



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

**INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA  
TUBERCULOSIS**  
**ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES**

ESTELA ISABEL BINI

Director de Tesis: **Dr. Oscar Bottasso**

Co-Director: **Dr. Rogelio Hernández-Pando**

Rosario, Septiembre de 2015

**INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS  
ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES**

**Estela Isabel Bini**

**Licenciada en Ciencias Biológicas de la  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Universidad de Buenos Aires**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional de Rosario.

No ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IdICER, CONICET), y en el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Dr Salvador Zubirán”, Distrito Federal, México.

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ÍNDICE</b>  | <b>I</b>    |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>VI</b>   |
| <b>RESUMEN</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>SUMMARY</b>   | <b>XI</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | <b>XIII</b> |
| <b>NOTA</b>  | <b>XIV</b>  |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b>  | <b>2</b>    |
| <b>1-1 La Tuberculosis</b>   | <b>2</b>    |
| 1-1.1 Historia de la Tuberculosis  | 2           |
| 1-1.1.1 La Tuberculosis en tiempos primitivos                            | 2           |
| 1-1.1.2 Phthisis o Consunción  | 3           |
| 1-1.1.3 La Plaga Blanca  | 3           |
| 1-1.1.4 El descubrimiento del bacilo                                     | 5           |
| 1-1.2 La Tuberculosis: una enfermedad de emergencia global               | 6           |
| 1-1.3 Agente causal  | 7           |
| 1-1.4 Diseminación y Transmisión de la Tuberculosis                      | 9           |
| 1-1.5 Eventos durante la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 10          |
| 1-1.6 Tratamiento de la TB   | 13          |
| <b>1-2 La Reacción defensiva a grandes rasgos</b>                        | <b>14</b>   |
| <b>1-3 El Sistema Endócrino</b>  | <b>14</b>   |
| 1-3.1 El Hipotálamo  | 15          |
| 1-3.2 Vías de Señalización Neuroendócrina                                | 15          |
| 1-3.2.1.1 Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal                             | 17          |
| 1-3.2.1.2 Cortisol y Corticosterona                                      | 17          |
| 1-3.2.1.3 DHEA   | 17          |
| 1-3.2.2 Eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal                               | 18          |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| 1-3.2.2.1   | GNRH   | 18 |
| 1-3.2.2.2   | Gonadotrofinas (FSH y LH)  | 19 |
| 1-3.2.2.3   | Expresión de Receptores de Hormonas<br>Esteroides Gonadales en células inmunes   | 19 |
| 1-3.3       | El Sistema Endócrino en la Tuberculosis  | 20 |
| 1-4         | El Sistema Inmune  | 22 |
| 1-4.1       | Respuesta inmune protectora contra la TB   | 23 |
| 1-4.2       | Participación de Células y Citoquinas del Sistema<br>inmune durante la TB. Influencia de las hormonas<br>sexuales sobre las mismas | 23 |
| 1-4.2.1     | Protección constitutiva e inmunidad innata<br>contra TB  | 24 |
| 1-4.2.1.1   | Neutrófilos  | 25 |
| 1-4.2.1.2   | Macrófagos (MØ)  | 25 |
| 1-4.2.1.2.1 | Maduración del Fagosoma  | 26 |
| 1-4.2.1.2.2 | Papel del Óxido Nítrico (ON) en la<br>infección micobacteriana   | 27 |
| 1-4.2.1.2.3 | Influencia de las hormonas sexuales<br>sobre los macrófagos  | 28 |
| 1-4.2.1.3   | Células Dendríticas (DC)   | 29 |
| 1-4.2.1.3.1 | Influencia de las hormonas sexuales<br>sobre las DC  | 30 |
| 1-4.2.2     | Inmunidad Adaptativa   | 31 |
| 1-4.2.2.1   | Linfocitos T CD4+ y CD8+   | 31 |
| 1-4.2.2.1.1 | Influencia de las hormonas sexuales<br>sobre las células T   | 33 |
| 1-4.2.3     | Citocinas  | 34 |
| 1-4.2.3.1   | TNF $\alpha$   | 34 |
| 1-4.2.3.2   | IL-1 $\beta$   | 34 |
| 1-4.2.3.3   | IL-6   | 35 |
| 1-4.2.3.4   | IL-12  | 35 |
| 1-4.2.3.5   | IL-18  | 36 |
| 1-4.2.3.6   | IL-2   | 36 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1-4.2.3.7 IFN $\gamma$   | 36        |
| 1-4.2.3.8 IL-10  | 37        |
| 1-4.2.3.9 IL-4   | 37        |
| 1-4.2.3.10 IL-17   | 37        |
| 1-4.2.3.11 IL-23   | 38        |
| 1-4.2.3.12 IL-27   | 38        |
| 1-4.2.3.13 TGF- $\beta$  | 38        |
| <b>1-5 Justificación del presente Trabajo de Tesis</b>   | <b>38</b> |
| <br>   |           |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | <b>42</b> |
| 2-1 OBJETIVO GENERAL   | 42        |
| 2-2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 42        |
| 2-2.1 En el modelo experimental  | 42        |
| 2-2.2 En la infección en el hombre   | 42        |
| <br>   |           |
| <b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>44</b> |
| 3-1 EL MODELO EXPERIMENTAL   | 44        |
| 3-1.1 Organización e infección de los grupos<br>experimentales   | 44        |
| 3-1.2 Preparación del tejido pulmonar para análisis<br>histológico y morfometría.  | 45        |
| 3-1.3 Determinación de unidades formadoras de colonias<br>(UFC) en pulmones infectados   | 46        |
| 3-1.4 Análisis de citocinas presentes en los homogenatos<br>de pulmón por PCR en Tiempo Real   | 46        |
| 3-1.5 Cinética de la concentración de testosterona en el<br>suero y el efecto de la castración de ratones machos<br>durante la Enfermedad Progresiva Tardía. | 47        |
| 3-2 LA INFECCION EN EL HOMBRE  | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3-2.1 Grupos de Estudio  | 48        |
| 3-2.1.1 Pacientes con TB Pulmonar  | 48        |
| 3-2.1.2 Voluntarios Sanos (H-Co)   | 48        |
| 3-2.2 Determinación de hormonas y citocinas en plasma  | 49        |
| 3-2.3 Detección de citocinas por inmunohistoquímica en muestras de testículos  | 49        |
| 3-2.3.1 Cortes de Necropsias   | 49        |
| 3-2.3.2 Anticuerpos utilizados   | 50        |
| 3-2.4 Producción de Testosterona <i>in vitro</i> , por células de Leydig pre-incubadas con citocinas   | 50        |
| <b>3-3 Análisis Estadístico</b>  | <b>51</b> |
| 3-3.1 En el modelo murino  | 51        |
| 3-3.2 En los estudios clínicos   | 51        |
| <br>   |           |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | <b>54</b> |
| <br>   |           |
| <b>4-1 EN EL MODELO MURINO</b>   | <b>54</b> |
| 4-1.1 Efecto del género y la castración en ratones sobre la supervivencia y el número de bacterias luego de la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 54        |
| 4-1.2 Efecto del género y la castración sobre la respuesta inflamatoria durante la Tuberculosis pulmonar experimental  | 55        |
| 4-1.3 Expresión genética de citocinas en los ratones infectados  | 57        |
| 4-1.4 Concentración de testosterona en el suero y efecto de la castración durante la enfermedad avanzada   | 58        |
| <b>4-2 EN LA INFECCIÓN EN EL HOMBRE</b>  | <b>60</b> |
| 4-2.1 Medición de hormonas y citocinas en plasma   | 61        |
| 4-2.2 Hallazgos histológicos e inmunohistoquímica en muestras de testículos  | 63        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4-2.3 Producción de Testosterona por células de Leydig<br/>expuestas a diferentes citocinas</b> | <b>66</b> |
| <b>5 DISCUSIÓN</b>   | <b>68</b> |
| <b>5-1 EN EL MODELO MURINO</b>   | <b>68</b> |
| <b>5-2 EN LA INFECCIÓN EN EL HOMBRE</b>  | <b>71</b> |
| <b>6 CONCLUSIONES</b>  | <b>76</b> |
| <b>7 REFERENCIAS</b>   | <b>80</b> |

**ABREVIATURAS**

**ACTH:** Hormona Adrenocorticotrofa

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**Ag:** Antígeno

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**BAL:** Lavado Bronquioalveolar

**BCG:** Bacilo Calmette-Guerin

**CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**CPA:** Células Presentadoras de Antígenos

**CRH:** Hormona Liberadora de Corticotrofina

**DC:** Células Dendríticas

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**DHEAS:** Dehidroepiandrosterona sulfato

**ER:** Receptor de Estrógenos

**FcR $\gamma$ :** Receptores para Fc $\gamma$  de la IgG

**FSH:** Hormona Foliculoestimulante

**GM-CSF:** Factor Estimulante de Colonias Granulocito/Macrófago

**GnRH o LHRH:** Hormona Liberadora de Gonadotrofina

**HHA:** Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal

**HHG:** Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal

**HHT:** Eje Hipotálamo-Hipofisario-Tiroideo

**VIH/SIDA:** Virus de la Inmunodeficiencia humana

**HMGB1:** High Mobility Group Box 1

**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma

**Ig:** Inmunoglobulina



**IL:** Interleuquina

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible

**IRO:** Intermediarios reactivos de oxígeno

**LAM:** Lipoarabinomanano

**LB:** Linfocitos B

**LH:** Hormona Luteinizante

**LPS:** Lipopolisacárido

**LT:** Linfocitos T

**mARN:** Ácido Ribonucleico mensajero

**MDR-TB:** Multidrogo Resistente a las drogas

**MØ:** Macrófagos

**MØA:** Macrófagos Alveolares

**Mtb:** Mycobacterium tuberculosis (M tuberculosis),

**NFκB:** Factor Nucleolar κ B

**NK :** Natural Killer

**nNOS:** Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal

**NO:** Óxido Nítrico

**NOS:** Óxido Nítrico Sintetasa

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAMP:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

**POMC:** Proopiomelanocortina

**PPD:** Proteínas purificadas derivadas de *Mtb*

**PR:** Receptor de Progesterona

**PRR:** Receptores de Reconocimiento de Patrones

**RFA:** Respuesta de Fase Aguda

**R-GnRH:** Receptor de Hormona Liberadora de Gonadotropina

## ABREVIATURAS

**TB:** Tuberculosis

**TCR:** Receptor de células T

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**Th1 o Th2** Células T *helper* tipo 1 o 2

**TLR:** Receptores símil Toll

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**Treg:** células T reguladoras

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**XDR-TB:** Extremadamente resistente a las drogas

**RESUMEN**

La relación entre hombres y mujeres en cuanto al padecimiento de la tuberculosis pulmonar es 7/3 a favor de los primeros. Las hormonas sexuales pueden ser un factor a tener en cuenta en esta diferencia, dado los efectos inhibitorios de la testosterona sobre la activación de macrófagos y la producción de citocinas pro-inflamatorias, mientras que los estrógenos son más proclives a inducir la producción de estos mediadores. En función de estas cuestiones, en una primera etapa el presente trabajo de tesis estuvo orientado a comparar la evolución de la tuberculosis en ratones machos y hembras en base a la utilización de un modelo de enfermedad progresiva. Ratones BALB/c, machos y hembras se asignaron al azar en dos grupos: castrados o con operación simulada y se infectaron por vía intratraqueal con una alta dosis de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Los ratones fueron sacrificados a diferentes momentos y en sus pulmones se determinaron la carga bacilar, la reacción inflamatoria, expresión de ARN mensajeros para diferentes citocinas, la supervivencia y niveles de testosterona en suero. Los ratones machos no castrados mostraron mayor mortalidad y carga bacilar durante la enfermedad avanzada respecto de las hembras y machos castrados. En comparación con los machos sin manipular, las hembras y machos castrados mostraron una mayor inflamación en todos los compartimentos de pulmón, como así también una reacción granulomatosa y desarrollo de neumonía más precoz, mientras que entre los orquitectomizados y las hembras no hubo diferencias significativas. Las hembras y machos castrados mostraron una mayor expresión de mRNA para TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12, iNOS e IL-17 respecto de los machos no castrados, durante el primer mes de la infección. Los niveles de testosterona de los machos se hallaron aumentados durante la infección tardía. La orquitectomía al día 60 post-infección produjo una disminución significativa de la carga bacilar en coexistencia con una mayor expresión de TNF $\alpha$ , IL-12 e IFN $\gamma$ . Resulta claro que en el modelo analizado, los ratones machos resultaron más susceptibles a la tuberculosis y este fenómeno fue revertido por la castración lo cual habla del rol de la testosterona en este déficit de la respuesta defensiva.

La lógica para el estudio en pacientes tuberculosos se contextualizó en torno a la naturaleza crónica de la tuberculosis y la reacción inflamatoria acompañante la cual está implicada en una serie de cambios metabólicos e inmuno-endócrinos típicos de la

enfermedad. Para profundizar en torno a esta problemática nos propusimos explorar en primer término las variaciones en cuanto a los componentes del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y su relación con las citocinas claramente inmunopatológicas en tuberculosis, en pacientes varones con enfermedad activa. Se utilizaron muestras de plasma de 36 casos no tratados con TB pulmonar, HIV negativos en quienes se determinaron los niveles de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TGF-}\beta$ , IL-6, cortisol, dehidroepiandrosterona, testosterona, progesterona, estradiol, hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (por ELISA), en simultáneo con 21 voluntarios sanos sin contacto con pacientes tuberculosos y edad similar (media general  $40 \pm 16.8$  años, desvío estándar). Los pacientes mostraron disminución de los niveles de testosterona en presencia de altas cantidades de LH, junto con concentraciones aumentadas de  $\text{IFN}\gamma$ , IL-6 y  $\text{TGF-}\beta$ . Dado que esta disociación entre LH elevada y testosterona descendida sugería la existencia de algún fenómeno inhibitorio a nivel gonadal, se procesaron muestras histológicas testiculares de necropsias de pacientes que mueren de tuberculosis para la inmunomarcación de IL-1 $\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 e  $\text{IFN}\gamma$ , habida cuenta que estas citocinas podría interferir con la síntesis de esteroides. Secciones histológicas testiculares mostraron abundante presencia de IL-1 $\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 e  $\text{IFN}\gamma$  en macrófagos intersticiales, células de Sertoli y algunas espermatogonias.

A partir de esta evidencia se decidió trabajar con células de Leydig murinas (línea celular TM3) la cual fue expuesta a diferentes concentraciones de citocinas de ratón relevantes en la inmunopatología de la tuberculosis como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$   $\text{TGF-}\beta$ . En el tratamiento *in vitro* de células de Leydig con estas citocinas condujo a una notable reducción de la producción de testosterona. Ello pone de relieve las implicancias de la respuesta inflamatoria sobre la síntesis de esteroides gonadales con todas las eventuales repercusiones que esto podría tener en torno a las acciones de este andrógeno sea como hormona anti-inflamatoria, inmunomoduladora, anabólica y obviamente de la reproducción.

## SUMMARY

The relation between men and women suffering pulmonary tuberculosis is 7/3 in favor to males. Sex hormones could be a significant factor for this difference, considering that testosterone impairs macrophage activation and pro-inflammatory cytokine production, while estrogens are a proinflammatory mediator inducer. The aim of this work was to initially compare the evolution of tuberculosis in male and female mice using a model of progressive disease. BALB/c mice, male and female were randomized into two groups: castrated or sham-operated, and infected by the intratracheal route with a high dose of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Mice were euthanized at different time points and in their lungs were determined bacilli loads, inflammation, cytokines expression, survival and testosterone levels in serum. Non-castrated male mice showed significant higher mortality and bacilli burdens during late disease than female and castrated male animals. Compared to males, females and castrated males exhibited significant higher inflammation in all lung compartments, earlier formation of granulomas and pneumonia, while between castrated and non-castrated females there were not significant differences. Females and castrated males expressed significant higher TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12, iNOS and IL-17 than non-castrated males during the first month of infection. Serum Testosterone of males showed higher concentration during late infection. Orchidectomy at day 60 post-infection produced a significant decrease of bacilli burdens in coexistence with higher expression of TNF $\alpha$ , IL-12 and IFN $\gamma$ . Thus, male mice are more susceptible to tuberculosis than females and this was prevented by castration suggesting that testosterone could be a tuberculosis susceptibility factor.

The background for the human study was based on the chronic nature of tuberculosis and the accompanying inflammatory reaction which seems to be implied in a series of metabolic and immune-endocrine changes characteristics of the disease. To expand our knowledge on this subject, we first explored components from the hypothalamous-pituitary-gonadal axis and their relationship with cytokines involved in disease immunopathology, in male TB patients. Plasma samples from 36 active untreated pulmonary TB male patients were used to assess TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-6, cortisol, dehydroepiandrosterone, testosterone, progesterone, estradiol, luteinizing hormone (LH)

## SUMMARY

and follicle-stimulating hormone (by ELISA). Healthy controls corresponded to 21 volunteers without contact with TB patients and similar age (overall age  $40 \pm 16.8$  years, standard deviation). Patients showed decreased levels of testosterone in presence of high amounts of LH, together with augmented  $\text{IFN}\gamma$ , IL-6 and TGF- $\beta$  levels. Since such LH/testosterone dissociation was likely to imply some form of local inhibition (i.e., cytokines) on testosterone synthesis, testicular histological samples from necropsies of patients dying from TB were immune-stained for IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 and  $\text{IFN}\gamma$ . Testicular histological sections showed abundant presence of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 and  $\text{IFN}\gamma$  in interstitial macrophages, Sertoli cells and some spermatogonia.

According to this, the TM3 mouse Leydig cell line was incubated with mouse recombinants of TNF $\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  and TGF- $\beta$ . Supernatants were collected and used to measure testosterone by ELISA. *In vitro* treatment of Leydig cells with these cytokines led to a remarkable reduction of testosterone production. This highlights the implication of the inflammatory reaction on the synthesis of gonadal steroids and the eventual repercussion in physiological terms given the several effects of this androgen: anti-inflammation, immune-modulation, anabolism and reproduction.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los que me acompañaron en este fantástico y bizarro camino,

ha sido un honor, un privilegio y una pasión desandarlos juntos.

## **NOTA:**

El presente trabajo de tesis dió lugar a la escritura de dos publicaciones en revistas científicas.

La primera, en **PLoS One**, de la cual se adjunta a continuación el pdf del artículo publicado:

Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AF, Zatarain ZL, Alfonseca E, Pardo MR, Bottasso O, Hernández Pando R.

**“The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis”.**

PLoS One. 2014 Apr 10; 9(4):e93831. doi: 10.1371/journal.pone.0093831. eCollection 2014.

La segunda, recientemente aceptada para publicación, en **Tuberculosis**, de la cual se adjunta a continuación el pdf final corregido y aceptado:

Bini Estela Isabel, D’Attilio Luciano, Marquina-Castillo Brenda, Mata-Espinosa Dulce, Díaz Ariana, Marquez-Velasco Ricardo, Gamboa-Domínguez Armando, Bay Maria Luisa, Hernández- Pando Rogelio, Bottasso Oscar.

**“The implication of pro-inflammatory cytokines in the impaired production of gonadal androgens by patients with pulmonary tuberculosis”.**





# The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis

Estela Isabel Bini<sup>1,2</sup>, Dulce Mata Espinosa<sup>1</sup>, Brenda Marquina Castillo<sup>1</sup>, Jorge Barrios Payán<sup>1</sup>, Darío Colucci<sup>2</sup>, Alejandro Francisco Cruz<sup>1</sup>, Zyanya Lucía Zatarain<sup>1</sup>, Edgar Alfonseca<sup>1</sup>, Marta Romano Pardo<sup>3</sup>, Oscar Bottasso<sup>2</sup>, Rogelio Hernández Pando<sup>1\*</sup>

**1** Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", México City, México, **2** Immunology Institute, Medical Sciences Faculty, Santa Fe, Rosario, Argentina, **3** Physiology and Biophysic Department, CINVESTAV, Mexico City, Mexico

## Abstract

The relation between men and women suffering pulmonary tuberculosis is 7/3 in favor to males. Sex hormones could be a significant factor for this difference, considering that testosterone impairs macrophage activation and pro-inflammatory cytokines production, while estrogens are proinflammatory mediator's inducer. The aim of this work was to compare the evolution of tuberculosis in male and female mice using a model of progressive disease. BALB/c mice, male and female were randomized into two groups: castrated or sham-operated, and infected by the intratracheal route with a high dose of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Mice were euthanized at different time points and in their lungs were determined bacilli loads, inflammation, cytokines expression, survival and testosterone levels in serum. Non-castrated male mice showed significant higher mortality and bacilli burdens during late disease than female and castrated male animals. Compared to males, females and castrated males exhibited significant higher inflammation in all lung compartments, earlier formation of granulomas and pneumonia, while between castrated and non-castrated females there were not significant differences. Females and castrated males expressed significant higher TNF- $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL12, iNOS and IL17 than non-castrated males during the first month of infection. Serum Testosterone of males showed higher concentration during late infection. Orchidectomy at day 60 post-infection produced a significant decrease of bacilli burdens in coexistence with higher expression of TNF $\alpha$ , IL-12 and IFN $\gamma$ . Thus, male mice are more susceptible to tuberculosis than females and this was prevented by castration suggesting that testosterone could be a tuberculosis susceptibility factor.

**Citation:** Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, et al. (2014) The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. PLoS ONE 9(4): e93831. doi:10.1371/journal.pone.0093831

**Editor:** Leonardo Mariño-Ramírez, National Institutes of Health, United States of America

**Received:** January 20, 2014; **Accepted:** March 7, 2014; **Published:** April 10, 2014

**Copyright:** © 2014 Bini et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the University of United Nations (UNU\_BIOLAC program), and Argentinian-Mexican agreement of bilateral scientific collaboration CONICET/CONACyT (contract: J000.345). E Bini was awarded with a Ph.D. scholarship from UNU-BIOLAC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: rhdezpando@hotmail.com

## Introduction

Males of many species are more susceptible than females to infections caused by certain parasites, fungi, bacteria, and viruses [1]. In the particular case of tuberculosis (TB) and in almost all but especially in developing countries, TB is twice as common in men than in women (male/female ratio of 1.9+/-0.6 for the world case notification) [2]. This difference has been attributed to biological and epidemiological characteristics [3,4], as well as socioeconomic and cultural barriers in the access to health care [5]. It is interesting to note that this TB gender difference is seen in adults of all ages, but not in children or young adolescents [6]. This observation suggests the participation of biological factors, particularly the well known regulatory activities that the steroid sex hormones have on the immune cells. Macrophages and lymphocytes have receptors for androgens, estrogens and progesterone [7]. These hormones participate in macrophages and lymphocytes development and function, as well as in the outcome of diverse diseases, including infectious diseases [8]. Females have

higher antibodies levels in sera [9] and exhibited stronger immune responses after immunization than males [10,11]. Moreover, women of all ages show significantly lower rates of infection and resultant mortality than men. This difference has been associated to important differences in the inflammatory response and is apparently advantageous against infection, but unfavorable in the immune response against self structures provoking in females a higher rate of autoimmune diseases [12,13].

Testosterone, the main circulating androgen in men and progesterone a hormone associated with the maintenance of pregnancy, are immunosuppressive. Both hormones impair macrophage activation [14] and could play a detrimental role in TB [15]. In contrast, in physiological concentration estrogens are considered pro-inflammatory mediators that stimulate the production of TNF- $\alpha$  [16], and interact with the IFN- $\gamma$  promoter [17].

