* **14**, 562 (2022).
347. Cogswell, J. P. *et al.* NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol* **153**, 712–723 (1994).
348. Zhang, W. *et al.* Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J Neuroimmunol* **174**, 63–73 (2006).
349. Zhang, G., Zhang, L. & Duff, G. W. A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1 $\beta$  gene. *DNA Cell Biol* **16**, 145–152 (1997).
350. Kasahara, T., Hooks, J. J., Dougherty, S. F. & Oppenheim, J. J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *The Journal of Immunology* **130**, 1784–1789 (1983).
351. Flaishon, L. *et al.* Autocrine secretion of interferon  $\gamma$  negatively regulates homing of immature B cells. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1381–1387 (2000).
352. Ohteki, T. *et al.* Interleukin 12-dependent interferon  $\gamma$  production by CD8 $\alpha$ + lymphoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **189**, 1981–1986 (1999).
353. Chan, S. H. *et al.* Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* **173**, 869–879 (1991).

354. Ye, J., Ortaldo, J. R., Conlon, K., Winkler-Pickett, R. & Young, H. A. Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol* **58**, 225–233 (1995).
355. Carson, W. E. *et al.* Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- $\gamma$  by natural killer cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 2578–2582 (1995).
356. Okamura, H. *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* **378**, 88–91 (1995).
357. Takeda, K. *et al.* Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* **8**, 383–390 (1998).
358. Nguyen, K. B. *et al.* Interferon  $\alpha/\beta$ -mediated inhibition and promotion of interferon  $\gamma$ : STAT1 resolves a paradox. *Nature Immunology* *2000 1:1* **1**, 70–76 (2000).
359. Matikainen, S. *et al.* IFN- $\alpha$  and IL-18 synergistically enhance IFN- $\gamma$  production in human NK cells: Differential regulation of Stat4 activation and IFN- $\gamma$  gene expression by IFN- $\alpha$  and IL-12. *Eur J Immunol* **31**, 2236–2245 (2001).
360. Cippitelli, M. *et al.* Negative transcriptional regulation of the interferon- $\gamma$  promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12548–12556 (1995).
361. Fenimore, J. & Young, H. A. Regulation of IFN-  $\gamma$  Expression. in 1–19 doi:10.1007/978-94-024-0921-5.
362. Ashwell, J. D., Lu, F. W. M. & Vacchio, M. S. Glucocorticoids in T Cell Development and Function. *Annu Rev Immunol* **18**, 309–345 (2000).

363. Mahuad, C. *et al.* Cortisol and dehydroepiandrosterone affect the response of peripheral blood mononuclear cells to mycobacterial antigens during tuberculosis. *Scand J Immunol* **60**, 639–646 (2004).
364. Medzhitov, R. The spectrum of inflammatory responses. *Science (1979)* **374**, 1070–1075 (2021).
365. Bailey, M. T. The contributing role of the intestinal microbiota in stressor-induced increases in susceptibility to enteric infection and systemic immunomodulation. *Horm Behav* **62**, 286–294 (2012).
366. Morris, M. C., Gilliam, E. A. & Li, L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol* **6**, 1–9 (2015).
367. Rossol, M. *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* **31**, 379–446 (2011).
368. Pizzolato, E. *et al.* Role of presepsin for the evaluation of sepsis in the emergency department. *Clin Chem Lab Med* **52**, 1395–1400 (2014).
369. D'attilio, L. *et al.* The neuro-endocrine-immune relationship in pulmonary and pleural tuberculosis: A better local profile in pleural fluid. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **22**, 321–327 (2018).
370. Díaz, A. *et al.* The clinical recovery of tuberculosis patients undergoing specific treatment is associated with changes in the immune and neuroendocrine responses. *Pathog Dis* **75**, (2017).
371. Dlugovitzky, D. *et al.* In vitro synthesis of interferon- $\gamma$ , interleukin-4, transforming growth factor- $\beta$  and interleukin- $1\beta$  by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: Relationship with the severity of pulmonary involvement. *Scand J Immunol* **49**, 210–217 (1999).