The ability of estrogens to drive pro-inflammatory Th-1 associated immune responses and that of testosterone to inhibit them may help to explain why females have a lower incidence of

infectious diseases such as TB [6], but surprisingly this subject has not been fully studied in TB experimental models. Early reports for saprophytic mycobacterial infections showed that female mice are more resistant to infection with *M. intracellulare* and *M. marinum* [18,19]. The treatment of females or castrated males with testosterone increases their susceptibility to *M. marinum*, and estradiol treatment abolishes the higher susceptibility of ovariectomized mice to *M. avium* [20], but as far as we know there are no reports of similar experiments with *M. tuberculosis*.

This work aimed at comparing the course of infection between males and females, castrated and non-castrated animals using a model of progressive pulmonary TB in BALB/c mice infected by intratracheal route with a high dose of the laboratory *M. tuberculosis* strain H37Rv. We assessed survival, the pulmonary inflammatory response, bacillary loads, immune response (analyzing cytokine gene expression determined by RT-PCR) and serum testosterone levels. In order to investigate the effects of the testosterone suppression during late progressive disease, we also analyzed the same parameters in the lungs of males BALB/c mice castrated two months after infection and euthanized one month later.

## Materials and Methods

### Ethics Statements

All the animal work was done according to the guidelines of the Mexican constitution law NOM 062-200-1999, and approval of the Ethical Committee for Experimentation in Animals of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition in Mexico (CINVA), permit number: 224. All surgery was performed under sevoflurane anaesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

### Experimental Model of Progressive Pulmonary TB in BALB/c Mice

The experimental model of progressive pulmonary TB has been described in detail elsewhere [21,22]. Briefly, the laboratory *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (ATCC No. 25618) was grown in Middlebrook 7H9 broth (DIFCO) supplemented with 0.2% (v/v) glycerol, 10% OADC enrichment (DIFCO), and 0.02% (v/v) Tween-80 at 37°C. Mid log-phase cultures were used for all experiments. Mycobacteria were counted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Bacterial aliquots were thawed and pulse-sonicated to remove clumps.

A group of 45 BALB/c male mice, 8-week-old and 21–23 gr of weight, were gonadectomized by removing both testes through a surgical incision along the median line of the scrotum under anaesthesia in gas chamber using 0.2 ml per mouse of sevoflurane. Other group with the same number of animals corresponded to the sham group; in these mice, a midline incision along the scrotum was made and through it both testes were pulled out and then reinserted. The skin was stitched with sterile silk.

In a similar way, a group of 45 BALB/c female mice, 8-week-old and 21–23 gr of weight, was gonadectomized by removing both ovaries through bilateral incisions over the dorsum under anaesthesia in gas chamber using 0.2 ml per mouse of sevoflurane. In the sham operation group, ovaries were identified and the surgical incision was then stitched with sterile silk. After two weeks for recovering, all the animals were anesthetized in gas chamber using 0.1 ml per mouse of sevoflurane, and infected through endo-tracheal instillation with  $2.5 \times 10^5$  live bacilli into a cabinet level III of biosecurity. Mice were maintained in vertical position until spontaneous recovery. Infected mice were maintained in groups of five in cages fitted with micro-isolators connected to negative pressure in biosafety level III facilities.

Animals were kept with lights on from 6.00–18.00 hr and feed with sterilized chow ad libitum and drinking autoclaved water. Groups of five animals were euthanized into a cabinet biosecurity level III at 1, 3, 7, 14, 21, 28, and 60 days post infection by exsanguinations under anaesthesia with 56 mg/Kg of intraperitoneal pentobarbital. Three lungs, right or left, per time point were fixed and prepared for histopathological studies. After eliminating hilar lymph nodes and thymic tissues, seven lungs more were frozen and kept to  $-70^{\circ}\text{C}$  for bacilli loads determination and gene expression studies in two separated experiments. Ten animals per group were left untouched and the mortality was recorded in order to construct survival graphs. Animals were monitored every day and when they showed abnormalities such as respiratory insufficiency, accentuated caquexia or total immobilization they were humanely euthanized under anesthesia induced by intraperitoneal pentobarbital.

### Preparation of Lung Tissue for Histological Analysis and Morphometry

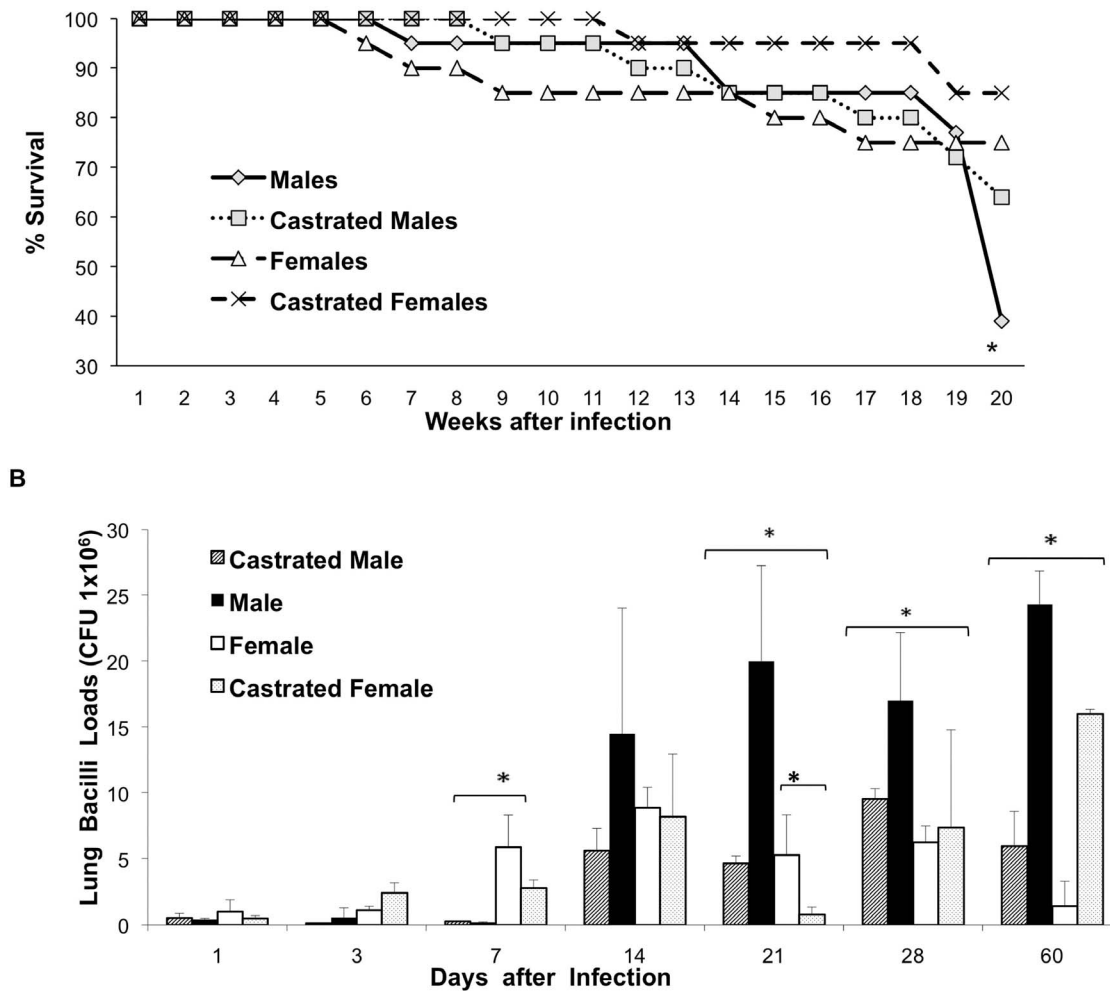
Lungs from infected mice were perfused with 10% formaldehyde diluted with in PBS via the trachea, fixed for 24 hr and embedded in paraffin. Sections, 5  $\mu\text{m}$  thick, taken through the hilus were mounted on glass slides, deparaffinized, and stained with hematoxylin and eosin. For quantification of inflammatory infiltrates, at least three different mice lungs per time point in two different experiments were evaluated. Ten random microscopy fields were selected at  $\times 20$  magnification. The area occupied by the inflammatory infiltrate around the venules (100  $\mu\text{m}$  of diameter), bronchi (150–200  $\mu\text{m}$  of diameter) and in the alveolar-capillary interstitium, as well as the granuloma size and the lung surface occupied by pneumonia were measured in a Q-win Leica 500 morphometry equipment [23].

### Determination of Colony-Forming Units (CFU) in Infected Lungs

Right or left lungs from four mice at each time point, in two separate experiments, were used for colony counting. Lungs were homogenized with a Polytron (Kinematica, Luzern, Switzerland) in sterile 50 ml tubes containing 3 ml of isotonic saline. Four dilutions of each homogenate were spread onto duplicate plates containing Bacto Middlebrook 7H10 agar (Difco Labs, Detroit MI, USA) enriched with oleic acid, albumin, catalase and dextrose. Incubation time and colony counting was 21 days [23].

### Real Time PCR Analysis of Cytokines in Lung Homogenates

Left or right lung lobes from three different mice per group in two different experiments were used to isolate mRNA using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to recommendations of the manufacturer. Quality and quantity of RNA were evaluated through spectrophotometry (260/280) and on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed using 5  $\mu\text{g}$  RNA, oligo-dT, and the Omniscript kit (Qiagen, Inc). Real-time PCR was performed using the 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA) and Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers for genes encoding acidic ribosomal protein (RLP0) as house keeping gene (FWD: 5'-CTC TCG CTT TCT GGA GGG TG-3'; RV: 5'-ACG CGC TTG TAC CCA TTG AT-3'), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, iNOS, IL17, were designed using the program Primer Express (Applied Biosystems, USA) [24].



**Figure 1. Survival and pulmonary bacilli loads comparisons among male and female BALB/c mice, castrated and non-castrated.** Mice were infected by intratracheal route with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A) Survival curve constructed with 20 mice, male mice showed significant lower survival difference when compared with female mice ( $p < 0.005$ , Log rank test). B) Lung bacterial burdens, mice were sacrificed at the indicated days after infection, and lungs ( $n = 4$  per time point) were used for determination of colony forming units. At late disease, male mice showed significant higher bacilli loads than the other groups. Asterisks represent statistical significance. doi:10.1371/journal.pone.0093831.g001

Cycling conditions used were: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 20 sec, 60°C for 20 sec, 72°C for 34 sec. Quantities of the specific mRNA in the sample were measured according to the corresponding gene specific standard. The mRNA copy number of each cytokine was related to one million copies of mRNA encoding the RLP0 gene [25].

### Kinetics of Testosterone Concentration in Serum and the Effect of Gonadectomized Male Mice during Late Progressive Disease

Serum testosterone levels from male mice were measured using an specific testosterone ELISA kit for mouse (EIA 1559, DRG Instruments, GmbH, Germany), following the recommendations of the manufacturer and reading at 450 nm in a Tecan Sunrise microtiter plate reader. Two independent experiment of gonadectomy during late progressive disease were carried out in 20 males 8-week-old BALB/c mice infected via the intratracheal route as above described. Two months after infection, 10 animals were castrated and other group with the same number of animals was sham operated as described above. On day 30 after castration (90 day postinfection), animals were euthanized and pulmonary

morphometry, bacilli loads and cytokines expression were determined as described above.

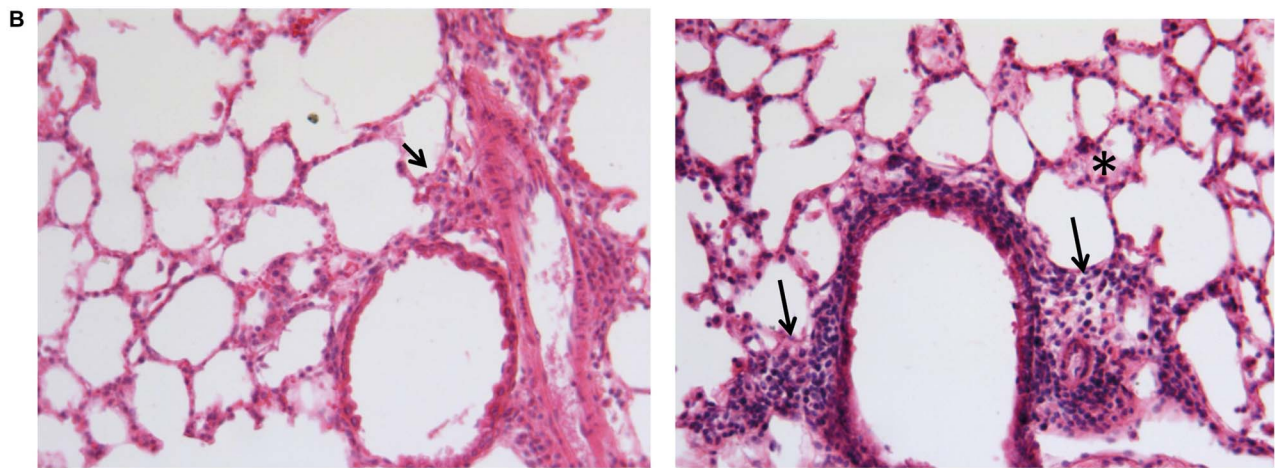
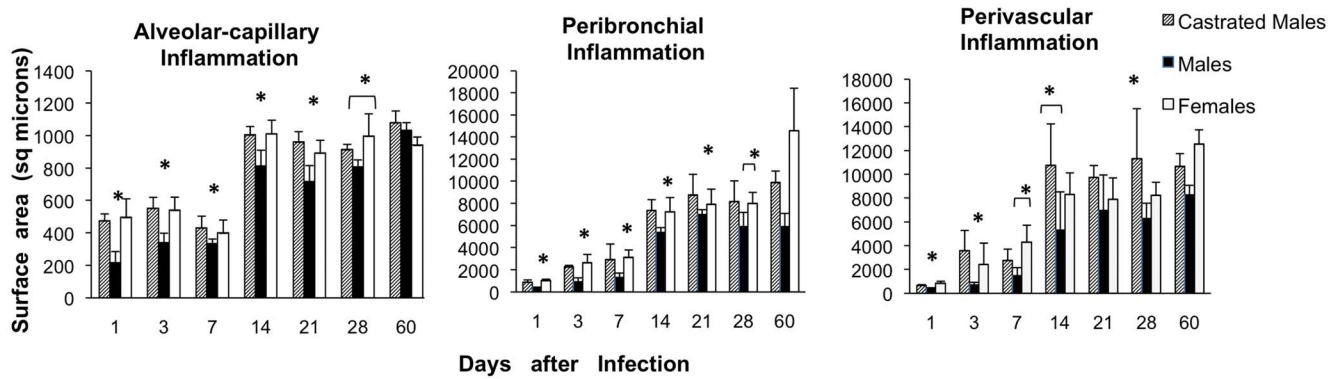
### Statistical Analysis

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Differences among groups were evaluated by the Anova F test, whereas the Student *t* test was used for further analysis among-group differences. Survival curves were analyzed with Kaplan Meir plots and the Log Rank test. An associated probability lower than 0.05, was considered significant.

### Results

#### Effect of Mice Gender and Gonadectomy on Survival and Bacterial Numbers after Infection with *M. Tuberculosis*

In order to study the effect of the gender in the course of experimental TB, groups of non-castrated male (M) and female (F) and castrated (CM, CF) BALB/c mice were infected by the intratracheal route with the reference strain H37Rv. Forty percent of M mice survived after four months of infection. In contrast, infected F mice showed 75% survival rate, a similar survival rate



**Figure 2. Kinetics of inflammatory infiltrates in the lungs of infected BALB/c mice and representative pulmonary histopathology.** A) Kinetics of inflammatory infiltrates in the lungs of noncastrated and castrated male and female mice. Three lungs from the same number of different animals for each time point were prepared for histological analysis; the inflammatory area in each indicated compartment was determined by automated morphometry. Asterisks represent statistical differences. B) Representative histopathology of the lung of mice after 21 days of infection, left figure correspond to a male mouse which shows scarce inflammatory infiltrate in the peri-bronchial and perivascular areas (arrow), while in the right micrograph is a similar histological area from a female mouse with larger inflammatory infiltrates (arrows) including the alveolar-capillary interstitium (asterisk). (hematoxylin/eosin, 100x magnification). doi:10.1371/journal.pone.0093831.g002

was seen in CF mice, while 60% of CM mice were alive after 120 days post-infection (Fig. 1). These survival rates correlated with the live bacilli burdens in lung homogenates. Since day 14, M exhibited higher number of CFU than CM, F and CF groups. Significant differences were observed since day 21, being the CM group that showed the lowest bacilli loads at day 60 (Fig. 1).

**Effect of Gender and Gonadectomy on the Inflammatory Response during Experimental Pulmonary TB**

Significantly higher inflammatory infiltrate constituted by lymphocytes and macrophages was seen in all of the lung compartments (alveolar-capillary interstitium, perivascular and peribronchial areas) of CM and F than M, from day 1 up to the 28 included (Fig. 2). F and CF did not show significant differences in the inflammatory response, thus this group is not present in the figure.

Lungs from CM and F showed well formed, similar size granulomas at one week after infection, while M exhibited smaller granulomas after two weeks of infection and during the rest of the infection (Fig. 3). CM and F mice showed small patches of pneumonia affecting less than 10% of the lung surface after three weeks of infection, while in M group pneumonia started one week

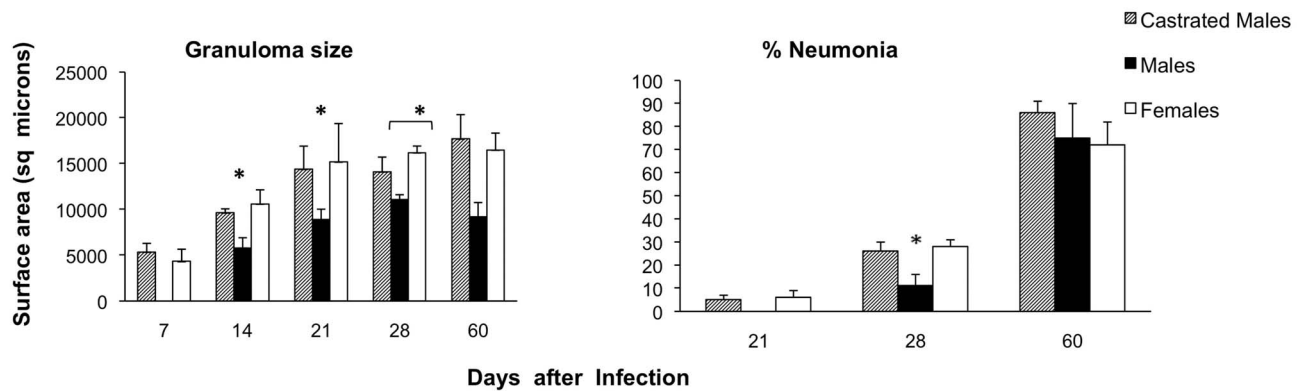
later and it was significant lower than in CM and F mice, but during late infection at day 60 lung consolidation was similar among the groups (Fig. 3).

**Cytokines Gene Expression in the Lungs of Infected Mice**

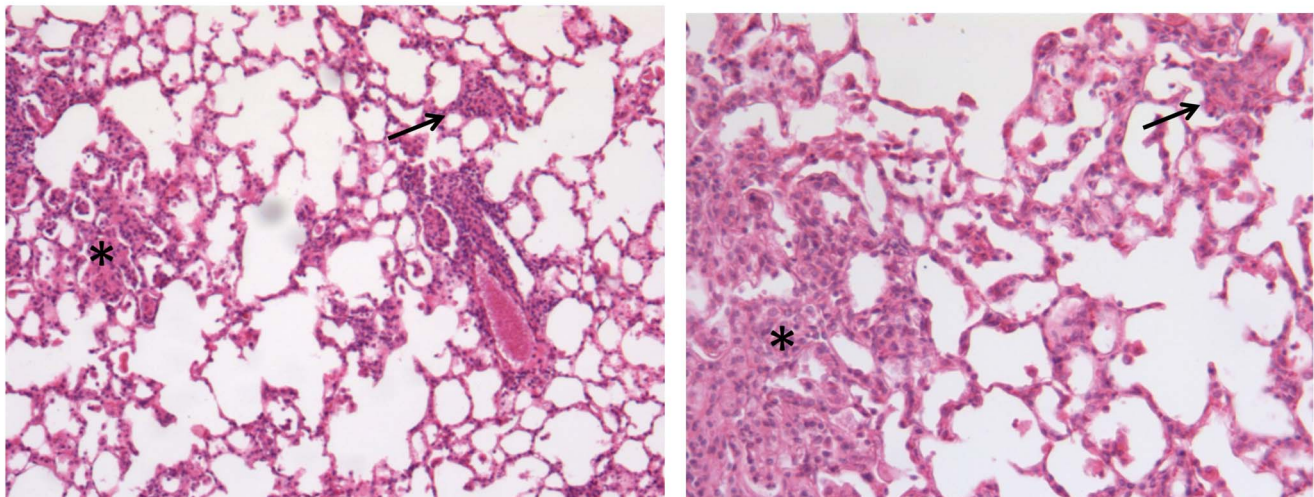
The expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  and IL-17, as well as iNOS was higher in F and CM than in M mice (Fig. 4), while there were not significant differences between F and CF in any of the studied cytokines (data not shown). F and CM showed progressive expression of TNF $\alpha$ , higher than M in all the time points being significant at day 14 and 21, the MC group showed the highest TNF $\alpha$  expression. The expression of IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-17 was similar in F and CM and higher than in M mice, being significant during early infection, after the first and second weeks: while iNOS was also higher expressed in F and MC than in M, with significant differences during the first month of infection (Fig. 4).

**Testosterone Serum Concentrations and the Effect of Male Castration during Advanced Disease**

The kinetics of serum testosterone concentration along experimental pulmonary TB showed 1–1.5 ng/ml during the first week



B



**Figure 3. Determination of granuloma size and pneumonia in the lungs after 28 days of infection.** A) Size in square microns of granulomas and the percentage of the lung surface affected by pneumonia determined by automated morphometry in at least 3 mice per time point and condition, asterisks represent statistical significance. B) Low power histological fields of the infected lung from a non-castrated male mouse (left figure) and female mouse (right figure) after 28 days of infection. The lung of female mouse shows more extensive area of pneumonia (asterisk) and bigger granulomas (arrows) than the male mouse (hematoxylin/eosin, 10x magnification). doi:10.1371/journal.pone.0093831.g003

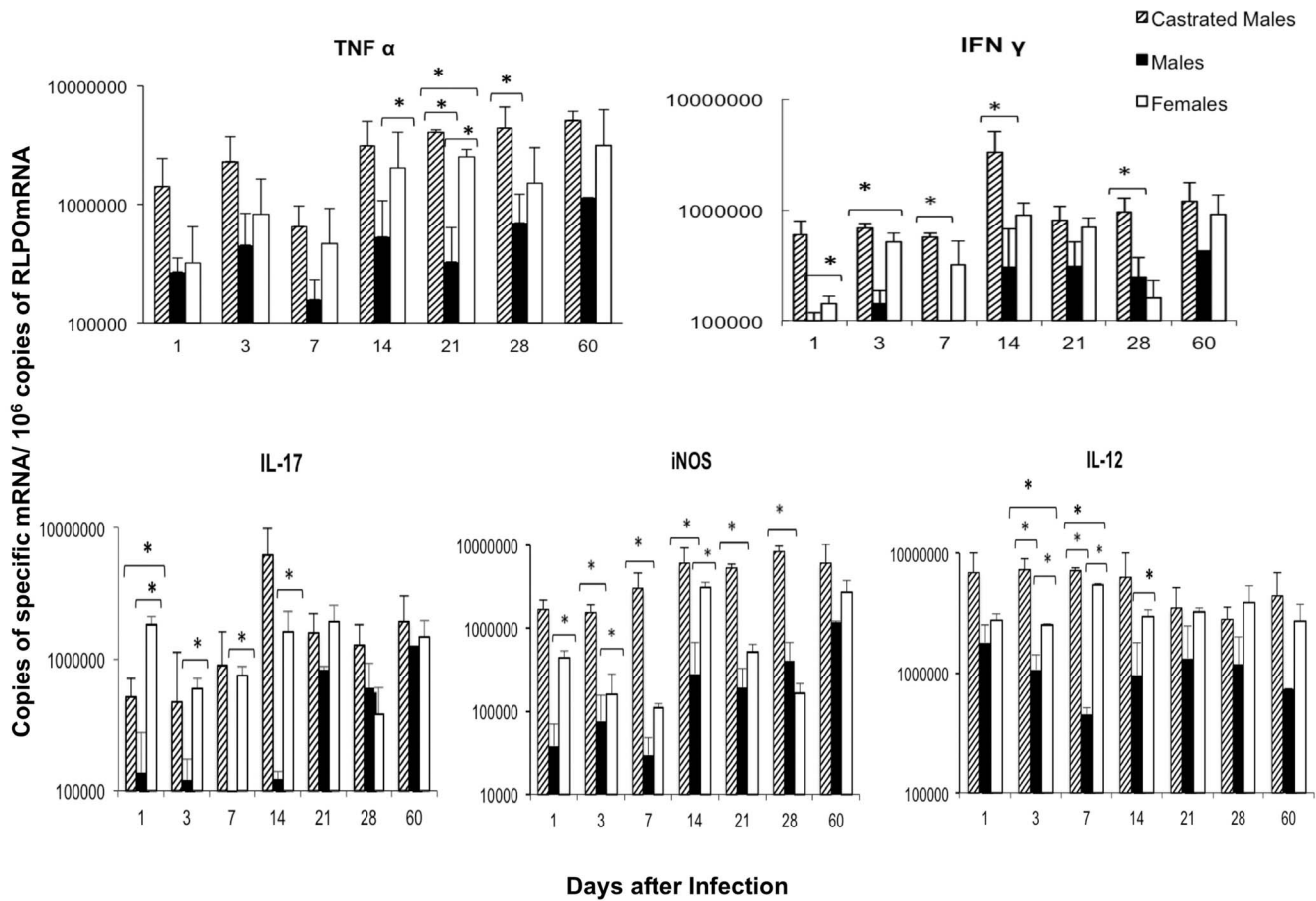
of infection; at day 14 a four fold increase was determined and it was maintained in similar concentrations until day 60, except at day 21 when the maximal testosterone concentration was detected (6 ng/ml  $\pm$  2) (Fig. 5). High testosterone concentrations coincided with progressive pulmonary inflammation due to granulomas and pneumonia formation, suggesting that the increment of testosterone production could contribute to control tissue damage by excessive inflammation but this could also permit bacillary proliferation. In order to investigate this point a group of infected male mice were castrated at day 60 of infection and one month later animals were euthanized to determine pulmonary bacilli burdens, extension of pneumonia and the expression of some pro-inflammatory cytokines. In comparison with the sham control group, gonadectomized male mice showed significant decrease of bacilli loads and pneumonia, as well as higher expression of TNF- $\alpha$  ( $p=0,001$ ), IL-12 ( $p=0,004$ ) and IFN- $\gamma$  (non-significant) (Fig. 6).

## Discussion

More than 70% of those individuals who develop active TB are males [6], and wide epidemiological studies in endemic areas from

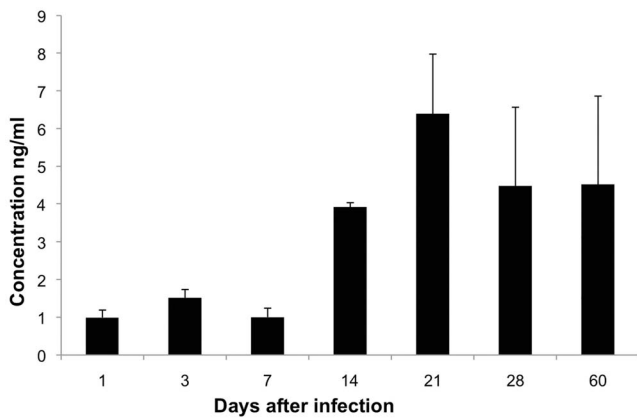
developing countries have shown that males suffer more severe disease, higher rates of recent transmission, more reactivation of latent infection and poorer treatment outcomes [26]. These differences have been attributed to socioeconomic and cultural factors leading to barriers in accessing health care systems, which might cause under notification in women [27]. However, broad epidemiological studies in Mexico [26] and India [28] have demonstrated, that the higher rate of pulmonary TB detected in men is not attributable to unequal access to health services for its diagnostic and treatment, in fact the proportion of women who were screened for TB diagnosis was greater than in men [26]. Although men are more likely to report risk factors that have been associated with exposure to *M. tuberculosis*, such as imprisonment [29], shelter residence [30], alcohol and tobacco consuming [31]. In fact, comprehensive case control studies in West African countries [32] and in Bangladesh [33] concluded, that male gender is a risk factor for TB independent of other examined factors.

The differences in TB rates between females and males have also been attributed to biological factors [6]. In this regard, polymorphisms or mutations in genes located in chromosome X can confer more TB susceptibility in males [34,35], as well as



**Figure 4. Kinetics of pro-inflammatory cytokines and iNOS gene expression determined by RT-PCR in the infected lungs.** Castrated males and noncastrated male and female BALB/c mice were infected with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv and euthanized at different time-points. The lungs from three different animals at each time-point were used to determine the gene expression of the indicated cytokine. Asterisks represent statistical significance between the represented groups. doi:10.1371/journal.pone.0093831.g004

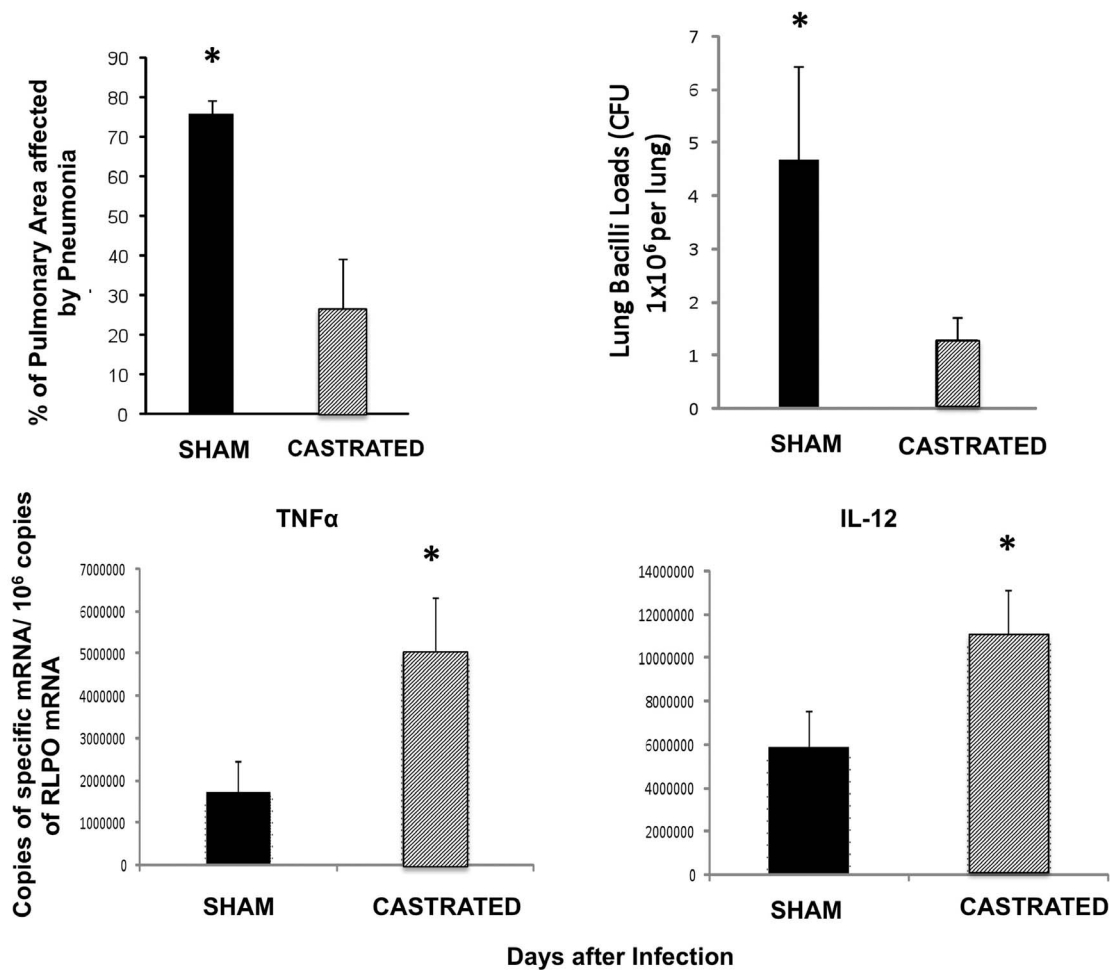
specific features of metabolism and nutrition related to gender [36], or anatomical and functional differences in the respiratory



**Figure 5. Serum testosterone concentration along pulmonary tuberculosis.** Sera from male non-castrated mice were used to determine testosterone by ELISA in the indicated time points after intratracheal infection with *M. tuberculosis* strain H37Rv. Data are expressed as means and standard deviation of six mice per time point. doi:10.1371/journal.pone.0093831.g005

tract between males and females [37]. Nevertheless, perhaps the most important biological factor associated to different TB susceptibility between males and females is the immune regulatory activities of the sexual hormones [1]. Our results reinforce this statement by the demonstration that male BALB/c mice exhibited higher mortality and bacilli burdens with lower inflammation than female mice and these differences were prevented in castrated male mice.

In general, it seems that androgens have suppressive effects on the cellular and humoral immune responses, so they can be considered as natural anti-inflammatory hormones [38], whereas estrogens enhance humoral immunity and affect balance of T and B cells [13]. Regarding to TB this should be important because host control of mycobacterial infection, in both human and mouse, has been associated with Th1 cells and activated macrophages [39]. Experimental studies in mice have demonstrated more male susceptibility to *Mycobacterium lepramurium* [40], *M. avium* complex [20], and *M. marinum* [19]. The treatment with testosterone increases susceptibility to *M. marinum* [19,18], while administration of estradiol restored the burden of *M. avium* bacilli in CF mice [20]. However, it is important to consider that sex steroids have different functions, even opposite activities, depending on their concentrations. This is particularly evident in females that exhibited significant fluctuations during the menstrual cycle and in specific physiological states such as in pregnancy or menopause.



**Figure 6. Effect of orchidectomy in BALB/c mice after 60 days of infection.** Male mice were infected intratracheally with *M. tuberculosis* strain H37Rv and after two months one group of six animals were castrated and other group was sham operated. One month after castration animals were euthanized and their lungs were used to determine bacilli burdens, tissue damage and gene expression of TNF $\alpha$  and IL-12. Castrated mice showed lower bacilli loads and tissue damage with higher expression of TNF $\alpha$  and IL-12 than control mice. Asterisks represent statistical significance. doi:10.1371/journal.pone.0093831.g006

Moreover, high testosterone levels could result in high cortisol levels and an associated reduction in immune function [41].

Our results showed that BALB/c tuberculous M mice died significantly earlier and have higher pulmonary bacilli loads during late disease than tuberculous F mice. Thus, M mice are more susceptible to *M. tuberculosis* infection. Estradiol, the prototype of female steroid hormone has significant influence on inflammation [42], favoring inflammatory cell migration by inducing the expression of mRNA for adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1) mediated by TNF- $\alpha$  in endothelial cells. This is in agreement with our morphometry results that showed in F mice earlier granuloma formation and higher inflammation in all lung compartments than M mice. F mice also showed alveolar inflammation (pneumonia formation) one week before than M, in coexistence with higher pro-inflammatory cytokines expression and lower bacilli burdens. In late disease, at day 60 post-infection, F mice showed lower bacilli burdens than M but with similar lung consolidation, implying that F could suffer more tissue damage by excessive inflammation. Ovariectomized DBA/2 mice infected by the intratracheal route with *M. avium* showed significantly higher bacilli burdens than sham F mice [20]. In contrast, we did not find differences in terms of mortality and bacilli burdens in tuberculous F and CF

mice. These apparent contradictory results could be explained by the participation of diverse factors, such as the different mouse strain and infectious agent with different virulence level (low virulence of *M. avium* and high virulence of *M. tuberculosis*) and antigenic constitution. Indeed, the quality and quantity of antigen stimulation can change the level of sex hormone receptors expressed by macrophages and hence modulating their response [43]. The participation of other sex hormones, such as gonadotrophin releasing hormone which is elevated in gonadectomized animals, can also participate in the protection of CF mice, considering that this hormone promotes both T cell expansion and survival [44]. It is also important to consider the host genetic background, previous studies showed more resistance to atypical mycobacteria infection in C57Bl or DBA/2 M mice than in BALB/c M mice [19].

Interestingly, CM mice showed better survival rate and lower pulmonary bacilli burdens than M mice. Therefore, it seems that the lowered TB resistance in M mice is in part mediated by testosterone. Male castration after puberty in mice increased thymus and spleen size with higher number of peripheral CD4 and CD8 T cells. These cells also showed more vigorous proliferation after specific antigen stimulation and transiently exhibit exaggerated responses to costimulation [38]. These observations were in

agreement with our results that showed in tuberculous CM mice, more pulmonary inflammation with higher pro-inflammatory cytokine expression and bigger granulomas than in M mice. CM mice formed granulomas one week before with significant lower bacilli loads than M. Although, lung area affected by pneumonia at late disease was similar in CM than M, suggesting that as in F group, castration could favor excessive inflammation and tissue damage. In this sense, the fact that human males with moderate to severe TB had decreased testosterone levels in sera with modest increases of estradiol concentrations, may be viewed as an unsuccessful attempt to improve cell mediated immune protective mechanisms [45]. In contrast to these results in humans, our results showed that BALB/c tuberculous M mice increased testosterone serum levels in coincidence with progressive inflammation, from day 14 when granulomas start their formation until day 60, when substantial lung area is affected by pneumonia. These results suggest that testosterone might be involved in the modulation of inflammation, decreasing tissue damage by excessive inflammation. However, this modulation of inflammation might decrease the protective pro-inflammatory cytokines

production favouring bacilli growth and disease progression. This statement was supported by our results from male mice castrated at late active disease (day 60), that showed lower pulmonary bacilli loads and higher expression of TNF $\alpha$ , IL-12 and IFN- $\gamma$  than non-castrated mice.

In conclusion, M mice are more susceptible to TB than F mice. This higher susceptibility was prevented by castration before infection or during late disease, suggesting that testosterone is a potential susceptibility factor. These experimental results show that the endocrine systems, in this case the sexual hormones, substantially modifies the activity of the immune system and the inflammatory response influencing the course of experimental pulmonary TB.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EIB RHP MRP. Performed the experiments: EIB DME BMC JBP EA ZLZ AFC. Analyzed the data: EIB RHP DC OB. Contributed reagents/materials/analysis tools: RHP. Wrote the paper: EIB RHP OB.

## References

- Klein SL (2000) The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioural Rev* 24: 627–638.
- WHO (2009) Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO. Available: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/).
- Martínez AN, Rhee JT, Small PM, Behr MA (2000) Sex differences in the epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 26–31.
- Borgdorff MW, Nagalderke NJ, Dye C, Nunn P (2000) Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore gender differences in case detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 123–132.
- Uplekar M, Rangan S, Ogden J (1999) Gender and tuberculosis control: towards a strategy for research and action, WHO/TB/2000.280. Geneva: World Health Organization.
- Neyrolles O, Quintana Murci L (2009) Sexual inequality in tuberculosis. *Plos Med* 6: e1000199.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas M (2005) Sex hormones and immune response. *Hum Reprod Update* 11: 411–423.
- Ansar AS, Penhale WJ, Talal N (1985) Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormones action. *Am J Pathol* 121: 531–551.
- Butterworth M, McClellan B, Allansmith M (1967) Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature* 214: 1224–1225.
- Eidinger D, Garrett TJ (1972) Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J Exp Med* 136: 1098–1116.
- Rhodes K, Scott A, Markham RL, Monk Jones ME (1969) Immunological sex differences: a study of patients with rheumatoid arthritis, their relatives, and controls. *Ann Rheum Dis* 28: 104–120.
- Cutolo M, Serriolo B, Villaggio B, Pizzorni C, Cravioito C, et al. (2002) Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 66: 131–142.
- Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, et al. (1999) Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 107: 681–686.
- D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, et al. (1999) Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann NY Acad Sci* 876: 426–429.
- Rook GA, Hernández Pando R, Dheda K, Teng Seah G (2004) IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunol* 25: 483–488.
- Zuckerman SH, Bryan Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL (1995) In vivo modulation of marine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology* 86: 18–24.
- Fox HS, Bond BL, Parslow TG (1991) Estrogen regulates the IFN- $\gamma$  promoter. *J Immunol* 146: 4362–4367.
- Yamamoto Y, Tomioka H, Sato K, Saito H, Yamada Y, et al. (1990) Sex differences in the susceptibility of mice to infection induced by *Mycobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis* 142: 430–433.
- Yamamoto Y, Saito H, Setogawa T, Tomioka H (1991) Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun* 59: 4089–4096.
- Tsuyuguchi K, Suzuki K, Matsumoto H, Tanaka E, Amitani R, et al. (2001) Effect of oestrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin Exp Immunol* 123: 428–434.
- Hernández Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, et al. (1996) Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89: 26–33.
- Hernández Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva Sahd J, et al. (1997) Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 90: 607–17.
- Hernández Pando R, Streber Ma de la Luz, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, et al. (1998) The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology* 5: 234–241.
- Hernández Pando R, Aguilar D, Smith I, Manganelli R (2010) Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 78: 3168–76.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, et al. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37: 112–119.
- Jiménez Corona ME, García García L, DeRiemer K, Ferreyra Reyes L, Bobadilla del Valle M, et al. (2006) Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 61: 348–353.
- Weiss MG, Sommerfeld J, Uplekar MW (2008) Social and cultural dimensions of gender and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 829–830.
- Balasubramanian R, Garg R, Santha T, Gopi PG, Subramani R, et al. (2004) Gender disparities in tuberculosis: report from a rural DOTS programme in south India. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 323–332.
- Tekkel M, Rahu M, Loit HM, Baburin A (2002) Risk factors for pulmonary tuberculosis in Estonia. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 887–894.
- Curtis AB, Ridzon R, Novick LF, Driscoll J, Blair D, et al. (2000) Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns in a homeless shelter outbreak. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 308–313.
- Kolappan C, Gopi PG (2002) Tobacco smoking and pulmonary tuberculosis. *Thorax* 57: 964–966.
- Lienhardt C, Fielding K, Sillah JS, Bah B, Gustafson P, et al. (2005) Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. *Int J Epidemiol* 34: 914–923.
- Hamid Salim MA, Declercq E, Van Deun A, Saki KA (2004) Gender differences in tuberculosis: a prevalence survey done in Bangladesh. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 952–957.
- Bustamante J, Picard C, Fieschi C, Filipe Santos O, Feinberg J, et al. (2007) A novel X-linked recessive form of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *J Med Genet* 44: e65.
- Filipe Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku CL, et al. (2006) X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* 203: 1745–1759.
- Boelaert JR, Vandecasteele SJ, Appelberg R, Gordeuk VR (2007) The effect of the host's iron status on tuberculosis. *J Infect Dis* 195: 1745–1753.
- Lin CM, Davidson TM, Ancoli-Israel S (2008) Gender differences in obstructive sleep apnea and treatment implications. *Sleep Med Rev* 12: 481–496.
- Roden A, Moser M, Tri S, Mercader M, Kuntz SM, et al. (2004) Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J Immunol* 173: 6098–6108.
- Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ (1998) Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human



- monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative–positive, but not in purified protein derivative–negative subjects. *J Immunol* 160: 2408–2417.
40. Brown IN, Glynn AA (1987) The *Ity/Lsh/Bcg* gene significantly affects mouse resistance to *Mycobacterium lepraemurium*. *Immunology* 62: 587–591.
  41. Roberts M, Buchanan K, Evans M, Marin RH, Satterlee DG (2009) The effect of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *J Exp Biol* 212: 3125–3131.
  42. Okada M, Suzuki A, Mizuno (1997) Effects of 17 $\alpha$ -estradiol and progesterone on migration of human monocytic THP-1 cells stimulated by minimally oxidized low-density lipoprotein *in vitro*. *Cardiovasc Res* 34: 529–535.
  43. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, et al. (2001) Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 16: 340–343.
  44. Buckley AR (2001) Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus* 10: 684–690.
  45. del Rey AD, Mahuad CV, Bozza VV, Bogue C, Farroni MA, et al. (2007) Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun* 21: 171–179.

# **The implication of pro-inflammatory cytokines in the impaired production of gonadal androgens by patients with pulmonary tuberculosis**

Bini Estela Isabel<sup>a,b</sup>, D'Attilio Luciano<sup>b</sup>, Marquina-Castillo Brenda<sup>a</sup>, Mata-Espinoza Dulce<sup>a</sup>, Díaz Ariana<sup>b</sup>, Marquez-Velasco Ricardo<sup>c</sup>, Gamboa-Domínguez Armando<sup>a</sup>, Bay Maria Luisa<sup>b</sup>, Hernández-Pando Rogelio<sup>a</sup>, Bottasso Oscar<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Experimental Pathology Section. Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Vasco de Quiroga 15, Tlapan, México City, México.

<sup>b</sup>Institute of Clinical and Experimental Immunology of Rosario. IdICER (CONICET-UNR), Medical Sciences School, Santa Fe 3100, Rosario, Argentina.

<sup>c</sup>Department of Immunology. National Institute of Cardiology "Dr Ignacio Chavez", Juan Badiano 1, Tlapan, México City, México

**Correspondence:** Estela Isabel Bini, Experimental Pathology Section, Department of Pathology. National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México D.F. México.

E-mail: [estelabini@yahoo.com.ar](mailto:estelabini@yahoo.com.ar)

Tel number: +5255 54870900

## Summary

**Background:** The chronic nature of tuberculosis and the protracted immuno-inflammatory reactions are implied in a series of metabolic and immune-endocrine changes accompanying the disease. We explored components from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and their relationship with cytokines involved in disease immunopathology, in male TB patients.

**Methods:** Plasma samples from 36 active untreated pulmonary TB male patients were used to determine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-6, cortisol, dehydroepiandrosterone, testosterone, progesterone, estradiol, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) by ELISA. Healthy controls corresponded to 21 volunteers without contact with TB patients and similar age (40 $\pm$  16,8 years). Testicular histological samples from necropsies of patients dying from TB were immunostained for IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$ . The TM3 mouse Leydig cell line was incubated with recombinants TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ , supernatants were collected and used to measure testosterone by ELISA.

**Results:** Patients showed decreased levels of testosterone in presence of high amounts of LH, together with augmented IFN- $\gamma$ , IL-6 and TGF- $\beta$  levels. Testicular histological sections showed abundant presence of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  in interstitial macrophages, Sertoli cells and some spermatogonia. *In vitro* treatment of Leydig cells with these cytokines led to a remarkable reduction of testosterone production.