372. D'Attilio, L., Santucci, N., Bongiovanni, B., Bay, M. L. & Bottasso, O. Tuberculosis, the disrupted immune-endocrine response and the potential thymic repercussion as a contributing factor to disease physiopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 1–9 (2018).
373. Bozza, V. V. *et al.* 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**, 97–103 (2007).
374. Kumar, N. P., Moideen, K., Banurekha, V. V., Nair, D. & Babu, S. Plasma proinflammatory cytokines are markers of disease severity and bacterial burden in pulmonary tuberculosis. *Open Forum Infect Dis* **6**, ofz257 (2019).
375. Rao, S. & Bernhardt, V. Serum C-reactive protein in pulmonary tuberculosis: Correlation with bacteriological load and extent of disease. *Infectious Diseases in Clinical Practice* (2009) doi:10.1097/IPC.0b013e3181a4c73d.
376. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **12**, 1365–1371 (2006).
377. Vassallo, M., Mercié, P., Cottalorda, J., Ticchioni, M. & Dellamonica, P. *The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review.* (2012).
378. Zabs, A., Bird, M. D., Ramirez, L., Choudhry, M. A. & Kovacs, E. J. Anti-IL-6 antibody treatment but not IL-6 knockout improves intestinal barrier function and reduces inflammation after binge ethanol exposure and burn injury. *Shock* **39**, 373–9 (2013).
379. Shen, L. Tight junctions on the move: Molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci* **1258**, 9–18 (2012).

380. Regueiro, V. *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *European Respiratory Journal* **33**, 273–281 (2009).
381. Manco, M., Putignani, L. & Bottazzo, G. F. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocrine Reviews* vol. 31 817–844 Preprint at <https://doi.org/10.1210/er.2009-0030> (2010).
382. Pell, J. P., Tavernier, G. & Haw, S. A pilot study to explore whether airborne endotoxins play a role in the association between environmental tobacco smoke and non-respiratory, smoking-related diseases. *International Journal of Epidemiology* vol. 40 1128–1129 Preprint at <https://doi.org/10.1093/ije/dyq236> (2011).
383. Berkowitz, L. *et al.* Impact of cigarette smoking on the gastrointestinal tract inflammation: Opposing effects in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Frontiers in Immunology* vol. 9 1 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00074> (2018).
384. Zuo, L. *et al.* Cigarette smoking is associated with intestinal barrier dysfunction in the small intestine but not in the large intestine of mice. *J Crohns Colitis* **8**, 1710–1722 (2014).
385. Lin, H. H., Ezzati, M. & Murray, M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* **4**, 0173–0189 (2007).
386. Feruglio, S. L., Trøseid, M., Damås, J. K., Kvale, D. & Dyrhol-Riise, A. M. Soluble Markers of the Toll-Like Receptor 4 Pathway Differentiate between Active and

- Latent Tuberculosis and Are Associated with Treatment Responses. *PLoS One* **8**, e69896 (2013).
387. Juffermans, N. P. *et al.* Serum concentrations of lipopolysaccharide activity-modulating proteins during tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases* **178**, 1839–1842 (1998).
388. Raparelli, V. *et al.* Low-grade endotoxemia and platelet activation in cirrhosis. *Hepatology* **65**, 571–581 (2017).
389. Jayashree, B. *et al.* Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* **388**, 203–210 (2014).
390. Wiedermann, C. J. *et al.* Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: Prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol* **34**, 1975–1981 (1999).
391. Ghosh, S. *et al.* Elevated muscle TLR4 expression and metabolic endotoxemia in human aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **70**, 232–246 (2015).
392. Gallucci, G. *et al.* Increased levels of circulating LPS during Tuberculosis prevails in patients with advanced pulmonary involvement. *PLoS One* **16**, e0257214 (2021).
393. Pujols, L. *et al.* Expression of the human glucocorticoid receptor  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 49–57 (2001).
394. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. Ligand-Induced Repression of the Glucocorticoid Receptor Gene Is Mediated by an NCoR1 Repression Complex Formed by Long-Range Chromatin Interactions with Intragenic Glucocorticoid Response Elements. *Mol Cell Biol* **33**, 1711–1722 (2013).

395. D'Attlio, L. *et al.* 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**, 461–467 (2011).
396. Barnes, P. J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**, 636–645 (2013).
397. Timmermans, S., Souffriau, J. & Libert, C. A general introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol* **10**, (2019).
398. Coméra, C. & Russo-Marie, F. Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br J Pharmacol* **115**, 1043–1047 (1995).
399. Sheikh, M. H. & Solito, E. Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein. *Int J Mol Sci* **19**, 1–20 (2018).
400. Tzelepis, F. *et al.* Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Clinical Investigation* **125**, 752–768 (2015).
401. Vanessa, K. H. Q. *et al.* Absence of Annexin A1 impairs host adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis in vivo. *Immunobiology* **220**, 614–623 (2015).
402. Cannarile, L., Delfino, D. V., Adorisio, S., Riccardi, C. & Ayroldi, E. Implicating the Role of GILZ in Glucocorticoid Modulation of T-Cell Activation. *Front Immunol* **10**, 1823 (2019).
403. Ayroldi, E. *et al.* Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B. *Blood* **98**, 743–753 (2001).

404. Berrebi, D. *et al.* Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: An anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* **101**, 729–738 (2003).
405. Eddleston, J., Herschbach, J., Wagelie-Steffen, A. L., Christiansen, S. C. & Zuraw, B. L. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 115–122 (2007).
406. Jones, S. A. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) inhibits B cell activation in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **75**, 739–747 (2016).
407. Sevilla, L. M. & Pérez, P. Glucocorticoids and Glucocorticoid-Induced-Leucine-Zipper (GILZ) in Psoriasis. *Front Immunol* **10**, 1–9 (2019).
408. Kondylis, V., Kumari, S., Vlantis, K. & Pasparakis, M. The interplay of IKK, NF- $\kappa$ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews* vol. 277 113–127 Preprint at <https://doi.org/10.1111/imr.12550> (2017).
409. Afonina, I. S., Zhong, Z., Karin, M. & Beyaert, R. Limiting inflammation - The negative regulation of NF- $\kappa$ B and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* **18**, 861–869 (2017).
410. Stechschulte, L. A. & Sanchez, E. R. FKBP51 - A selective modulator of glucocorticoid and androgen sensitivity. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 11 332–337 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.04.012> (2011).
411. Jääskeläinen, T., Makkonen, H. & Palvimo, J. J. Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 326–331 (2011).

412. Zgajnar, N. R., Daneri-Becerra, C., Cauerhff, A. & Galigniana, M. D. The Scaffold Immunophilin FKBP51 Is a Phosphoprotein That Undergoes Dynamic Mitochondrial-Nuclear Shuttling. *Cells* **11**, (2022).
413. Galigniana, N. M. *et al.* Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51. *J Neurochem* **122**, 4–18 (2012).
414. Sivils, J. C., Storer, C. L., Galigniana, M. D. & Cox, M. B. Regulation of steroid hormone receptor function by the 52-kDa FK506-binding protein (FKBP52). *Current Opinion in Pharmacology* vol. 11 314–319 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.03.010> (2011).
415. Vermeer, H. *et al.* An *in vitro* bioassay to determine individual sensitivity to glucocorticoids: Induction of FKBP51 mRNA in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Cell Endocrinol* **218**, 49–55 (2004).
416. Deeks, S. G., Lewin, S. R. & Havlir, D. V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet* vol. 382 1525–1533 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61809-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61809-7) (2013).
417. DeRijk, R. H., Eskandari, F. & Sternberg, E. M. Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J Neuroimmunol* **151**, 180–188 (2004).
418. Perrin, A. J., Horowitz, M. A., Roelofs, J., Zunszain, P. A. & Pariante, C. M. Glucocorticoid resistance: Is it a requisite for increased cytokine production in depression? A systematic review and meta-analysis. *Front Psychiatry* **10**, (2019).