**Key words:** tuberculosis, testosterone, cytokines, gonadal steroids

## 1.1 Introduction

One-third of the human population is infected by *M. tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB). The development of clinical TB occurs in 5 %-10 % of them at some point in their lives, for reasons that are not completely understood [1]. As yet, the development of TB seems to depend on a relatively inability of the host to mount an effective response [2]. In individuals wherein the immune response fails to clear the pathogen, a sort of kind of trade-off between the host and microbe takes place, in many cases resulting in a misdirected response which contributes to the development of different levels of tissue damage, as is the case of TB [3,4]. Earlier studies by our group indicate that dysregulated immune responses during human TB translate in an excessive production of pro-inflammatory cytokines which are known to stimulate the endocrine system promoting an unfavorable environment, either for the development of a protective immune response, or the clinical status of patients [5,6]. This bears some relationship with the view that chronic stressful conditions may lead to protracted responses not always beneficial [7], i.e.; endocrine abnormalities involving disturbances of the HP Adrenal (HPA) and Gonadal (HPG) axes, among others.

In this regard, we have shown that patients with newly diagnosed pulmonary TB present augmented systemic concentrations of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin 10 (IL-10), interleukin 6 (IL-6), and Cortisol, in presence of decreased amounts of adrenal and gonadal androgens [5], as seen in other reports documenting decreased levels of DHEA in serum [8] or urine [9] from TB patients.

As well as modulating each other production, adrenal and sex steroids have important effects on immune cell development and function, mainly because immune cells express diverse hormone receptors [10]. It follows that interactions between the HPG and HPA axes with the immune system are to a great extent involved in the ultimate effects of the anti-infectious response.

In expanding our knowledge into this kind of immune-endocrine communication, the present study was initially addressed to explore the eventual relationship between components mainly from the HPG axis with cytokines involved in the immune and inflammatory response, of male TB patients. One finding to remark was the detection of decreased levels of testosterone in presence of higher amounts of luteinizing hormone (LH), suggesting that testosterone secretion may be modulated by *in situ* influences arisen because of the infectious process, i.e., cytokines. According to this assumption, testicular histological samples from necropsies of patients dying from TB were immune-stained for several pro-inflammatory cytokines which revealed an abundant presence of interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ),

tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IFN- $\gamma$  in interstitial macrophages, Sertoli cells and some spermatogonia.

With this evidence in hand, a mouse-derived Leydig cell line was then cultured and exposed to different concentrations of cytokines relevant in TB immunopathology, those were TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ). It was found that *in vitro* treatment with the three cytokines led to a remarkable reduction of testosterone production.

Taken together, present results point out to a novel and interesting implication of the inflammatory response during tuberculosis in the disturbed production of gonadal steroids.

## **2.1 Materials and Methods**

### **2.1.1 Sample population**

Thirty six newly diagnosed active pulmonary TB patients were enrolled in this study. All individuals were HIV negative and were untreated at the time of blood collection. All patients were males, and aged 42 (26-55) years (median, 25-75 percentiles), and their sputum was positive for acid-fast bacilli. Disease severity was determined through the X-ray pattern and classified into three categories: mild (a single lobe involved, and without visible cavities, n=12) moderate (unilateral involvement of 2 or more lobes with cavities, if present, reaching a total diameter no greater than 4 cm, 12 cases) and severe (bilateral disease and multiple cavities, 12 cases). Twenty one volunteers, age-matched [44 (35-55) years] males with no clinical or serological evidence of an associated disease and the antecedent of contact with TB patients (healthy contacts –HCo-) were also included. All individuals gave informed consent for participating in the study and the protocol was approved by the ethical committee at the Medical Sciences School. Exclusion criteria comprised: pathologies affecting the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (i.e., tumor, vascular), direct compromise of the adrenal gland, age under 18, or any disorder requiring treatment with corticosteroids, immunosuppressors or immunomodulators.

### **2.1.2 Plasma measurements**

Blood samples were collected from patients and healthy volunteers at 8:00 am. Plasma was obtained from EDTA-treated blood. Following addition of aprotinin (100 U/ml plasma; Trasyolol, Bayer, Germany), samples were preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$ . TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  (Pharmingen, Germany), IL-6 (Amersham, UK), cortisol, DHEA, testosterone, progesterone, estradiol, Luteinizing Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) (DRG Systems, Germany, in all cases) concentrations were

determined using commercially available ELISA kits. The detection limits and the Coefficient Variation % (CV) were, respectively: IFN- $\gamma$ : 4.7 pg/ml; TGF- $\beta$ : 2 pg/ml, CV: 1; TNF- $\alpha$ : 7.8 pg/ml; IL-6 0.1 pg/ml, cortisol: 2.5 ng/ml, CV: 8.1-5.6 ; DHEA: 0.1 ng/ml, CV: 3.52-2.64; progesterone 2 ng/ml, CV: 5.4-6.86; testosterone: 0.07 ng/ml, CV: 4.16-3.34; estradiol: 4.6 pg/ml, CV: 6.81-4.13 ; LH: 0.2 ng/ml (range assay: 0.86 – 100 mIU/mL), CV: 7.62-4.57 ; and FSH: 0.4  $\mu$ g/dl (range assay: 1.27 – 200 mIU/mL), CV: 7.91-4.18. Results were expressed as the average of two determinations (pg/ml) in an ELISA microplate reader at 450nm. Cytokines were quantified using reference standard curves generated with human recombinant cytokines. Recent parallel studies by measuring cortisol or DHEAS in plasma (by ELISA with aprotinin) or serum (by electrochemoluminescence without aprotinin) in the same blood samples, yielded quite similar results (the correlation coefficient was nearly to 1 in both cases).

### 2.1.3 Cytokine detection by immunohistochemistry in testicular samples

In order to determine the local cytokine production by immunohistochemistry, paraffin-embedded testicles from three necropsies of patients dying from TB with extensive cavitary bilateral disease and three from non-infective illness as controls (extensive kidney cortical necrosis and two cases of leukemia) were studied. Samples were obtained from files of the Pathology Department at the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, México. Tissue samples were obtained during legally authorized autopsies with signed permission by a relative, who agreed to the donation of tissue samples for the present study.

Tissue sections were desparaffinized and maintained in PBS Tween 20, the endogenous peroxidase activity was blocked with peroxidase blocker reagent (BioSB, USA) during 30 min. After blocking with the background sniper (BIOCARE Medical, USA), tissue sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C at optimal dilutions. The used primary antibodies were to detect: TNF- $\alpha$  (mouse monoclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, USA), IFN- $\gamma$  (goat polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, USA), TGF- $\beta$  (rabbit polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, USA), IL-6 (rat polyclonal IgG; BD, Pharmingen, USA), IL-1 $\beta$  (goat polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, USA), and *Mtb* polyclonal antibody against diverse mycobacterial antigens (BIOCARE Medical, USA). Mouse-rabbit immunodetector HRP/DAB (BioSB, USA) detection system and goat on

rodent HRP polymer (BIOCARE Medical, USA) were used to develop the reaction. Tissue sections were counterstained with hematoxylin and eosin.

#### 2.1.4 In vitro production of testosterone by Leydig cells incubated with cytokines

The TM3 cell line, derived from mouse Leydig cells, was purchased from ATCC (ATCC® CRL1714™). Cells were cultured in 1:1 vol of Ham's F12 medium and Dulbecco's modified Eagle's medium, with 2.5mM L-glutamine, 0.5mM sodium pyruvate, 1.2 g/L sodium bicarbonate, and 15 mM HEPES (all from Corning Life Technology, USA), 92.5%; Horse serum, 5%; Fetal bovine serum (both from Thermo Scientific, USA) 2.5%; and 1% of Penicillin-Streptomycin (GYBCO, USA). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (95%) at 5% CO<sub>2</sub>. For assessing testosterone production, TM3 cells were plated in 96-well plates. After 48 h, medium was replaced with medium containing 2.5 UI/ml hCG (Sigma, USA) kindly provided by Dra Lorenza Díaz, Reproductive Biology Department, INCMNSZ, and recombinants TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  kindly provided by Dr F Lopez Casillas from the Cellular Physiology Institute, National University of México; (TNF- $\alpha$  5ng/ml, IFN- $\gamma$  4000 pM, and TGF- $\beta$  at 1ng/ml). Different conditions were settled by triplicate. Leydig cell culture media from each treatment were collected 24 hr later and used to assess testosterone by a commercial ELISA kit (DRG systems, USA), according to the manufacturer indications.

#### 2.1.5 Statistical analysis

Unpaired statistical comparisons were performed by the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis followed by post-hoc tests, if applicable. Correlations between hormone and cytokine levels were analyzed by non parametric methods. Statistical significance was inferred for  $p$  values < 0.05.

### 3.1 Results

Assessment on hormones from the HPG axis showed that TB patients had respectively decreased and increased amounts of testosterone and LH respect to healthy controls (HCo); with a statistically insignificant trend of FSH levels to be a little increased in TB patients (Figure 1, panels a-c). Levels of estradiol and progesterone in TB patients practically overlapped with those seen in HCo, with progesterone showing the lowest amounts in both subject groups (data not shown). In relation to cytokines, there were no gross between-group differences in TNF- $\alpha$  values (data not shown), whereas IFN- $\gamma$ , IL-6 and TGF- $\beta$  levels were found augmented in TB, significantly different from HCo (Figure

2, panels a-c). Tested compounds were unrelated to age. Further comparisons within the TB group according to disease severity showed that patients with more progressive forms of TB had a further increase, statistically insignificant, of IFN- $\gamma$  and IL-6 levels respect cases with mild disease (data not shown).

In line with former findings TB patients continued to showed decreased DHEA levels ( $3.70\pm 0.57$ ) and augmented cortisol concentrations ( $186.61\pm 32.48$ ) when compared with values from HCo (DHEA:  $6.51\pm 1.56$ ,  $p<0.04$ ; cortisol:  $126.03\pm 10.36$ ,  $p<0.05$ ).

Pair correlation analysis between hormones and cytokines revealed that levels of TGF- $\beta$  correlated inversely with DHEA ( $r= -0.47$ ;  $p<0.04$ ), as did testosterone with either Cortisol ( $r= -0.58$ ;  $p<0.003$ ) or IFN- $\gamma$  ( $r= -0.32$ ;  $p<0.035$ ).

### 3.1.1 Histological and immunohistochemistry findings

Tissue sections from all TB autopsy cases showed mild testicular atrophy, manifested by interstitial fibrosis with focal chronic inflammatory infiltrate and detention of spermatogenesis. There was no evidence of local TB infection such as necrosis or granuloma formation. Immunohistochemistry detection of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  showed strong positive staining in interstitial macrophages, Sertoli cells and some spermatogonia. Interstitial macrophages showed very strong TNF- $\alpha$  immunostaining, while spermatogonia exhibited intense positivity to IL-6 and Sertoli cells to IL-1 $\beta$  (Fig 3). Some lymphocytes and occasional macrophages from the testicular interstitium showed mild IFN- $\gamma$  positivity (Fig 3). Occasional macrophages showed immune staining to mycobacterial antigens and non immunoreactivity was seen to TGF- $\beta$ . Testicle sections from control autopsies showed slight detention of spermatogenesis without infiltration of inflammatory or leukemic cells; all cases were completely negative to all cytokines detection by immunohistochemistry (Fig 3).

### 3.1.2 Testosterone production by Leydig cells exposed to different cytokines

In a further experiment, the TM3 cell line, derived from mouse Leydig cells, was cultured in triplicate and exposed to different mouse recombinant cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ ). Assessment on the levels of testosterone in culture media collected 24 hours later revealed that cytokine-treated cultures produced much lesser amounts of testosterone when compared with cultures without cytokines (overall difference,  $p<0.015$ , Table 1).



## 4.1 Discussion

TB is a disease in which tissue pathology has an immune-mediated component encompassing an excessive and/or protracted cytokine production liable to affect the immune-endocrine communication. In this sense, a variety of factors exogenous to the immune system itself, are likely to play a functional role in regulating the level of immune cell activity by modifying the microenvironment in which the immune cells reside and function. As part of this bi-directional communication, products of the immune response can in turn alter the balance of hormone production and hence affecting different physiological processes.

An interesting finding of present study was the demonstration that active TB patients have decreased levels of testosterone in presence of increased amounts of LH. Production of testosterone by Leydig cells is under the control of LH, which is secreted by the anterior pituitary and reaches the testes via the blood stream. At the gonadal level, LH binds to receptors on the surface of the Leydig cells to stimulate testosterone production by activating an intracellular second messenger system [11]. The present LH/testosterone dissociation implies some degree of testicular resistance to LH and/or suppression of Leydig cells steroidogenesis. Among factors implied in this regard, cytokines were reported to interfere with Leydig cell steroidogenesis and testosterone production [12]. This phenomenon may be linked to infectious stimuli, since LPS-induced inflammation was shown to affect testicular function, including decreased steroidogenesis and impaired spermatogenesis [13,14].

To the best of our knowledge, the present study is the first report documenting the presence of pro-inflammatory cytokines in testes from TB patients. The intimate association between Leydig cells and accessory cells expressing such mediators suggests that they may be functionally linked.

Our findings are in line with experimental studies in testes revealing the presence of pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$  and IL-6 from interstitial macrophages [15,16], Leydig cells [17], Sertoli cells [18] and TNF- $\alpha$  from macrophages and spermatocytes [19,20]. Importantly, all these mediators were found to inhibit testosterone production by Leydig cells [21]. At the clinical level, patients with rheumatoid arthritis, a chronic disease exhibiting a protracted inflammatory response are also known for their impairment in gonadal steroid production [22,23]. In the same sense, human volunteers challenged with subcutaneous IL-6 injections (leading to acute elevations in circulating IL-6 levels as seen in severe inflammation), showed decreased testosterone levels without apparent changes in gonadotropin levels [24]. It is worth commenting that pro-inflammatory cytokines were found increased in this series of TB patients, as well as in our former studies in patients with this disease [5,6,25].

Since testes from TB patients contained increased amounts of pro-inflammatory cytokines, an attempt at experimentally reproducing the influence of such situation on testosterone production was carried out. Confirming reports from other laboratories, pro-inflammatory cytokines significantly inhibited testosterone production by Leydig cells (12,21). In analyzing cytokine effects, we also wished to ascertain the effect of TGF- $\beta$  since this cytokine was also found increased in TB patients [26] being quite relevant in several aspects of TB immunopathogenesis [27]. Our findings revealed that Leydig cells exposed to TGF- $\beta$  produced lesser amounts of testosterone. Beyond its pro- and anti-inflammatory effects [28], TGF- $\beta$  was also shown to influence male gonadal function. In the testis, TGF- $\beta$  regulates the secretor function of Leydig and Sertoli cells, as well as testis development and spermatogenesis [29, 30]. TGF- $\beta$ 1 represses testosterone production in Leydig cells through decreasing LH/hCG receptor expression and the expression of steroidogenic genes such as StAR and P450c17 [31]. As well as reducing testosterone production, our former studies also showed that TGF- $\beta$  was also able to inhibit DHEA by adrenal cells [32], which bears relation with the present demonstration of the inverse association between TGF- $\beta$  and DHEA. Collectively, it implies a broader range of inhibition of androgen production by this cytokine and the adverse consequences resulting from it; mainly because of the anabolic and anti-inflammatory effects of testosterone [33]. Within this context, diminished amounts of testosterone would not be sufficient to counteract the synthesis of mediators dealing with accompanying inflammatory reaction. Since testosterone and Cortisol display anti-inflammatory effects, the negative correlation between both steroids perhaps may reflect a compensatory interaction between the HPG and HPA axes, to assure some form of a counterbalancing effect for the accompanying inflammation. Also, the inverse correlation between testosterone and IFN- $\gamma$  levels may be explained in view of the inhibitory effects of the gonadal steroid on Th1 cell differentiation [34]. Another reason for the inhibition of testosterone production may have to do with energy conservation necessary to sustain the immune response. Alternatively, it may represent an adaptive mechanism attempting to avoid the reproduction of the more susceptible people to illness and hence preventing the propagation of this defect.

Whatever the case, it is clear that when the pathogen cannot be contained by defensive mechanisms, as occurs in TB, a systemic response characterized by multiple metabolic and neuroendocrine changes develops. This will affect essential biological functions, like the development of protective responses, control of tissue damage and physiological functions, which in essence are implied in a poorer disease course.

## **5.1 Conclusions**

Present results point out to a novel and interesting implication of the inflammatory response during tuberculosis in the disturbed production of gonadal steroids. Patients with severe TB suffer a significant decrease of testosterone production, which is apparently the consequence of testicular production of proinflammatory cytokines produced by diverse cells in absence of local infection. Testosterone is a significant anabolic hormone and its low production could contribute to affect the patient condition worsening the course of the disease.

**Acknowledgments:** This study was supported by CONACyT (contract: 84456).

## References

1. World Health Organization. World health report. WHO report 2013. Available at: [www.who.int/whr/en/](http://www.who.int/whr/en/)
2. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:581-91.
3. Eskandari F, Sternberg EM. Neural-Immune Interactions in Health and Disease. *Ann NY Acad Sci* 2002;966:20-7.
4. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neuroscience* 2013;53:77-85.
5. del Rey A, Mahuad CV, Bozza V, Bogue C, Farroni MA, et al. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun* 2007;21:171-9.
6. Santucci N, D'Attilio L, Kovalevski L, Bozza V, Besedovsky H, et al. A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE* 2011, 6:e26363.
7. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 1998;338:171-9.
8. Keven K, Uysal AR, Erdogan G. Adrenal function during tuberculous infection and effects of antituberculosis treatment on endogenous and exogenous steroids. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:419-24.
9. Rook GA, Hernandez-Pando R. Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids and antiglucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology* 1997;22:Suppl 1:S109-13.
10. Bini E, Bottasso O, Hernandez Pando R. Immunity, sex hormones and infection. *Advances in Neuroimmune Biology* 1: 2011;1:163-77. DOI: 10.3233/NIB-2011-010
11. Hales, DB. Cytokines and Testicular Function. In *Cytokines and Reproduction*, Hill, J.A. ed. John Wiley & Sons, NY, NY, 2000. Chapter 2, pp. 17-42.
12. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinology* 2004;215:135-41.
13. Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, Reddy MC, Roy KR, et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol* 2006;22:493-500.

14. O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology* 2000;141:238-46.
15. Stephan JP, Syed V, Jegou B. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997;134:109-18.
16. Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod* 1995;53:1407-16.
17. Boockfor FR, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology* 1994;134:2150-5.
18. Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jegou B. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat Sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. *Endocrinology* 1997;138:2863-70.
19. Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. The influence of collagenase treatment on the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. *J Immunol Methods* 2005;301:186-9.
20. De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 1993;133:389-396.
21. Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech* 2009;72:620-8.
22. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Cravioito C, Straub RH. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical and gonadal functions in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 992:107-17.
23. Tengstrand B, Carlström K, Hafström I. Gonadal hormones in men with rheumatoid arthritis - from onset through 2 years. *J Rheumatol* 2009; 36: 887-92.
24. Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Raptis SA, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1271-6.
25. Bongiovanni B, Díaz A, D'Attilio L, Santucci N, Dídoli G, et al. Changes in the immune and endocrine responses of patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. *Ann NY Acad Sci* 2012;1262:10-5.
26. Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, Urizar L, Rondelli CF, 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* 1999;49:210-7.

27. Toossi Z, Ellner JJ. The role of TGF- $\beta$  in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:107-14.

28. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 447–53.

29. Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction* 2006;132:233-46.

30. Gnessi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997;18:541-609.

31. Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:379-84.

32. D'Attilio L, Bozza VV, Santucci N, Bongiovanni B, Dídoli G, et al. Inhibition of DHEA production by factors released from *M. tuberculosis*-stimulated peripheral blood mononuclear cells is abrogated by transforming growth factor- $\beta$  neutralization. *Ann NY Acad Sci* 2012;1262:1-9.

33. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3313-18.

34. Kissicka HT, Sandab MG, Dunna LK, Pellegrinic KL, Ona ST, et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *PNAS* 2014;111:9887-92.

Table 1. Testosterone concentration in culture supernatants from TM3 cells cultured under different conditions.

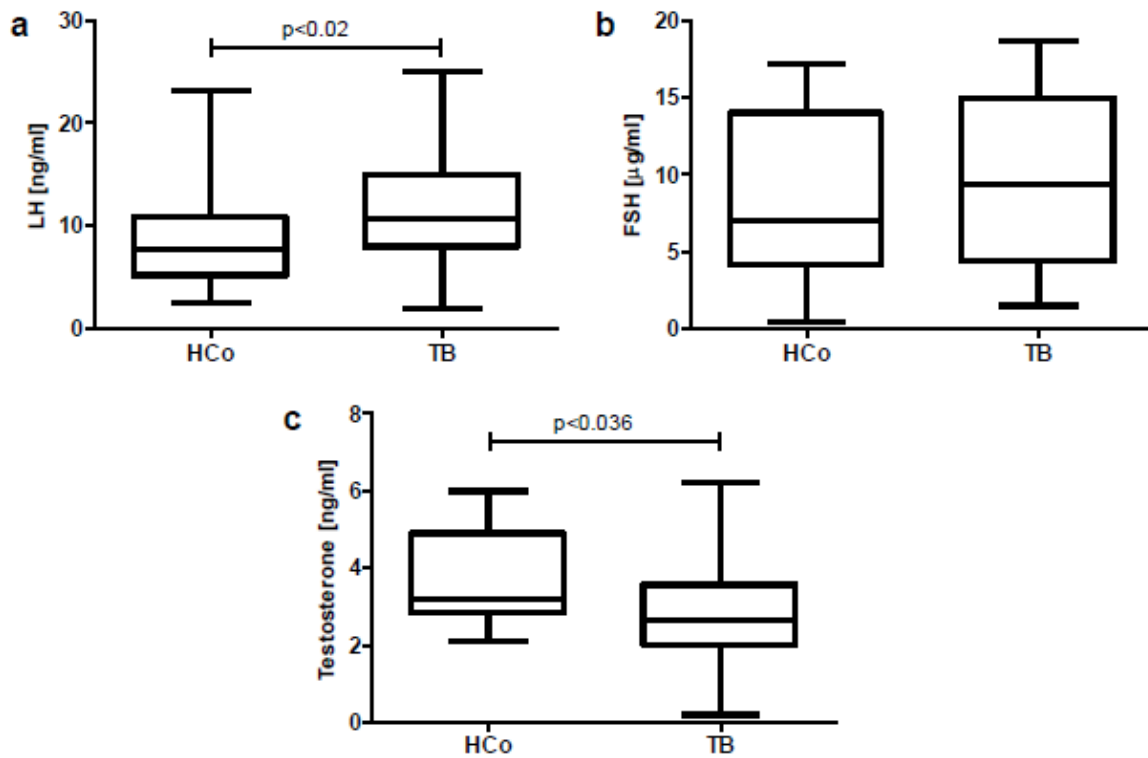
| Treatments    | Testosterone levels (ng/ml) <sup>a</sup> |
|---------------|--|
| TNF- $\alpha$ | 0.119 $\pm$ 0.012                        |
| TGF- $\beta$  | 0.102 $\pm$ 0.042                        |
| IFN- $\gamma$ | 0.130 $\pm$ 0.026                        |
| Control       | 5.740 $\pm$ 0.026 *                      |

Recombinant cytokines TNF- $\alpha$  5ng/ml, or IFN- $\gamma$  4000 pM, or TGF- $\beta$  1ng/ml were added to TM3 cells together with hCG to stimulate basal testosterone production. Control cultures were stimulated with hCG. Testosterone concentration in the media in which Leydig cells were cultured was assessed 24 hr later in duplicate.

<sup>a</sup>Data represent the mean of triplicate determinations  $\pm$  SEM of a representative experiment from two independent experiments performed under similar conditions.

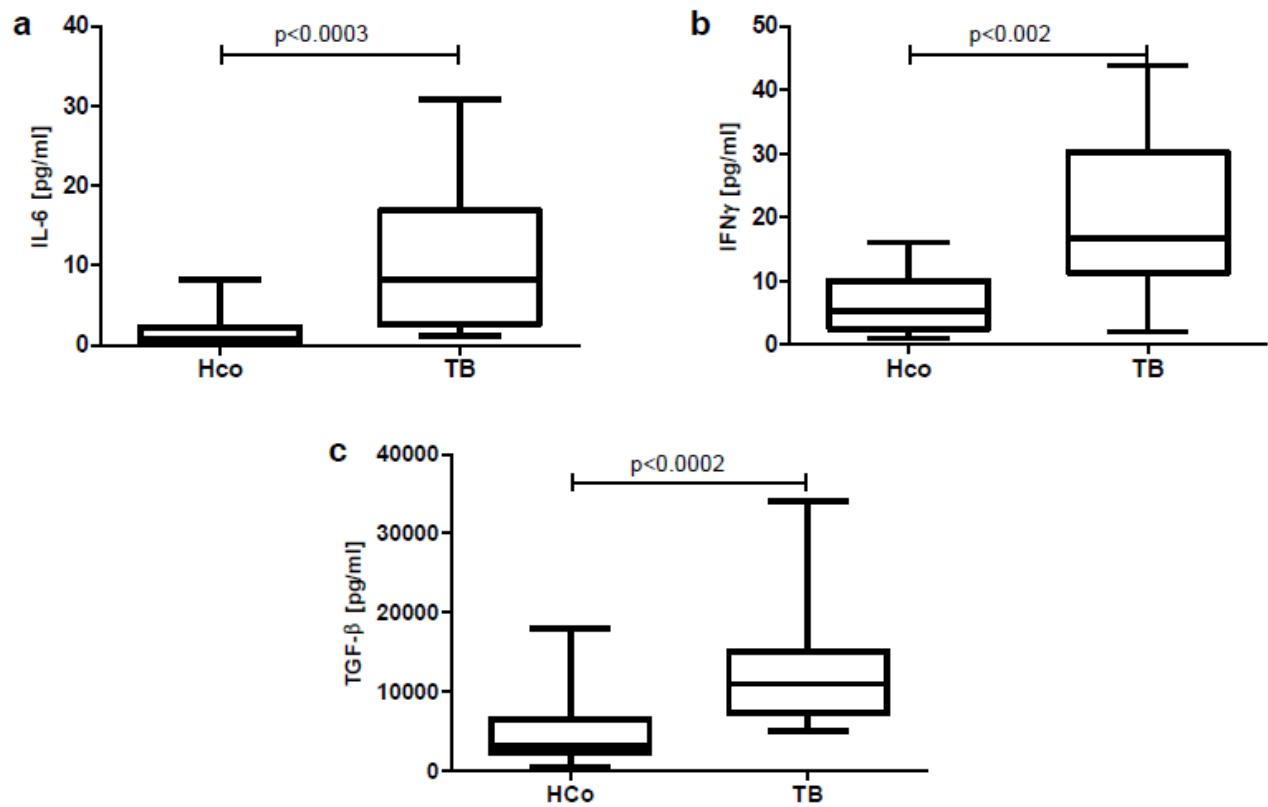
\*Significantly different from the remaining groups  $p < 0.001$

**Figures:**

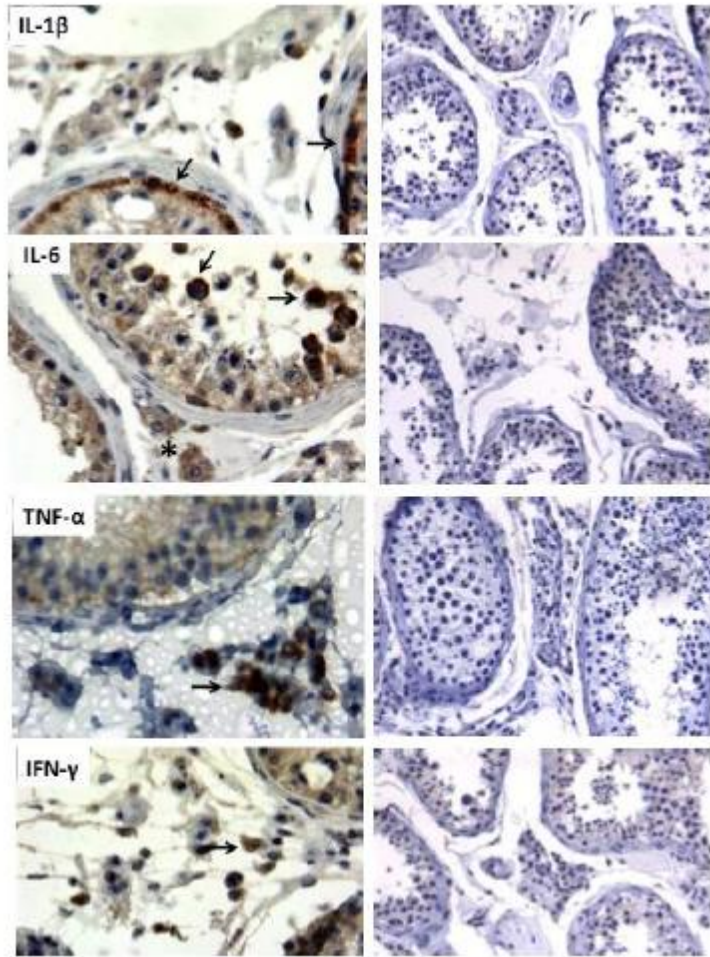


**Figure 1:** Circulating levels of hormones in patients with active pulmonary TB and healthy controls (HCo). Box plots show 25–75 percentiles of data values in each group with maximum and minimum values. The line represents the median values. Comparisons between groups (TB vs HCo) were performed by non-parametric methods (Mann–Whitney U test).





**Figure 2:** Circulating levels of cytokines in patients with active pulmonary TB and healthy controls. Box plots show 25–75 percentiles of data values in each group with maximum and minimum values. The line represents the median values. Comparisons between groups (TB vs HCo) were performed by non-parametric methods (Mann–Whitney U test).



**Figure 3:** Representative immunohistochemistry for cytokines detection in testicular tissue. Sections from TB autopsy cases (left row) and control cases from subjects dying from causes other than TB (right row), were incubated with specific antibodies to detect the indicated cytokines. Sertoli cells showed strong positivity in their cellular base for IL-1 $\beta$  (arrows), spermatogonia exhibited strong immunostaining to IL-6 (arrows) and mild reactivity in interstitial macrophages (asterisk), while strong TNF $\alpha$  immunostaining was seen in interstitial macrophages (arrow). Occasional macrophages and lymphocytes in the testicular interstitium showed positivity to IFN $\gamma$ . Control tissues were negative to all tested cytokines (TB tissues magnification 200x, control tissue magnification 100x).

# INTRODUCCIÓN

## 1- INTRODUCCIÓN

### 1-1 La Tuberculosis

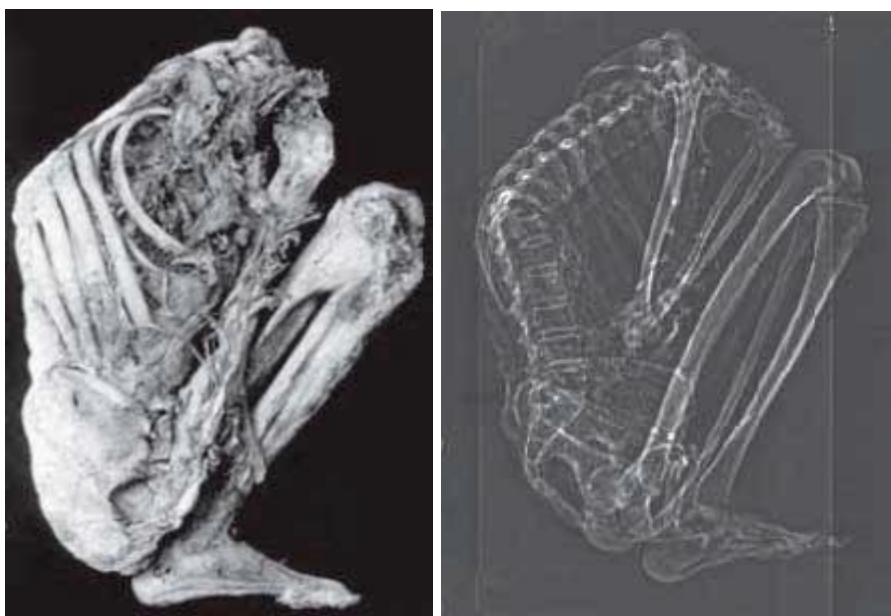
#### 1-1.1 Historia de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) ha estado presente entre nosotros previo a los comienzos de la historia documentada y dejó su marca en la creatividad humana, música, arte y literatura. Influyó en el desarrollo de las ciencias biomédicas y en el cuidado de la salud. Su agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, ha llevado a la muerte a más personas que cualquier otro patógeno bacteriano (Palomino, L. y cols, 2007).

##### 1-1.1.1 La Tuberculosis en tiempos primitivos

Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años, probablemente, un ancestro de *Mtb* co-evolucionó con los primeros homínidos en África del este, hace 3 millones de años. El complejo actual de *Mtb* se habría originado a partir un progenitor común entre 15000 y 35000 años atrás (Gutierrez, M. C. y cols, 2005).

Los documentos acerca de la TB datan desde hace 5000, 3300 y 2300 años atrás en Egipto, India y China, respectivamente. En momias egipcias y andinas se han observado las anomalías esqueléticas típicas como las deformidades descritas por Pott.



**Fig 1:** Izquierda: Momia 003, Museo Arqueológico de la Casa del Marqués de San Jorge, Bogotá, Colombia. Derecha: Se muestran por tomografía computarizada las lesiones en los cuerpos vertebrales de T10/T11 (reproducido de Sotomayor 2004 con permiso).

Una herramienta importante para la investigación de la ocurrencia y distribución de la TB en tiempos históricos, ha sido la identificación de material genético de *Mtb* en muestras pretéritas. En esta búsqueda, se pudo identificar ADN de la micobacteria en lesiones de huesos de la columna de un esqueleto humano masculino de la edad de hierro, en Dorset, UK. También se halló dicho ADN en muestras de piel de la región pélvica de momias andinas, que podrían situarse entre 140 a 1200 años D.C. con el método del C<sup>14</sup> (Palomino, L. y cols, 2007).

### 1-1.1.2 Phthisis o Consunción

*...”The patients suffer from a latent fever that begins towards evening and vanishes again at the break of day. It is accompanied by violent coughing, which expels thin purulent sputum. The patient speaks with a hoarse voice, breathes with difficulty and has hectically flushed cheeks. The skin on the rest of the body is ashen in color. The eyes have a weary expression, the patient is gaunt in appearance but often displays astonishing physical or mental activity. In many cases, wheezes are to be heard in the chest, and when the disease spreads, sweating is seen on the upper parts of the chest.*

*The patients lose their appetite or suffer hunger pangs. They are often also very thirsty. The ends of the fingers swell and the fingernails curve greatly.”..*

*Caelius Aurelianus, 5th century AD (Herzog 1998)*

El término **tisis (phthisis)** que significa *consunción*, apareció por primera vez en la literatura griega. Alrededor del 460 A.C., Hipócrates identificó a la tisis como una enfermedad de gran relevancia. Se daba generalmente entre los 18 y 35 años de edad y resultaba habitualmente fatal. A pesar de que Aristóteles (384-322 A.C.) la consideraba contagiosa, la mayoría de los autores griegos creían que era hereditaria, a raíz de la debilidad mental y moral de los individuos. Claudio Galeno (131-201 D.C.), el médico griego más eminente después de Hipócrates, definió a la tisis como una ulceración de los pulmones, pecho o garganta, acompañada de tos, fiebre de poca cuantía y pérdida de peso a raíz de la presencia de pus. También la describió como una enfermedad de la malnutrición (Palomino, L. y cols, 2007).

### 1-1.1.3 La Plaga Blanca

Conocida bajo esta denominación, la epidemia de TB en Europa comenzó a principios del siglo XVII y continuó por 200 años. La muerte por TB era considerada inevitable y hacia 1650 era principal causa de mortalidad. La alta densidad poblacional, hacinamiento y las pobres condiciones sanitarias que caracterizaron a las grandes ciudades de Europa y Norteamérica, proveyeron el ambiente necesario para la diseminación aérea de este patógeno. La epidemia se propagó lentamente a otros continentes con el comienzo de la exploración y colonización.

Si bien la TB existía en América antes de la llegada de Colón, era muy poco frecuente entre los nativos. Los brotes más importantes de TB entre los indígenas de Norteamérica comenzaron en 1880, luego de ser confinados en reservaciones o forzados a vivir en las barracas de las prisiones (Palomino, L. y cols, 2007).

La TB era poco frecuente entre los africanos que vivían en pequeñas villas remotas. Cuando fueron expuestos a la enfermedad, por contacto con europeos, experimentaron una alta tasa de mortalidad. Los africanos tomados como esclavos no tenían TB cuando arribaron a América. Pero luego desarrollaron casos fatales de TB. Tras la abolición de la esclavitud, se dirigieron a las ciudades lo cual favoreció que la morbilidad y mortalidad por TB creciera rápidamente, con un incremento del 700% en 1912 (Palomino, L. y cols, 2007).

En el siglo XVIII, esta enfermedad fue considerada como vampirismo, a raíz de creencias folklóricas surgidas de dos hechos: En primer lugar se veía que luego de la muerte por consunción de un miembro de la familia, los convivientes perdían lentamente su salud, supuestamente porque los muertos retornaban como vampiros para drenar la vida de los sobrevivientes. En segundo lugar las personas que tenían TB exhibían síntomas similares a aquellos asociados con rasgos de vampiros, como ojos rojos e hinchados, sensibilidad a la luz brillante, piel pálida y tos con expectoración de sangre. (Palomino, L. y cols, 2007).

Desposeído de estas creencias, Franciscus Sylvius de la Bøe, de Amsterdam (1614-1672) fue quien estableció las primeras descripciones anatómicas y patológicas precisas de la enfermedad. Fue el primero en identificar los **tubérculos** característicos en los pulmones y otras áreas de los pacientes con consunción. Describió además la progresión de las lesiones, de tubérculos a úlceras y cavidades, atento a la expresión latina **tuber** que hace referencia a todo tipo de protuberancias degenerativas o tubérculos. (Palomino, L. y cols, 2007)

El médico inglés Richard Morton (1637-1698) confirmó que los tubérculos estaban siempre presentes en los pulmones de los pacientes con TB, y describió que la enfermedad tenía tres estados: inflamación (con formación de tubérculos), ulceración y tisis.

El nombre “**Tuberculosis**” apareció por primera vez, en conexión con la teoría de Bayle, y fue acuñado por el profesor alemán Johann Lukas Schönlein (1793-1864) para describir aquellas enfermedades que presentaban tubérculos. (Palomino, L. y cols, 2007)

### 1-1.1.4 El descubrimiento del bacilo

*..”Not bad air, not just a weakness of the infected human body’s immune system, not any of the myriad theories that had filled the puzzled heads of his audience all of their working lives...but a bacterium. Not just a bacterium, but a bacillus the like of which had never been even suspected before, a most singular life form, with a frightening propensity to infect every cat and chicken, pigeon and guinea pig, the white mice and rats, oxen and even two marmosets, into which Koch had injected it...”*

*The Forgotten Plague: How the War against Tuberculosis was Won - and Lost*  
Frank Ryan, 1992

En 1546, Girolamo Fracastoro (1478-1553) explicaba en su libro *The Morbus Contagiosus*, la naturaleza contagiosa de la TB, indicando que las sábanas y ropas podían contener partículas contagiosas, capaces de sobrevivir por más de dos años, aludiendo a esas partículas como sustancias químicas.

En 1720, Benjamin Marten (1704-1722), en su publicación *A New Theory of Consumptions*, fue el primero en conjeturar que la TB podía ser causada por “diminutas criaturas vivientes”, que tras ingresar en el cuerpo, podían generar las lesiones y síntomas de la tisis, y que uno podía contagiarse de consunción por compartir la cama, comida o bebida o bien estando muy próximo físicamente.

Jean-Antoine Villemin (1827-1892) demostró que la consunción podía transmitirse de los humanos al ganado, y del ganado a los conejos, y, basado en esto, postuló que un microorganismo específico causaba la enfermedad.

La tarde del 24 de marzo de 1882, Robert Koch (Fig 2) (1843-1910) hizo su presentación *Die Aetiologie der Tuberculose*, ante la Sociedad de Fisiología alemana, tan prominente como escéptica. Koch utilizaba un medio de cultivo compuesto por papa y agar, para obtener cultivos puros de bacteria, que colocaba en placas especiales diseñadas por su colega Julius Richard Petri (1852-1921). Koch había diseñado además nuevos métodos para teñir bacterias, basado en azul de metileno, un colorante desarrollado por Paul Ehrlich (1854-1915), y explicaba que vistos al microscopio, las estructuras de tejidos animales se veían marrones, mientras que las bacterias de los tubérculos eran de un azul excelente. Luego demostró que el bacilo

estaba siempre presente en los tejidos afectados de TB, que podía crecer en medio sólido y que, sin importar la vía de infección o la especie animal, cuando inoculaban cobayos con material de personas o ganado muertos por TB, los mismos desarrollaban enfermedad. Así concluye afirmando que el bacilo no sólo acompaña a la tuberculosis sino que la causa, y que el mismo es el verdadero agente de la enfermedad. (Palomino, L. y cols, 2007)



*Fig 2: Robert Koch*

### **1-1.1 La Tuberculosis: una enfermedad de emergencia global**

Según los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB es la segunda causa de muerte, luego del VIH/SIDA, producida por un único agente infeccioso.

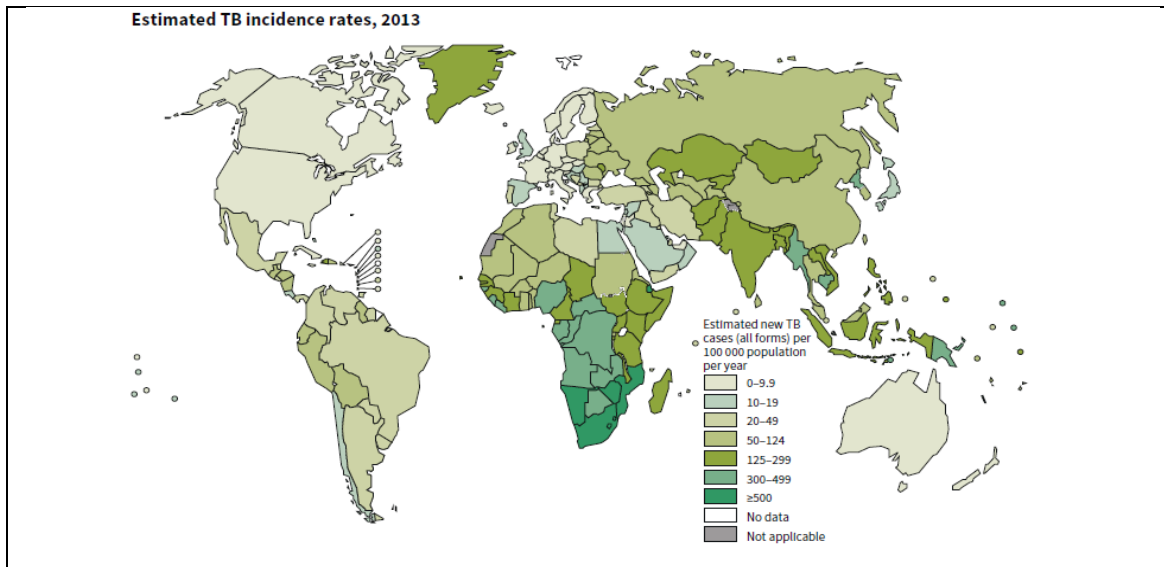
En el año 2013, 9 millones de personas se enfermaron de TB, y 1,5 millones murieron por esta causa. Más del 95% de las muertes por TB ocurren en países de ingresos económicos bajos o medios. En ese mismo año, se calcula que 550.000 niños se enfermaron de TB, y 80.000 VIH-negativos, murieron por esta enfermedad. En el caso de la co-infección con VIH, la TB es la causa más frecuente de decesos entre las personas HIV-positivas. (WHO, 2013).

Durante el 2013, alrededor de 480 000 personas desarrollaron TB multi-resistente (MDR-TB), de los cuales el 9% resultó ser TB extremadamente resistente a las drogas (XDR-TB). (WHO, 2013).

Aproximadamente, 37 millones de personas afectadas entre los años 2000 y 2013, se repusieron a la TB gracias al diagnóstico y tratamiento. (WHO, 2014).



## Tasa Estimada de Incidencias, 2013



**Fig 3:** Tasa de Incidencias, 2013, según Global Reports, WHO 2014

De una cifra aproximada de 9 millones de personas con TB en el año 2013, el 56% se ubicaban en países del sudeste asiático y regiones del Pacífico Oeste, el 25% a países de África, donde además se registra la tasa más alta de casos y decesos en relación con el índice poblacional (Fig 3) (WHO, 2014).

### 1-1.3 Agente causal

Las micobacterias pertenecen al *Phylum* de las *actinobacterias*, clase *actinobacterias*, subclase *actinobacteridae*, orden *actinomycetales*, suborden *corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. Son bacilos ligeramente curvos, de 2-10  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho. Su longitud es comparable al diámetro del núcleo de un linfocito, son aerobios, inmóviles, no esporulados y de crecimiento lento (60 veces menor al de un estafilococo) con un tiempo de duplicación que varía de 14-24 horas. Obtienen su energía de la oxidación de compuestos simples de carbono (Caminero, J. A. y cols, 2003).

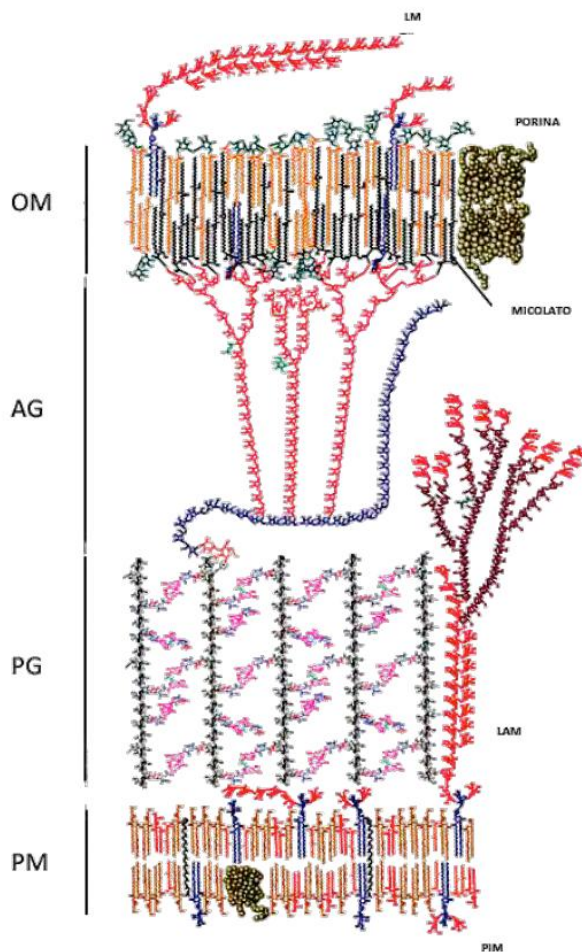
La característica lipídica de su pared celular, contribuye al crecimiento lento debido a la restricción en la captación de nutrientes. Para teñirlos se utiliza la técnica de *Ziehl-Neelsen* y, aunque se tiñen con dificultad, una vez logrado resisten la decoloración, por lo que se les denominan bacilos ácido-alcohol resistentes.