419. Miller, A. H. *et al.* Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell Immunol* **186**, 45–54 (1998).
420. Yehuda, R., Golier, J. A., Yang, R.-K. & Tischler, L. Enhanced sensitivity to glucocorticoids in peripheral mononuclear leukocytes in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* **55**, 1110–1116 (2004).
421. Gallucci, G. *et al.* Differential expression of genes regulated by the glucocorticoid receptor pathway in patients with pulmonary tuberculosis. *Life Sci* **301**, (2022).
422. D’Cruz D. Principles of Corticosteroid Therapy. *Soc Med.* **96**, (2003).
423. Bottasso, O. Chronic Infections and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis in the Context of Immune-Mediated Inflammation. *Adv Neuroimmune Biol* **7**, 79–89 (2018).
424. Cutolo, M. & Straub, R. H. Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. *Arthritis research & therapy* vol. 11 218 Preprint at <https://doi.org/10.1186/ar2630> (2009).
425. Norbiato, G., Galli, M., Righini, V. & Moroni, M. The syndrome of acquired glucocorticoid resistance in HIV infection. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **8**, 777–787 (1994).
426. Vandewalle, J. & Libert, C. Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. *Front Immunol* **11**, 1318 (2020).
427. Cohen, J. *et al.* Glucocorticoid Sensitivity Is Highly Variable in Critically Ill Patients With Septic Shock and Is Associated With Disease Severity. *Crit Care Med* **44**, 1034–1041 (2016).
428. Guerrero, J., Gatica, H. A., Rodríguez, M., Estay, R. & Goecke, I. A. Septic serum induces glucocorticoid resistance and modifies the expression

- of glucocorticoid isoforms receptors: a prospective cohort study and in vitro experimental assay. *Crit Care* **17**, R107 (2013).
429. Bergquist, M. *et al.* Glucocorticoid receptor function is decreased in neutrophils during endotoxic shock. *J Infect* **69**, 113–122 (2014).
430. Mitra, D. K. *et al.* Polarized helper T cells in tubercular pleural effusion: phenotypic identity and selective recruitment. *Eur J Immunol* **35**, 2367–2375 (2005).
431. Schierloh, P. *et al.* 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**, 5325–5337 (2007).
432. Schierloh, P. *et al.* NK cells from tuberculous pleurisy express high ICAM-1 levels and exert stimulatory effect on local T cells. *Eur J Immunol* **39**, 2450–2458 (2009).
433. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675–680 (2001).
434. Lowe, D. M., Redford, P. S., Wilkinson, R. J., O'Garra, A. & Martineau, A. R. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol* **33**, 14–25 (2012).
435. Dillon, J. S. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: Their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 377–385 (2005).
436. Kroboth, P. D., Salek, F. S., Pittenger, A. L., Fabian, T. J. & Frye, R. F. DHEA and DHEA-S: A review. *J Clin Pharmacol* **39**, 327–348 (1999).
437. Cai, Y. *et al.* Single-cell immune profiling reveals functional diversity of T cells in tuberculous pleural effusion. *Journal of Experimental Medicine* **219**, (2022).

438. Serrano Cardona, L. & Muñoz Mata, E. Paraninfo Digital. *Early Hum Dev* **83**, 1–11 (2013).
439. Fernández, R. D. V. *et al.* Evidence for a More Disrupted Immune-Endocrine Relation and Cortisol Immunologic Influences in the Context of Tuberculosis and Type 2 Diabetes Comorbidity. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 126 (2020).