La firmeza de la pared micobacteriana se debe al alto contenido de ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga entrecruzados y otros lípidos de la pared

celular (Fig 4). Estos lípidos como la arabinogalactana y la peptidoglicana le confieren muy baja permeabilidad, causa de la ineficacia de muchos antibióticos. Otra molécula de la pared micobacteriana es la lipoarabinomanana (LAM) que está relacionada con la viabilidad de *Mtb* dentro del macrófago (MØ) (Caminero, J. A. y cols, 2003; Kaur, D. y cols, 2009). El genoma de *Mtb* comprende aproximadamente 4,000 genes y presentan altas cantidades de nucleótidos de guanina y citosina (Camus, JC. y cols, 2002). Gran parte de su genoma está relacionado con enzimas responsables de la síntesis de su pared celular. Según la clasificación funcional de su genoma, 233 genes están relacionados con el metabolismo de lípidos y 708 genes están relacionados con la pared celular y procesos celulares (Camus, J. C. y cols, 2002).

Cuando *Mtb* se encuentra en un ambiente con baja tensión de oxígeno y pH bajo, entra en estado “quiescente” donde su tasa de multiplicación disminuye hasta por años (Caminero, J. A. y cols, 2003). *Mtb* es resistente al frío, la congelación y la desecación, sin embargo es muy sensible a la luz solar, luz ultravioleta y el calor (Caminero, J. A. y cols, 2003)

- PM = membrana plasmática
- PG = peptidoglicana
- OM = membrana exterior
- PPM = poliprenol-monofosfo-manosa
- PI = fosfatidil-*myo*-inositol
- PIM = fosfatidil-*myo*-inositol manósidos
- LM = lipomanana
- LAM = lipoarabinomanana
- Gal $p$  = galacto-piranososa
- Gal $f$  = galacto-furanosa
- myo*-Ins = *myo*-Inositol
- Man $p$  = mano-piranososa
- Ara $f$  = arabino-furanosa

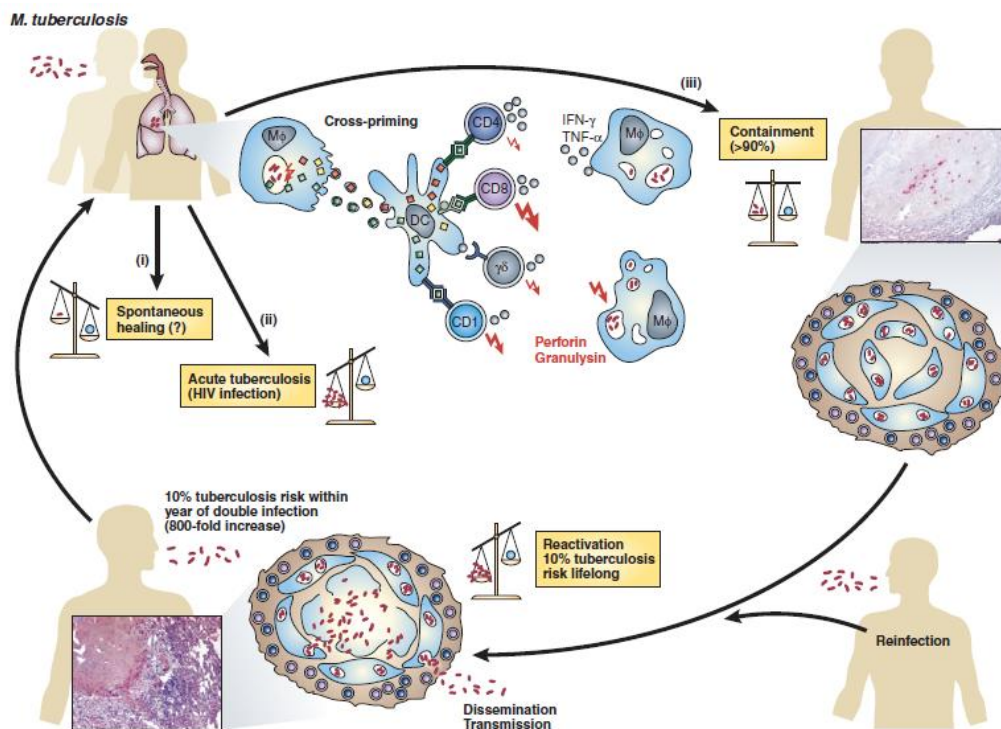


**Fig 4: Pared micobacteriana.** Una revisión sobre la envoltura celular de *Mtb*. muestra los lípidos extraíbles que están en la membrana exterior y que incluyen PIMs y aciltrehalosas, mientras que aquellos de la membrana plasmática incluyen fosfolípidos y PIMs. Los residuos Galf y Araf de la arabinogalactona (AG) están representados en azul y rojo, respectivamente. Los residuos succinil y galactosamina de la AG están en verde. Los residuos Manp en PIM, LM y LAM están en rojo; los residuos Araf en color violeta (Kaur, D. y cols, 2009).

Cada partícula <math><5\ \mu\text{m}</math> que se produce por la tos o el estornudo de una persona enferma bacilífera puede contener aproximadamente 3 micobacterias, y se calcula que se requieren 10-200 micobacterias para desarrollar la infección tras un contacto “exitoso” (Caminero, J. A. y cols, 2003).

### 1-1.4 Diseminación y Transmisión de la Tuberculosis

Al ingresar en el organismo el *Mtb* sigue diferentes destinos (Fig 5)



**Fig 5: Diferentes destinos de la Infección con *M. tuberculosis*.**

Cuando *Mtb* ingresa al organismo a través de microgotas inhaladas, pueden ocurrir tres desenlaces: (i) eliminación inmediata de *Mtb* por la respuesta inmune local (rara vez); (ii) progresión de la infección hacia TB; (iii) contención de la enfermedad dentro del granuloma. Esto no conduce a enfermedad pero deja la posibilidad de que se produzca una reactivación de la infección, con la consecuente diseminación y transmisión de la bacteria. La calidad de la respuesta inmune determinaría el destino de la infección. Luego de la inhalación, *Mtb* es

*internalizado por MØ alveolares y células dendríticas. En los nódulos linfáticos drenantes, estas células presentan antígenos micobacterianos a distintas poblaciones de células T. La presentación antigénica promueve la activación de células T antígeno específicas, células T CD4, células T CD8, células T  $\gamma\delta$  y células T CD1- restringidas, las cuales participan de la respuesta protectora. Las células T pueden eliminar a las micobacterias a través de la actividad citotóxica mediada por perforina, y granzima. A su vez, la activación de la actividad microbicida de los macrófagos, inducida por TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  es central en el desarrollo de la respuesta protectora frente a Mtb (Tomado de Kaufmann S. H, McMichael A; 1995).*

### **1-1.5 Eventos durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.**

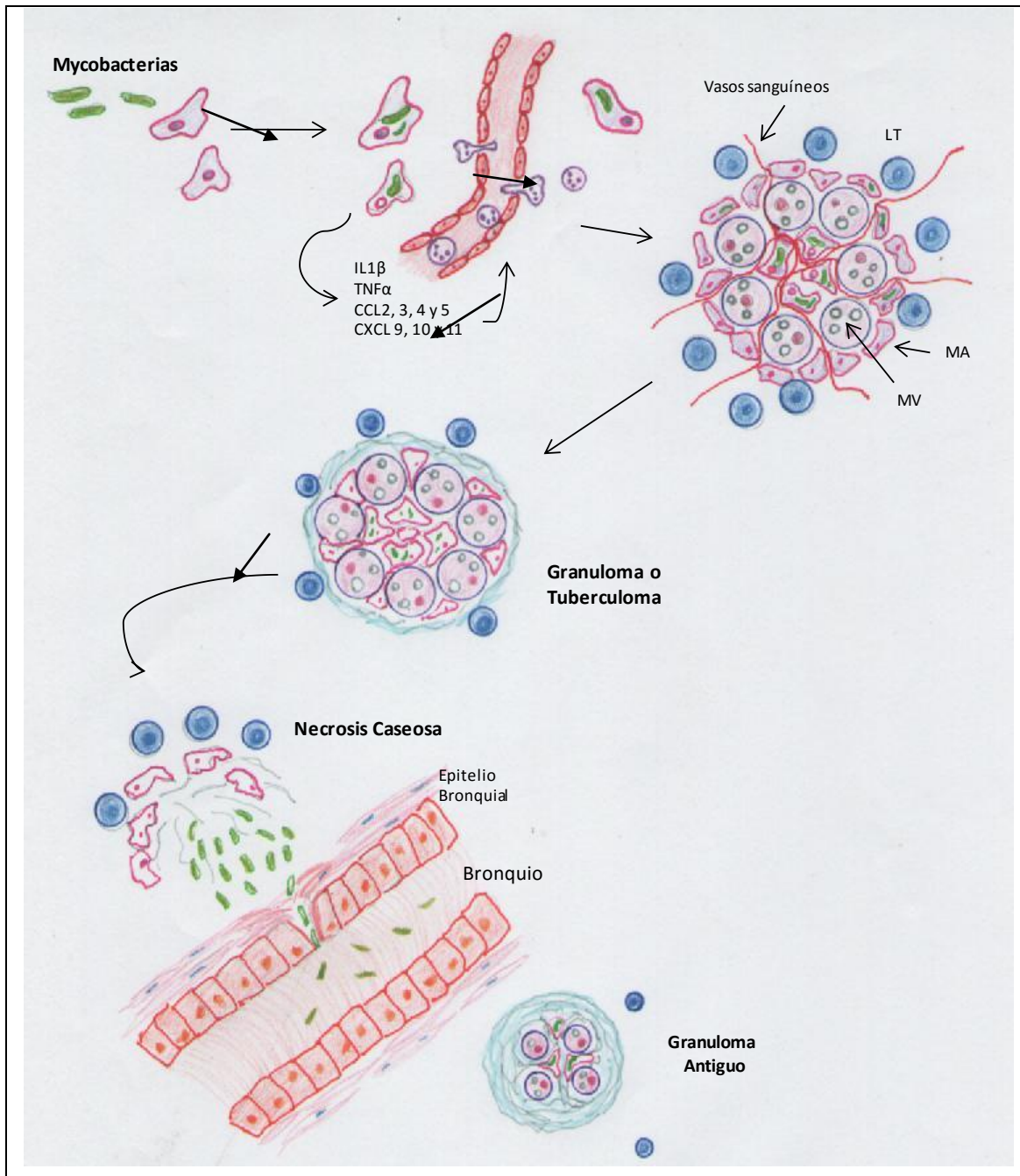
I. Inhalación e inmediata eliminación de *Mtb* por la capacidad microbicida de los MØ alveolares (MØA) y la inmunidad innata (Fig 5). En este caso el hospedero no montará una respuesta inmune adaptativa y no se generará memoria por lo que la prueba PPD será negativa (Van Crevel, R. y cols, 2002).

II. Evasión de la respuesta inmune innata y destrucción de MØA por multiplicación intracelular de *Mtb*, reclutamiento de células inflamatorias y monocitos periféricos al sitio de infección. Estos monocitos se diferencian en MØ que endocitan a *Mtb* sin destruirlo, lo que permite el crecimiento exponencial micobacteriano, mayor reclutamiento de monocitos y daño tisular mínimo (Van Crevel, R. y cols, 2002).

III. Dos a tres semanas después de la infección, en modelos murinos, o 42 días después de la infección en humanos, se reclutan linfocitos T antígeno específicos que proliferan alrededor de las lesiones tempranas y posteriormente activan a los MØ en el sitio de infección aumentando su capacidad microbicida y limitando el crecimiento micobacteriano. El detenimiento del crecimiento micobacteriano logarítmico caracteriza esta tercera fase (Van Crevel, R. y cols, 2002; Ernst, J. D. 2012). Las células inmunes activadas por la presencia de *Mtb* se organizan en una estructura que tiene por principal objetivo la contención y destrucción del agente agresor (Russell, D. G. y cols, 2007). Esta estructura, denominada **granuloma**, se define como un tipo de inflamación crónica, caracterizado por la congregación de numerosos linfocitos y macrófagos que se organizan formando nódulos de límites precisos. Existen múltiples agentes infecciosos intracelulares que inducen la formación de granulomas inmunológicos, pero *Mtb* es el prototipo de agente infeccioso granulomatogénico, de hecho en esta

enfermedad los granulomas distinguen a esta entidad y es por esto que también se les conoce como **tuberculomas**.

Morfológicamente, el granuloma está constituido en su parte central por un acúmulo de MØ infectados, muchos de los cuales son activados como consecuencia de su interacción con citocinas producidas por ellos mismos como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o por los linfocitos T (LT) como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (Fig 6). Alrededor de los mismos es frecuente la presencia de MØ vacuolados que constituyen una fuente importante de citocinas anti-inflamatorias como el TGF $\beta$  o IL-10 (Hernández-Pando, R. y cols, 1997). En la parte periférica existe un manto de linfocitos, generalmente de tipo CD4 Th1 que sintetizan citocinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$  o IL-12. También se observan LT CD8+ y en menor cantidad linfocitos B (LB). Todo esto rodeado de una cápsula de tejido fibroso. (Bini, E. I. y cols, cap 20 "Neuroinmunología", en prensa).



Bini - Hernández Pando, Cap 20 "Neuroinmunología"

**Fig 6: Progresión del granuloma:** Cuando las micobacterias ingresan por las vías respiratorias, son fagocitadas por los macrófagos alveolares, quienes se activan e inducen una respuesta pro-inflamatoria localizada, producida por el reclutamiento de leucocitos provenientes de vasos sanguíneos cercanos. Los linfocitos y los macrófagos, fundamentalmente, se organizan formando una estructura nodular que corresponde al granuloma y que tiene como principal objetivo la contención y destrucción de las micobacterias. Cuando la enfermedad progresa y el número de micobacterias aumenta, se produce necrosis de las áreas centrales del granuloma, (necrosis caseosa), que se acompaña con destrucción del tejido vecino, fundamentalmente de la pared de los bronquios. Esto permite que se libere al lumen de los bronquios, el contenido necrótico con abundantes micobacterias. Cuando ese material se expectora, se libera una gran cantidad de micobacterias viables al aire, transmitiéndose así a los convivientes cercanos. Si las micobacterias se contienen y el

*granuloma envejece, la lesión se fibrosa, quedando escasos linfocitos y macrófagos que mantienen dentro del granuloma, micobacterias vivas escasas. El ambiente hipóxico predominante en ellos, induce a las micobacterias a mantenerse en estado de latencia, pudiendo reactivarse si se presenta un estado de inmunosupresión. (Bini, E. I. y cols cap 20 “Neuroinmunología”, en prensa)*

**IV.** La progresión de la infección a la enfermedad y la diseminación hematógena pueden ocurrir tras la infección primaria (TB primaria) o después de meses o décadas de infección latente (reactivación de la TBL) (Ernst, J. D. 2012). El *Mtb* puede persistir en varios sitios y tipos de células extrapulmonares en casos donde hubo diseminación hematógena constituyendo un reservorio capaz de producir formas reactivas de TBL extrapulmonar sin compromiso pulmonar (Barrios-Payán, J. y cols, 2012). La reactivación de la TB debe ser distinguida de los casos de reinfección por una segunda cepa virulenta de *Mtb* que puede ocurrir incluso en individuos inmunocompetentes (Ernst, J. D. 2012). Sin embargo, la mayoría de los casos de TB en adultos son atribuibles a la reactivación excepto en las regiones geográficas con una prevalencia de TB extremadamente alta (Ernst, J. D. 2012). La licuefacción de la necrosis central permite el crecimiento extracelular de *Mtb* y la cavitación puede alcanzar la luz de un bronquio convirtiendo al enfermo en bacilífero (Van Crevel, R. y cols, 2002). Se considera que la única forma natural transmisible de la infección de la TB es la pulmonar (Ernst, J. D. 2012).

Si bien la TB es una enfermedad que compromete esencialmente a los pulmones, también pueden afectarse otros órganos y tejidos. La forma más severa de TB extrapulmonar es la cerebral, que ocurre fundamentalmente en niños, en países en desarrollo. La forma más frecuente es la TB Meníngea, la cual usualmente comienza con la infección por vía respiratoria, seguida de una temprana diseminación por vía hematógena a sitios extrapulmonares. La forma cerebral es fatal en el 30% de los casos, y en el 50% que sobrevive, quedan secuelas. (Bini, E. I. y cols, 2014<sup>a</sup>).

### **1-1.6 Tratamiento de la TB**

El régimen estándar recomendado por la OMS, para un paciente que se presume inicialmente como susceptible a los antimicrobianos, incluye la terapia combinada de:

Isoniazida, que inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos de la pared de la micobacteria,

Rifampicina, inhibe la síntesis de ARN de la bacteria,

Pirazinamida, genera un desbalance en el pH micobacteriano,

Etambutol, afecta la polimerización de lipoarabinomanano y arabinogalactano de la pared de la micobacteria (Villemagne, B. y cols, 2012)

Si el paciente adhiere bien al tratamiento, el régimen es, en general, altamente efectivo. Sin embargo, a largo plazo, es tóxico por lo que los pacientes suelen discontinuarlo. En consecuencia, la enfermedad recrudece y aumenta la tasa de MDR-TB, y las cepas XDR-TB y totalmente resistentes. Esta razón ha motivado la búsqueda e investigación de nuevas drogas y estrategias de tratamiento (Bini, E. I. y cols, 2014<sup>b</sup>).

### **1-2 La Reacción defensiva a grandes rasgos**

Durante procesos nosológicos de distinta naturaleza, tales como enfermedades infecciosas, el individuo reacciona con una respuesta defensiva denominada la respuesta de fase aguda (RFA), caracterizada por alteraciones inmunológicas, metabólicas, neuroendócrinas y hasta conductuales. Dentro de estas últimas se incluyen componentes del síndrome febril tales como somnolencia, letargo, depresión y anorexia, en su conjunto designadas como comportamiento patológico. Esta reacción de adaptación intenta ser beneficiosa para el huésped, al menos durante la etapa inicial del proceso. No obstante, una RFA excesiva o prolongada acaba comprometiendo al organismo y favorece el desarrollo de patología (Baumann, H. y cols, 1994; Hart, B. L. 1990).

La información disponible apunta a que las citocinas y las hormonas participan activamente en estos procesos a través de acciones centrales y periféricas. Este tipo de comunicación requiere de la participación de factores neuroendócrinos e inmunológicos de variada índole. En los años '70, Besedovsky y cols., demostraron que las células integrantes de los sistemas inmune, endócrino y nervioso comparten receptores para citocinas, hormonas y neuropéptidos, proveyendo así una base molecular para entender las influencias de los mediadores producidos por respuestas generadas en alguno de estos sistemas sobre la actividad de los restantes. (Besedovsky, H. y cols, 1996).

Para una descripción más pormenorizada, se abordarán por separado, resaltando los aspectos más salientes de ambos sistemas en términos de esta interrelación. Se pondrá un cierto énfasis en torno a las funciones inmunoreguladoras de las distintas hormonas y factores liberadores.

### **1-3 El Sistema Endócrino**



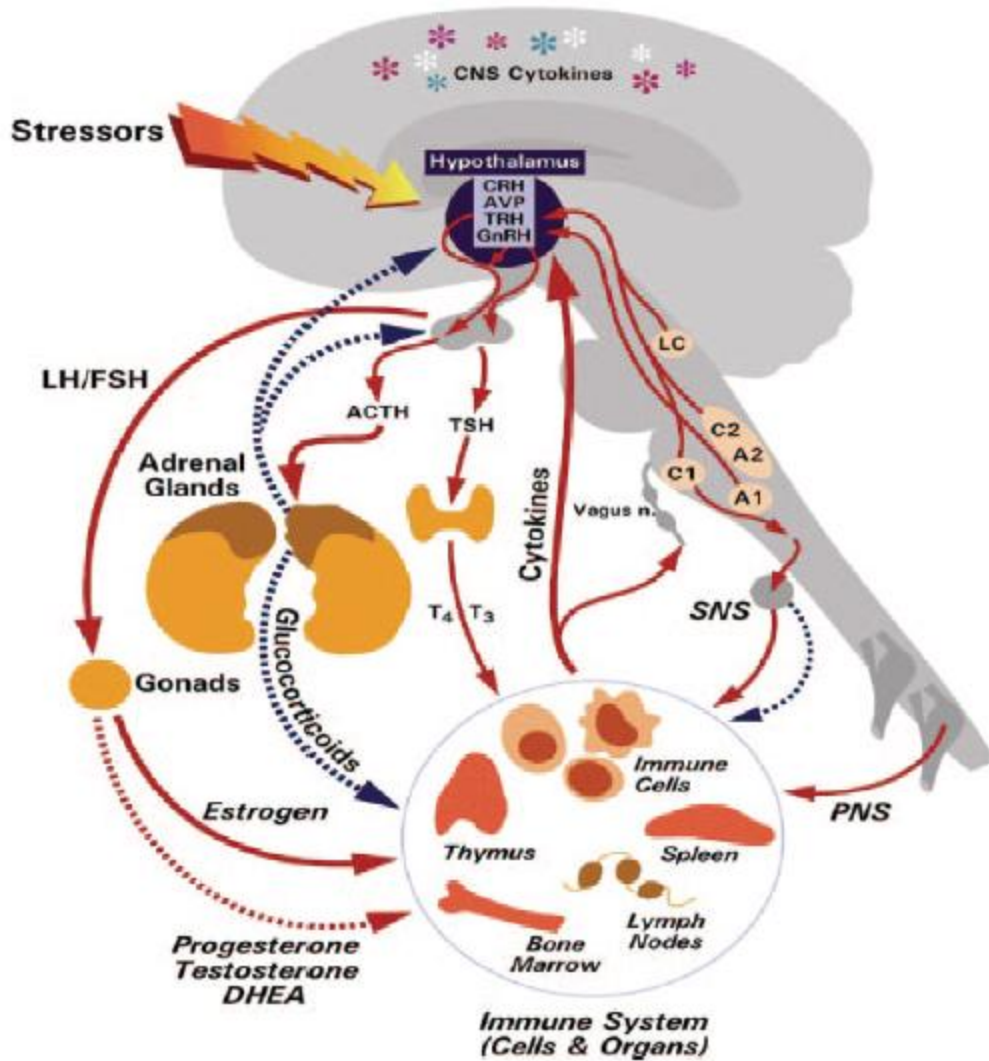
### **1-3.1 El Hipotálamo**

El Hipotálamo es el responsable de coordinar el sistema endócrino, recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo a la vez que interpreta estímulos ambientales como temperatura e iluminación, y promueve importantes acciones regulatorias periféricas. En respuesta a variados estímulos y mediante la liberación de hormonas peptídicas, la dupla hipotálamo-hipófisis regula la actividad de componentes claves del sistema endócrino como la tiroides, suprarrenales y gónadas (Fig 7).

### **1-3.2 Vías de Señalización Neuroendócrina**

A partir de las relaciones establecidas entre el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas mencionadas se conforman tres sistemas conocidos como:

- Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HHA)
- Eje Hipotálamo-Hipofisario-Tiroideo (HHT)
- Eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal (HHG)



**Figura 7: Esquemización de la comunicación bidireccional entre los ejes Hipotálamo-Pituitario, el Sistema Nervioso Autónomo y el Sistema Inmune.** Las hormonas liberadas por las glándulas adrenales y las gónadas, como glucocorticoides y progesterona, respectivamente, actúan en paralelo junto a los neurotransmisores y los neuropéptidos para regular el sistema inmune. En el momento necesario, la señalización de las citoquinas actúa sobre el hipotálamo, estimulando o inhibiendo, para regular la respuesta hormonal y neuronal. Las líneas de puntos representan vías de regulación negativa, las líneas sólidas representan vías de regulación positiva.

A1, C1, A2, C2: núcleos adrenérgicos del tronco cerebral; ACTH: hormona Adrenocorticotrofina; AVP: arginina-vasopresina; CRH: hormona liberadora de Corticotrofina; DHEA: Dehidroepiandrosterona; FSH: hormona Folículo estimulante; GnRH: hormona liberadora de Gonadotropina; LC: locus ceruleus; LH: hormona Luteinizante; PNS: Sistema Nervioso Periférico; SNS: Sistema Nervioso Simpático; T3: tri-iodotironina; T4: tiroxina; TRH: hormona liberadora de Tirotrófina; TSH: hormona tiro-estimulante, Vagus n: nervio vago.

(Tomado de Marques-Deak, A. y cols, 2005; Tait, S. y cols, 2008)

En función de las características de la presente tesis, tras una breve descripción del eje HHA, la misma se centrará fundamentalmente en lo referente al eje HHG y su influencia sobre la respuesta inmune.

### **1-3.2.1 Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal**

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) producida por el hipotálamo estimula en la hipófisis la síntesis de propio-melanocortina (POMC), precursor de la hormona AdrenoCorticotrofa (ACTH). La ACTH liberada actúa sobre la corteza adrenal y a partir del colesterol como precursor induce la síntesis de glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en ratones), mineralocorticoides (Aldosterona) y andrógenos (dehidroepiandrosterona–DHEA-, precursor de los esteroides sexuales).

#### **1-3.2.1.1 Cortisol y Corticosterona:**

El Cortisol se secreta, en el hombre, en pulsos breves, de 20 a 100 minutos de duración, presenta un ritmo circadiano, con un pico máximo de hasta 20 µg/l entre las 6 y 8 de la mañana, cayendo a valores menores a 5 µg/l en plasma entre las 22 y 24 horas. El hombre secreta de 15 a 30 mg/ día de cortisol y de 2 a 5 mg/día de corticosterona. Los pulsos de liberación de cortisol están determinados por los pulsos de ACTH (Silverthorn, D. U. y cols, 2014). La concentración de cortisol en sangre determina la secreción de CRH y ACTH, constituyendo así un mecanismo regulatorio.

#### **1-3.2.1.2 DHEA:**

En su forma libre, o, en su mayor parte, unida a sulfato (DHEA-S) como compuesto sulfato inactivo, es la precursora de muchos otros esteroides. Su secreción es dependiente del sexo, y disminuye a lo largo de la vida conjuntamente con el envejecimiento del Sistema Inmune llegando a concentraciones mínimas en la ancianidad.

La vida media de DHEA es de 1 a 3 hs, la de DHEA-S es de 10 a 20hs. En los tejidos linfoides, la DHEA-S es activada por la DHEA sulfatasa y convertida en DHEA. Es precursora de testosterona en el adulto, y en los hombres, su fuente principal son los testículos, por esa razón, la producción de testosterona y 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona a partir de andrógenos suprarrenales es importante sólo en mujeres, ya que la producción de andrógenos gonadales por la suprarrenales es mínima en comparación con la de los testículos.

Los mediadores producidos durante la respuesta inflamatoria activan al eje HHA a través de las acciones integradas de diferentes componentes: las citocinas proinflamatorias, las toxinas bacterianas y las señales nerviosas.

Citocinas como el TNF $\alpha$ , IL-1, e IL-6 inducen la liberación de ACTH, ya que activan la secreción de CRH en el hipotálamo con la consecuente la expresión del gen POMC en la hipófisis. Así aumentan los niveles de cortisol con el fin de limitar la respuesta inflamatoria y proteger al hospedador de los efectos deletéreos de un accionar excesivo. A su vez, dichas citocinas aumentan la resistencia a la acción inhibitoria del cortisol sobre el eje HHA.

### **1-3.2.2 Eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal**

#### **1-3.2.2.1 Hormona liberadora de gonadotrofina :**

La hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH ó LHRH), secretada por el hipotálamo, estimula la producción y liberación las hormonas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a nivel hipofisario. Dicho factor liberador está fuertemente implicado en el desarrollo y modulación de la respuesta inmune (Schuurs y cols, 1990; Mann, 1998). Se ha demostrado la presencia de sitios de unión específicos para GnRH en células T periféricas humanas (CD4+, CD8+) (Azad, N. y cols, 1993, Azad, N. y cols, 1997), y de transcriptos de ARNm de GnRH y su receptor (GnRH-R) en linfocitos periféricos y LB (Tanriverdi, F. y cols, 2003). La expresión del GnRH-R parece estar regulada por la GnRH nativa, lo que sugiere una función autócrina de esta hormona en las células inmunes. Al parecer, la actividad de la GnRH dentro del sistema inmune sería diferente de su rol dentro de la pituitaria y es probable que la misma tenga una acción fisiológica extra hipofisaria (Jacobson, J. y cols, 1998). También se constató un efecto de GnRH sobre el desarrollo del sistema inmune, a través de una acción directa sobre la maduración del timo y el desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular. En efecto, la administración de antagonistas de GnRH en ratas neonatas bloqueó la proliferación de timocitos, redujo los niveles de LT CD4+ y la respuesta mediada por anticuerpos ante un estímulo antigénico aplicado en la etapa adulta (Morale, M. C. y cols, 1991). Estudios posteriores confirmaron que la GnRH ejercía una acción prenatal en la modulación del desarrollo de la respuesta inmune y en la proliferación de los timocitos (Zakharova, L. A. y cols, 2000). Sumado a ello, la GnRH influye directamente sobre el sistema inmune de roedores y humanos, a través de una potente acción estimuladora (Marchetti, B. y cols, 1989).

### **1-3.2.2.2 Gonadotrofinas (FSH y LH)**

Las gonadotrofinas FSH y LH son hormonas glucoproteicas producidas en respuesta a la acción de la GnRH hipotalámica, para actuar sobre las gónadas como reguladoras de los ciclos sexuales.

La LH actúa sobre el folículo ya maduro generando una serie de eventos que desembocan en la ovulación. Es la responsable de la ovulación, la maduración del oocito y la luteinización del folículo. Bioquímicamente, la LH produce en primer lugar aumento de pregnenolona y secundariamente de testosterona y estradiol, vía de la progesterona. La LH estimula la producción de esteroides gonadales como el estradiol, progesterona y testosterona, a partir del colesterol.

Andrógenos y estrógenos rigen las diferencias entre sexos. Todos los estrógenos se sintetizan a partir de andrógenos, comenzando por colesterol o acetato. Los andrógenos como el androstenediol y testosterona se sintetizan en ovarios y testículos, y son parcialmente convertidos a estrógenos de tipo estrona y estradiol. Ambos sexos producen las mismas hormonas esteroides y las diferencias fisiológicas entre los mismos son cuantitativas, en función de la cantidad de andrógeno producido y del porcentaje que termina convirtiéndose en estrógeno (Federman, D. D. 2006). El transporte de los esteroides sexuales muestra un ordenamiento evolutivo interesante, en sangre circulan ligados a una globulina transportadora de una hormona de uno sólo de los sexos (single sexual hormone-binding globulin) (Fortunati, N. 1999). Los andrógenos disminuyen el nivel de dicha globulina, mientras que los estrógenos la aumentan. También varía la afinidad, por lo que en definitiva el transporte de andrógenos y estrógenos contribuye a las diferencias sexuales al regular los niveles de hormona libre disponible en los tejidos. (Federman, D. D. 2006) (Bini, E. I. y cols, 2011)

### **1-3.2.2.3 Expresión de Receptores de Hormonas Esteroides Gonadales en células inmunes**

La respuesta celular a una hormona requiere la interacción con un receptor presente en la membrana o bien en su interior (Heinlein, C. A. y cols, 2002). La distribución intracelular de las hormonas esteroideas ha sido objeto de discusión en los últimos años. Luego de numerosos estudios (Díaz- Chico, B. N. y cols, 1988; Jensen, E. V. 1991; Welshons, W. W. y cols, 1984), se llegó a la conclusión que los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, en ausencia de cortisol, se encuentran tanto

en citoplasma como en el núcleo (Akner, G. y cols, 1995). Los receptores de hormonas sexuales son mayoritariamente nucleares, aunque también se encuentran en citoplasma, donde son difíciles de visualizar. Se supone que todos ellos se hallan en equilibrio dinámico entre ambos compartimentos, facilitado por su escasa avidéz a unirse a estructuras celulares en ausencia de hormona.

Los **estrógenos** señalizan a través de dos receptores, ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Kuiper, G. G. y cols, 1996). Ambos ERs se expresan en timocitos, células de la médula ósea, células precursoras de células B y células B circulantes (Igarashi, H. y cols, 2001; Smithson, G. y cols, 1995). ER $\alpha$  tiene mayor expresión en las células T CD4+ que en las B. Por su parte, las células B expresan niveles más altos de ER $\beta$ , mientras que las T CD8+ expresan ambos receptores en forma equivalente (Phiel, K. L. y cols, 2005). ER $\alpha$  se expresa también en células T reguladoras (Treg). ER $\alpha$ , y en algunos casos ER $\beta$ , se expresan en células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) y monocitos (Lambert, K. C. y cols, 2004; Whitacre, C. C. y cols, 1999). En el modelo murino se observó que los neutrófilos y las células NK poseen ambos receptores (Ben-Hur, T. 2007).

Para la **progesterona** se han descrito receptores citosólicos (cPRs), pertenecientes a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares (Bagchi, M. K. y cols, 1990), y receptores asociados a membrana (mPRs) (Wehling, M. y cols, 2007).

En cuanto a los receptores para **andrógenos**, en el hombre, los mismos pertenecen a una superfamilia de receptores esteroides, vitamina D, rhodopsina y otros ligandos.

Llamativamente, los LT expresan receptores de testosterona en membrana mientras que los receptores en los LB son intracelulares (Benten, W. P. y cols, 2002).

### 1-3.3 El Sistema Endócrino en la Tuberculosis

En numerosas especies, los machos han demostrado ser más susceptibles que las hembras a infecciones causadas por ciertos parásitos, hongos, bacterias y virus (Klein, S. L. 2002). En el caso particular de la TB, especialmente en los países en desarrollo, esta enfermedad es dos veces más frecuente en hombres que en mujeres (la relación de la enfermedad hombre/mujer es de 1,9 +/- 0,6, según los casos de notificación mundial) (WHO, 2009). Estas diferencias han sido atribuidas a características biológicas, epidemiológicas (Martinez, A. N. y cols, 2000; Borgdorff, M. W. y cols, 2000), factores socioeconómicos y barreras culturales en el acceso a los

sistemas de salud (Uplekar, M. y cols, 1999). Es interesante notar que esta diferencia entre géneros en la TB se ha visto en adultos de todas las edades, pero no en niños o adolescentes jóvenes (Neyrolles, O. y cols, 2009). Esta observación sugiere la participación de factores biológicos, particularmente las bien conocidas actividades reguladoras de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune. Los macrófagos y los linfocitos poseen receptores para andrógenos, estrógenos y progesterona (Bouman, A. y cols, 2005). Estas hormonas participan en el desarrollo y función de los linfocitos y macrófagos, así como en la evolución de diversas enfermedades, incluyendo a las enfermedades infecciosas (Ansar, A. S. y cols, 1985). Las hembras presentan niveles más altos de anticuerpos en el suero (Butterworth, M. y cols, 1967), y desarrollan respuestas inmunes más importantes luego de la inmunización, que los machos (Eidinger, D. y cols, 1972; Rhodes, K. y cols, 1969). En líneas generales, por otra parte las mujeres de todas las edades presentan tasas de infección significativamente menores a las de los hombres. Esta diferencia se ha asociado a diferencias importantes en la respuesta inflamatoria y es aparentemente ventajosa contra una infección, pero desfavorable en la respuesta inmune contra estructuras propias, provocando en las mujeres una tasa más alta de enfermedades autoinmunes (Cutolo, M. y cols, 2002; Ahmed, S. A. y cols, 1999).

La testosterona, el principal andrógeno circulante en hombres, y la progesterona, hormona asociada al mantenimiento del embarazo, son inmunosupresoras. Ambas hormonas aumentan la activación macrofágica (D'Agostino, P. y cols, 1999) lo cual puede ir en detrimento en la TB (Rook, G. A. y cols, 2004). En contraste, los estrógenos, en concentraciones fisiológicas, son considerados mediadores pro-inflamatorios y estimulan la producción de TNF $\alpha$  (Zuckerman, S. H. y cols, 1995), e interactúan con el promotor de IFN $\gamma$ .

Los estrógenos poseen la capacidad de dirigir respuestas inmunes proinflamatorias asociadas a un perfil Th1 y la testosterona, la capacidad de inhibirlas. Esto podría explicar por qué las mujeres presentan una tasa menor de incidencia de enfermedades infecciosas como TB (Neyrolles, O. y cols, 2009).

Por otro lado, el dimorfismo sexual observado en el desarrollo de la respuesta inmune, en términos generales, podría estar relacionado con diferentes efectos de los esteroides sexuales sobre la producción de citocinas.

En un trabajo realizado en ratones SJL, Wilcoxon y colaboradores observaron que las hembras montaban una respuesta inmune Th1 y eran susceptibles a la inducción de encefalomielitis alérgica experimental, mientras que los machos eran resistentes a esta enfermedad debido a la generación de células Th2, dependiente de las CPA. La base de esta inducción diferencial se debía a la secreción de citocinas por

las CPA durante la activación celular T. Las CPA de machos secretaban IL-10 pero no IL-12, mientras que las CPA de las hembras secretaban IL-12 pero no IL-10, durante la diferenciación celular T (Wilcoxon, S. C. y cols, 2000), favoreciendo una mayor respuesta de tipo Th2 en machos, comparados con las hembras (Cua, D. J. y cols, 1995; Dalal, M. y cols, 1997; Bebo, B. F. y cols, 1999).

## 1.4 El Sistema inmune

En estos primeros párrafos se hará una semblanza muy sucinta, para otorgarle mayor espacio al referirnos a la TB.

Como primera línea defensiva, el hospedero posee una serie de mecanismos agrupados bajo la designación de inmunidad innata la cual también comprende barreras físicas y anatómicas que al ser superadas por los agentes patógenos deriva en el establecimiento de un foco infeccioso. Ante ello el organismo pone en juego una serie de mecanismos celulares (neutrófilos, eosinófilos, MØ, células NK, células dendríticas (DC), mastocitos y células endoteliales) y humorales (el sistema complemento, las proteínas de fase aguda y los interferones  $\alpha$  y  $\beta$ , entre otros). Ello depende en buena medida de la existencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR –*pattern recognition receptors*-), capaces de identificar estructuras conservadas e invariantes de los microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP–*pathogen-associated molecular patterns*).

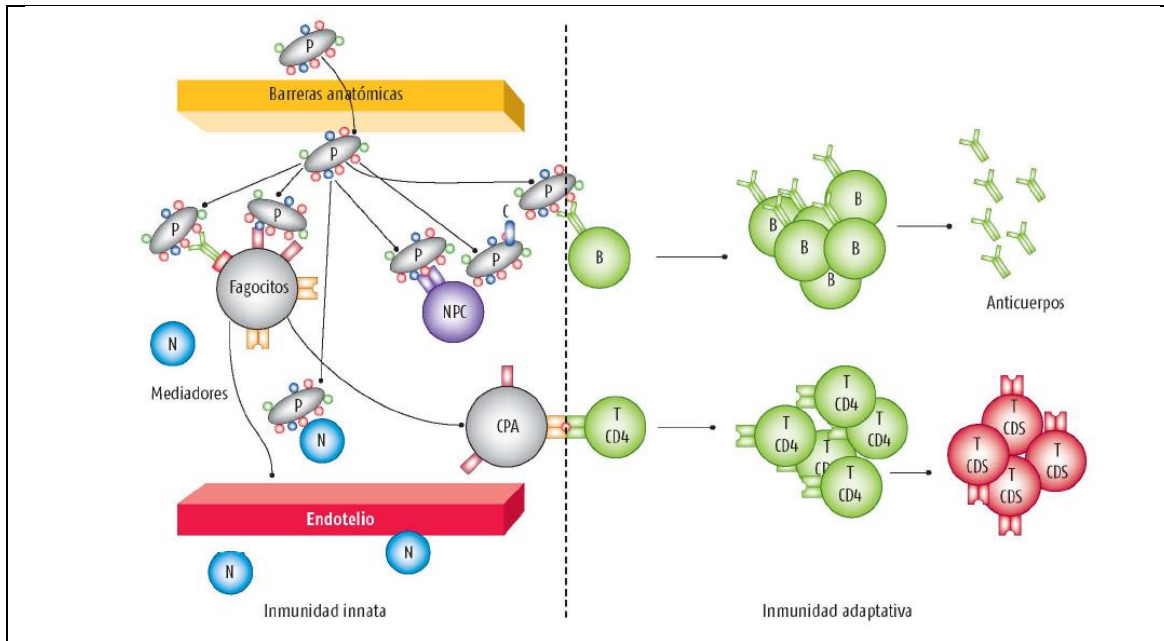
Paralelamente a la evolución de la inmunidad innata, también hemos desarrollado mecanismos defensivos, dirigidos en forma individual, contra cada uno de los microorganismos en forma específica: la inmunidad adaptativa (Fig 8).

Las DC residentes en los tejidos periféricos monitorean el entorno, y al detectar un patógeno lo fagocitan y procesan sus proteínas como péptidos antigénicos, que luego son presentados en superficie por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y/o II, fundamentalmente en los ganglios linfáticos. Ello da lugar a la activación de células T, y en el caso de las T CD4+, a la diferenciación de distintos tipos de células T efectoras, Th1 y Th2, cada una de ellas con un particular patrón de producción de citocinas.

Las células Th1, productoras de IFN $\gamma$ , activan MØ y otros tipos celulares para generar respuesta contra patógenos intracelulares. Este IFN- $\gamma$  induce la producción de anticuerpos IgG2 por los linfocitos B. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-13, que ejercen sus efectos sobre células B, eosinófilos, basófilos y células de los epitelios mucosos para proteger al organismo contra patógenos extracelulares. La familia de las



células Th se ha expandido considerablemente y hoy también se incluyen los linfocitos Th3, Th17, Th9, Th22 y las células T helper foliculares, lo cual deja entrever la intrincada red de interacciones celulares que se pueden poner en juego ante el contacto con una noxa.



**Fig 8: Inmunidad Innata y Adaptativa.** La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa, y de no ser posible eliminar al patógeno, se ponen en marcha los mecanismos correspondientes a la inmunidad adaptativa. Abreviaturas: B: Linfocito B; C: complemento; N: neutrófilo, NK: linfocito natural killer; P: patógeno; T CD4: linfocito T CD4+; T CD8: linfocito T CD8+. (Bini, E. I. y cols, en libro "Patología General". Ed Mc Graw- Hill, 2014).

#### 1-4.1 Respuesta inmune protectora contra la TB

El término de inmunidad protectora contra la TB describe la respuesta inmune de un individuo que ha sido inmunizado o quien se ha recuperado de una infección primaria y en una subsecuente re-exposición a *Mtb*, se encuentra protegido contra el desarrollo de la enfermedad grave e infección crónica. La inmunidad protectora puede ser esterilizante si lo resguarda contra la infección (Ernst, J. D. 2012). Gran parte de lo que se conoce de la respuesta inmune contra la TB se obtiene de modelos animales que tienen similitudes en ciertos estadios de la enfermedad respecto de la patología humana.

#### 1-4.2 Participación de células y citocinas del Sistema inmune durante la TB. Influencia de las hormonas sexuales sobre las mismas

### 1-4.2.1 Protección constitutiva e inmunidad innata contra TB

La primera barrera protectora o “constitutiva” está integrada por las condiciones anatómicas y fisiológicas tales como la dinámica de filtración del tracto respiratorio superior, el moco del sistema respiratorio, el epitelio respiratorio, el movimiento ciliar y los neumocitos (Caminero y cols, 2003). El número de células epiteliales en los alvéolos es 30 veces mayor que el número de MØA, también entran en contacto directo con *Mtb* y tienen un papel relevante ya que son capaces de producir péptidos antimicrobianos. Además, las células epiteliales establecen ambientes pro-inflamatorios por la producción de IL-8, GM-CSF, TNF $\alpha$  y óxido nítrico (NO) (Hernández-Pando, R. y cols, 2007; Cakarova, L. y cols, 2009).

Los mediadores solubles o humorales de la inmunidad innata tales como los **péptidos antimicrobianos** y **lectinas** (proteínas del surfactante, lectina que reconoce manosa) también son una barrera protectora contra la infección micobacteriana (Caminero, JA. 2003). Los péptidos antimicrobianos, como las **defensinas** y las **catelicidinas**, son estructuras de 30-50 aminoácidos con actividad antimicrobiana producidas por células epiteliales, MØ y neutrófilos, principalmente. (Rivas-Santiago, B. y cols, 2008).

Otra proteína de importante contribución en la regulación de la respuesta inmune contra TB es **HMGB1** (High Mobility Group Box 1). Inicialmente descrita como factor de transcripción, HMGB1 es una proteína que además actúa como alarmina. Es liberada por células necróticas y apoptóticas, interviniendo en la regulación de la respuesta inmune. Según su condición redox, puede tener acción pro-inflamatoria, comportándose como citocina o como quimiocina, o puede actuar como antiinflamatoria (Yang, H. y cols, 2013). En investigaciones paralelas, hemos caracterizado y descrito este doble efecto en el curso de la TB experimental, en un modelo murino, donde se pudo observar un comportamiento dual, dependiendo del estadio de la enfermedad. (Hernández-Pando, R. y cols, en prensa).

Cuando *Mtb* alcanza la unidad respiratoria pulmonar, interacciona con las células fagocíticas de la inmunidad innata tales como MØA, DC, monocitos y neutrófilos (Ernst JD. 2012). El reconocimiento de *Mtb* se debe principalmente a PRR oligoespecíficos tales como receptores símil *Toll* (TLR) que inducen la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y receptores de adhesión celular los cuales contribuyen a la movilización local y sistémica de células inmunológicas (Caminero, J. A. y cols, 2003; Ernst, J. D. 2012).

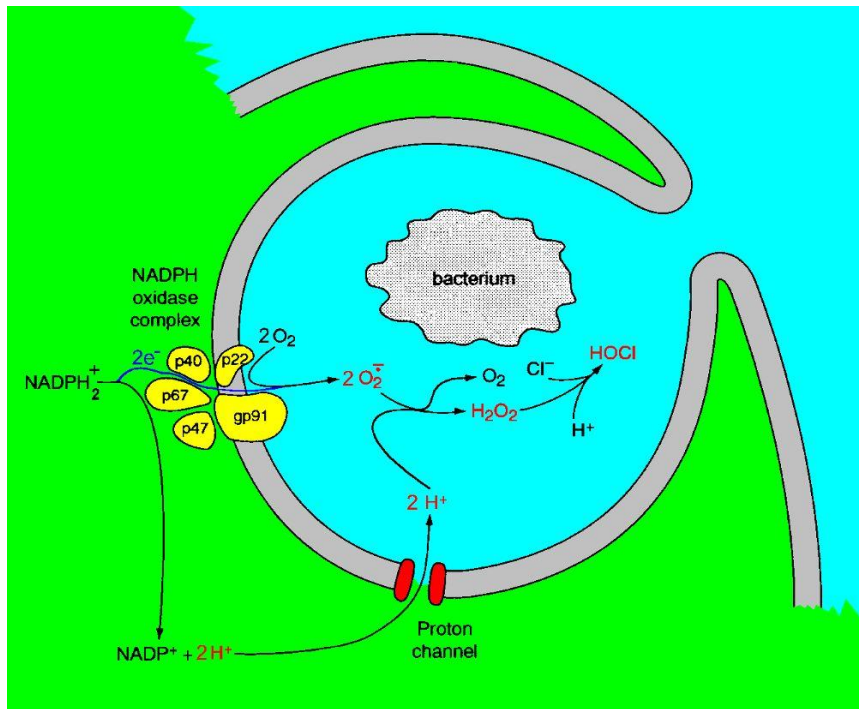
#### 1-4.2.1.1 Neutrófilos

El *Mtb* es capaz de infectar neutrófilos durante la primo-infección. Los neutrófilos pueden eliminar microorganismos a través de la producción de radicales libres del oxígeno y mieloperoxidasa y pueden secretar quimiocinas que contribuirían al control temprano de la infección micobacteriana. Experimentalmente la eliminación de neutrófilos se relaciona con un crecimiento micobacteriano acelerado, mientras que la inducción del reclutamiento de neutrófilos disminuye la carga bacilar (Hernández-Pando, R. y cols, 2007).

#### 1-4.2.1.2 Macrófagos

Haremos hincapié, en este ítem, específicamente en los MØA.

Los MØA, también conocidos como “células de polvo”, son células que conforman el sistema fagocítico mononuclear, derivan de un progenitor pluripotencial de la médula ósea y están especializados en la limpieza de la luz alveolar, el recambio del surfactante y la fagocitosis de material extraño e inespecífico como carbón, polvo y bacterias (Fig 9). Existen factores micobacterianos que evaden los mecanismos microbicidas de los MØA. Factores relacionados con glucolípidos de la pared micobacteriana inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma, elevan el pH lisosomal, destruyen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inhiben la generación de superóxido (Caminero, J. A. y cols, 2003; Flynn, J. L. y cols, 2001).



Tomado de Tom DeCoursey [www.phys.rush.edu](http://www.phys.rush.edu)

**Fig 9: Estallido respiratorio y producción de NO.**

La fagocitosis estimula una combustión oxidativa caracterizada por aumento súbito del consumo de oxígeno, catabolismo de glucógeno (glucogenolisis), incremento de la oxidación de glucosa y producción de metabolitos reactivos del oxígeno. La generación de estos metabolitos, se debe a la activación de la NADPH oxidasa del leucocito, con la consecuente oxidación acelerada de NADPH y producción de grandes cantidades de anión superóxido ( $O_2^-$ ). Este anión se convierte en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por actividad de la superóxido dismutasa (SOD). La actividad microbicida se potencia por la liberación del contenido lisosomal (gránulos azurófilos) de los neutrófilos que contienen la enzima mieloperoxidasa (MPO), que además, en presencia de haluro  $Cl^-$  convierte el  $H_2O_2$  en  $HOCl^*$  (radical hipocloroso). Este radical es altamente oxidante microbicida. La NADPH oxidasa es activa sólo después de la traslocación de una subunidad citosólica a la membrana del fagolisosoma, y sus productos se generan en el interior de éste.

#### 1-4.2.1.2.1 Maduración del fagosoma

El fagosoma, forma endocítica dependiente de receptores extracelulares y mediada por proteínas del citoesqueleto, es una vesícula formada por la membrana celular que contiene en su interior partículas extracelulares no degradables por sí solo, sino que requiere de un proceso llamado *maduración fagosomal* (Vieira, O. V. y cols, 2002). La maduración hacia la formación de una organela híbrida o fagolisosoma posee propiedades degradativas complementarias que incluyen pH bajo, enzimas hidrolíticas, presencia de defensinas y otros péptidos antimicrobianos y la habilidad de generar especies reactivas del oxígeno. Esta vía endocítica está determinada por la participación ordenada de organelas desde los endosomas tempranos hasta los

lisosomas (Vieira, O. V. y cols, 2002). Ligandos solubles asociados a la membrana y proteínas transmembranales son reclutados en pequeñas vesículas que derivan de la membrana plasmática, inicialmente por mecanismos dependientes de clatrina y caveolina.

La interacción entre el fagosoma y los endosomas comienza tan pronto se ha sellado el fagosoma. El fagosoma naciente, parece fusionarse con endosomas tempranos, seguido de endosomas tardíos y finalmente con lisosomas. El resultado es un cambio estructural de la membrana y un cambio del contenido del fagosoma (Vieira, O. V. y cols, 2002).

El primer paso requiere la interacción entre la célula y la micobacteria mediada por dos clases principales de receptores, los receptores de opsoninas y receptores independientes de opsonización. Estudios *in vitro* muestran que las micobacterias pueden ser opsonizadas por moléculas del complemento como C3bi, inmunoglobulinas (IgG), proteínas de unión a manosa así como por el factor surfactante A. De esta forma, el *Mtb* opsonizado es fagocitado por los MØA (Gorocica, P. y cols, 2005). La respuesta del MØA depende del tipo de receptor con el que reconoce a *Mtb*. La fagocitosis de la micobacteria opsonizada con IgG a través de receptores FcRγ aumenta la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno y permite la fusión del fagosoma y lisosoma. Por otra parte, la interacción de *Mtb* opsonizada con el receptor 3 del complemento (CR3; también conocido como CD11b/CD18) previene el estallido respiratorio e inhibe la maduración fagosomal (Vieira, O. V. y cols, 2002). Adicionalmente, *Mtb* inhibe la maduración del fagosoma por medio de la retención de la proteína TACO (*tryptophan aspartate-containing coat*) presente en los fagosomas. Esta inhibición puede ser revertida por citocinas como IFNγ y TNFα que actúan sinérgicamente estimulando la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno (Flynn, J. L. y cols, 2001).

#### **1-4.2.1.2.2 Papel del Óxido Nítrico (NO) en la infección micobacteriana**

El NO y los productos reactivos del oxígeno como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) son primordiales para la eliminación de infecciones intracelulares tras la activación de MØ. La participación de los intermediarios del nitrógeno no está clara en el ser humano (Flynn, J. L. y cols, 2001; Yang, C. S. y cols, 2009). El NO es una molécula gaseosa con múltiples funciones orgánicas, es sintetizado a través de dos reacciones enzimáticas mediadas por la monooxigenasa. Una molécula de L arginina es oxidada para producir N<sup>ω</sup>-OH-L-arginina como intermediario, que posteriormente se oxida para formar NO y L-citrulina. El NO es uno de varios reactivos intermediarios de nitrógeno

con actividad antimicrobiana que también reacciona con radicales del oxígeno para generar intermediarios como el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Yang, C. S. y cols, 2009).

La enzima Óxido Nítrico Sintetasa (NOS) es constitutiva en células endoteliales (eNOS) y neuronales (nNOS), y es inducible (iNOS) en MØ, neutrófilos, células epiteliales y hepatocitos (Yang, C. S. y cols, 2009). Ante la presencia de citocinas como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-1 $\beta$  se favorece la producción de NO, sin embargo, ante la presencia de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 se estimula la degradación de L-arginina por arginasas. El NO y los reactivos intermediarios del nitrógeno pueden generar daño microbiano de formas tales como daño directo al DNA, proteínas y lípidos (Yang, C. S. y cols, 2009).

#### **1-4.2.1.2.3 Influencia de las hormonas sexuales sobre los macrófagos**

Se han estudiado los efectos de la testosterona a nivel de la expresión de los receptores TLR4 en MØ, en el modelo murino, observándose que ratones castrados eran más susceptibles a shock endotóxico y mostraban mayor expresión de TLR4 sobre la superficie celular de sus MØ, respecto de los ratones no castrados, con lo cual la testosterona actuaría reduciendo la expresión de TLR4 en macrófagos (Rettew, J. A. y cols, 2008). Estos autores demostraron además que determinados estrógenos como el 17- $\beta$  estradiol aumentan la expresión de TLR4 y de CD14 sobre la superficie de los macrófagos, y regulan la susceptibilidad a la sepsis. Cuando se retiraba el estrógeno endógeno la producción de citocinas pro y antiinflamatorias decrecía, con una reducción de los niveles circulantes de la proteína ligadora de LPS y de TLR4 en los macrófagos murinos. En definitiva, mientras los andrógenos demostraron suprimir la respuesta aguda ante el desafío de una endotoxina bacteriana, los estrógenos promueven un aumento en la resistencia a las infecciones bacterianas. (Rettew, J. A. y cols, 2009)

Los MØ poseen receptores para estrógenos, lo que explicaría los efectos de estas hormonas sobre estas células, uno de los mejor conocidos es la influencia sobre el número de células mononucleares. Los estrógenos y posiblemente también la progesterona, disminuyen su número (Bounman, A. y cols, 2005). Se ha sugerido que este efecto podría deberse a que estas hormonas inducen arresto mitótico y apoptosis en monocitos (Thongngarm, T. y cols, 2003) Los estrógenos inducen un aumento de la fagocitosis y la producción de intermediarios reactivos del O<sub>2</sub> y disminuyen los intermediarios reactivos del nitrógeno por parte de MØ (Chao, T. C. y cols, 1994). Cuando son estimulados con LPS y tratados con 17  $\beta$ - estradiol, los macrófagos murinos disminuyen la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , estos efectos estuvieron

asociados a la disminución de la activación de NFκB por el LPS, como así también se observó disminución en la producción de NO. (Deshpande, R. y cols, 1997)

En monocitos de sangre periférica, la actividad de NFκB se vio suprimida en mujeres embarazadas, en comparación con mujeres adultas no embarazadas. (McCracken, S. A. y cols, 2003)

Como ya hemos mencionado, los monocitos no sólo son capaces de ingerir y matar microorganismos por fagocitosis, sino que una función muy importante de ellos es dirigir la respuesta inmune en función de la producción de citocinas, entre ellas: IL-1β, TNFα, IL-12, IL-18 e IL-6. (Bouman, A. y cols, 2005)

#### **1-4.2.1.3 Células Dendríticas**

Las DC pulmonares constituyen menos del 1% del total del número de células en el ratón. Si se purifican estas células y se cultivan 7 días en presencia de GM-CSF, proliferan duplicando o triplicando su número (Gonzalez-Juarrero, M. y cols, 2001). Las DC son importantes vínculos de la inmunidad innata y adaptativa. Representan una población celular heterogénea por su origen y estado de maduración o activación. En general podemos identificar DC precursoras (preDC), DC inmaduras (iDC) y DC maduras (mDC). Cada uno de estos estadios adquiere diferentes marcadores y funciones (O’Gorman, M. R. y cols, 2008).

Las preDC convencionales derivan de células madres hematopoyéticas pluripotenciales de la medula ósea y son liberadas al torrente sanguíneo para ingresar a diferentes tejidos en donde residen para funcionar como vigilantes antigénicos. Cuando interactúan con un antígeno o patógeno, se induce la producción de citocinas como IL-12. Este precursor expresa pocas moléculas MCHII, y posterior a un estímulo (patógenos, daño tisular, antígenos, luz ultravioleta) se diferencia a un tipo celular con alta capacidad fagocítica y endocítica (iDC). Las iDC captan antígenos a través de micropinocitosis y endocitosis mediada por receptores de lectina tipo C y receptores FcRγ. Una vez endocitado el antígeno, la iDC disminuye su capacidad fagocítica y se induce su maduración o activación (mDC), adquiriendo propiedades especializadas en el procesamiento y presentación antigénica. La mDC es una célula altamente inductora de la maduración de células *Tnaïve*, razón por la que se la conoce como la célula presentadora de antígeno por excelencia. Dicha presentación se desarrolla en tejidos linfoides secundarios (O’Gorman, M. R. y cols, 2008).

El LAM de la micobacteria genera señales a través del DC-SIGN (receptor de lectina tipo C) en DC, inducen la producción de IL-10, mientras que la interacción de una lipoproteína de 19 kDa de *Mtb* con el TLR2 lleva a la producción de IL-12, TNFα e

IL-6 (Hickman, S. P. y cols, 2002). Una vez que los antígenos micobacterianos han sido capturados e internalizados, las DC maduran y migran a los ganglios linfáticos mediastinales donde se lleva a cabo la presentación a los LT. La maduración de las DC se acompaña por el incremento en la síntesis y expresión de moléculas del MHC I y II, moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, y producción elevada de IL-12. De esta forma, se induce la maduración de células T hacia un perfil protector Th1, acompañado además de secreción de citocinas como IL-18, IL-23 e IFN $\gamma$  (Flynn, J. L. y cols, 2001). De esta forma, las mDC activan a linfocitos *Tnaïve* y los diferencian a linfocitos T CD4+ antígeno específicos productores de IFN $\gamma$  (Flynn, J. L. y cols, 2001; Hickman, S. P. y cols, 2002). La presentación cruzada de antígenos extracelulares en las mDC y la posterior activación cruzada a células T CD8+ es un mecanismo inmunológico importante para la inducción de una respuesta de células T citotóxicas antígeno específicas (Kurts, C. y cols, 2010).

Las DC de pacientes con TB progresiva muestran deficiencias fenotípicas y de diferenciación en comparación con las personas sanas. Se observa expresión disminuida de CD1a, CMHII, CD80 y CD83, aunque CD86 no se ve afectado. Funcionalmente producen mayores niveles de TNF $\alpha$  e IL-6, pero niveles bajos de IL-12 (Rajashree, P. y cols, 2009). Además, los componentes de la pared celular de la micobacteria pueden inhibir la maduración de DC principalmente cuando son infectadas con *Mtb* Beijing (cepa hipervirulenta) donde la capacidad de presentación de antígenos, particularmente de naturaleza lipídica, se podría afectar por la disminución de la expresión de CD1 (Hernández-Pando, R. y cols, 2007).

#### **1-4.2.1.3.1 Influencia de las hormonas sexuales sobre las DC**

Tanto los progenitores de las DC como las mismas ya diferenciadas poseen receptores para estrógenos, lo que indicaría que éstos podrían regular a las mismas en sus distintos estadios de desarrollo y funcionalidad.

Durante la diferenciación de las DC en la médula ósea se observó que la falta de estrógeno, por la presencia de antagonistas de los receptores o por moduladores selectivos de éstos, provoca una disminución en la expresión de las moléculas de superficie CD86 y CMH II, luego de la activación de las DC ya diferenciadas (Kovats, S. y cols, 2008). Asimismo se observó que, si bien la progesterona parece no ejercer efectos sobre la capacidad de las DC inmaduras de ingerir péptidos antigénicos, la hormona tendría un efecto diferente sobre las DC maduras, donde el tratamiento con progesterona suprimió la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sin afectar la producción de IL-10. Además favoreció la disminución de la expresión de



las moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86), de las CMH II y la proliferación de células T inducidas por las DC. De este modo la progesterona puede inhibir la respuesta inmune pro-inflamatoria limitando la capacidad funcional de las DC inmaduras, (Butts, C. y cols, 2007) en estos efectos estaría involucrado el ER para progesterona, ya que en presencia del antagonista del receptor no se obtuvieron estos resultados. (Butts, C. L. y cols, 2008; Bini, E. I. y cols, 2011).

### **1-4.2.2 Inmunidad Adaptativa**

La importancia de la inmunidad adaptativa para el control de la TB se refleja en los casos de co-infección con el VIH, donde se desarrolla una importante deficiencia de LT CD4+ y los datos epidemiológicos muestran que la principal causa de muerte en este grupo de pacientes es la TB. Datos adicionales incluyen los polimorfismos en las moléculas del CMH que determinan diferencias en la susceptibilidad a la infección por *Mtb* (Goldfeld, AE. y cols, 1998), y los casos en los que la deficiencia de receptores y vías de transducción del eje IL-12 e IFN $\gamma$  determinan un fenotipo de alta susceptibilidad a la TB concluyendo en que la protección contra la TB está relacionada con una eficiente respuesta adaptativa tipo Th1 (Lienhardt, C. y cols, 2002; Casanova, J. L. y cols, 2002; Flynn, J. L. 2006).

#### **1-4.2.2.1 Linfocitos T CD4+ y CD8+**

La respuesta inmune adaptativa contra *Mtb* en humanos, modelos murinos, bovinos, y primates no humanos, depende de los LT CD4+. Se han podido comprobar contribuciones adicionales de relevancia por parte de las células T CD8+ en ratones y primates no humanos (Ernst, J. D. 2012). Después de la infección con *Mtb*, las CPA procesan los antígenos micobacterianos y migran a los ganglios linfáticos regionales para iniciar la activación de la respuesta inmune al interactuar con LT CD4+ y CD8+ específicos. Este fenómeno induce la activación y proliferación de linfocitos Th1 (Mosmann, T. R. y cols, 1996; Smith, S. M. y cols, 2000).

La diferenciación de linfocitos Th1 requiere:

- 1) presentación antigénica a través de moléculas clase II del CMH por parte de las CPA,
- 2) Interacción de las CPA con los LT a través de diversas moléculas co-estimuladoras (CD80/86, CD28); y
- 3) estimulación de las células T por citocinas de las CPA como IL-12.

Teniendo en cuenta la diferente producción de citocinas por las células T CD4+ con actividad cooperadora (“*helper*”), las mismas fueron inicialmente separadas en dos

subclases principales, linfocitos Th1 y Th2 sobre la base del patrón de citocinas que producen. Las Th1 se desarrollan bajo los factores de transcripción TBX21, EOMES, y STAT4. Las células Th2 se desarrollan bajo el control de factores de transcripción GATA3 y STAT6. Los Th1 facilitan las respuestas celulares, mientras que los Th2 operan en infecciones por patógenos extracelulares y parasitarias. Sin embargo, hoy sabemos que las células T CD4+ se diferencian en varias subclases tras recibir la señal a través del TCR vía del Ag-CMH II. Dicha diferenciación requiere señales co-estimuladoras de las CPA y citocinas. Hace unos años se identificaron las células Th17 las cuales se desarrollan bajo el control de RORA, RORC y STAT3. Las células Th17 parecen ser críticas para la inmunidad en mucosa hacia patógenos extracelulares. Otra célula efectora es la T helper folicular (Thf) que se genera bajo el control del factor de transcripción BCL6 e IL-21. Residen en los centros germinales, regulan en más CD40L e ICOS y median la presentación del Ag a las células B. También se han descrito las células Th3 que son importantes productoras de TGF- $\beta$  el cual exhibe una variada gama de efectos entre los cuales se destacan su acción anti-inflamatoria. Como ya fuera anticipado más recientemente se han incluido otras poblaciones como las Th9 y Th22. La actividad de las células Th9 exhibe cierta superposición con las células Th2. Las células Th22 las cuales parecen estar involucradas en la preservación de la integridad cutánea.

Por su parte, la activación de las células T CD8+ puede necesitar señales adicionales (cooperación) por parte de los LT CD4+ (Gerloni, M. y cols, 2000; Xing, Z. y cols, 1998).

Las células T efectoras CD4+ y CD8+, totalmente diferenciadas, emigran de los ganglios linfáticos al sitio de infección para controlarla.

El *Mtb* infecta primeramente a los MØA y puede replicarse en los fagosomas hasta que los MØA se activan (Wang, J. y cols, 1999). Los MØA activados son esenciales para el control de la infección tuberculosa como ya hemos comentado, pero son altamente dependientes de los LT efectores CD4+ y CD8+ (Gerloni, M. y cols, 2000; Xing, Z. y cols, 1998; Wang, J. y cols, 1999). Los linfocitos T (CD4+ y CD8+) potencian la eliminación de *Mtb* en parte por la secreción del IFN $\gamma$  y sus efectos citotóxicos sobre los MØ infectados (Silva, C. L. y cols, 2000).

Después de la inmunidad activa primaria, muchas células T mueren por apoptosis y un número escaso de LT de memoria de vida larga recirculan y algunos se retienen en los órganos linfoides, mucosa bronquial e intersticio pulmonar (Jameson, S. C. 2002; Millington, K. A. y cols, 2010). Estas células pueden tener activación inmunológica secundaria luego de ser re-expuestas a antígenos micobacterianos (Millington, K. A. y cols, 2010). La presencia de células T CD4+ de memoria central

(antígeno específicas productoras de IL-2) sin la presencia de células T CD4+ de memoria efectoras, se ha relacionado con una eliminación eficiente de *Mtb* (Millington, K. A. y cols, 2010).

Adicionalmente a las respuestas inducidas por las moléculas del CMH clase I y clase II restringidas a receptores de las células T $\alpha\beta$  que reconocen epítopes peptídicos bacterianos, también podrían participar otros tipos de células T. Estas incluyen células T predominantemente CD4+ que reconocen lípidos específicos micobacterianos en células restringidas a CD1, células T CD8+ restringidas a moléculas del HLA-E, así como células T símil innatas asociadas a la mucosa (Ernst, J. D. 2012). Sin embargo, el verdadero papel de estos linfocitos en la respuesta inmune contra la TB no está del todo claro.

#### **1-4.2.2.1.1 Influencia de las hormonas sexuales sobre las células T**

En tanto los andrógenos fuesen capaces de inducir inmunosupresión en los machos, es admisible pensar que su deprivación potenciaría la respuesta inmune. Algunos autores estudiaron el efecto de la remoción de andrógenos sobre los órganos linfoides primarios y periféricos en ratones post púberes, y observaron un aumento en el tamaño y número de células en timo y bazo. (Viselli, S. M. y cols, 1995; Ellis, T. M. y cols, 2001; Smithson, G. y cols, 1998; Olsen, N. J. y cols, 2001a; Olsen, N. J. y cols, 2001b; Wilson, C. A. y cols, 1995; Castro, J. E. 1974; Fox, H. S. y cols, 1991) Roden *et al* estudiaron el efecto de la castración en un modelo murino, en post púberes y observaron un aumento del número de células T CD3+ periféricas, causado por un aumento proporcional de CD4+ y CD8+. Además estas células T CD4+ y CD8+ proliferaron más vigorosamente ante una activación antígeno-específica mediada por ambas señales activadoras de linfocitos a través de TCR y de CD28. Observaron además que tras la deprivación de andrógenos, los niveles de células T y B se normalizaban más rápidamente respecto de la depleción linfocitaria inducida por quimioterapia. (Roden, A. C. y cols, 2004)

No se hallaron variaciones en el análisis del número de linfocitos circulantes durante el ciclo menstrual (Mathur, S. y cols, 1979; Faas, M. y cols, 2000; Bounman, A. y cols, 2001b), con lo cual ni la progesterona ni los estrógenos modificarían esta característica. Sin embargo, las mujeres menopáusicas mostraron niveles menores de LT en comparación con los de mujeres fértiles, como resultado de la disminución de LB y LT (Giglio, T. y cols, 1994; Yan, J. H. y cols, 2000), esto podría deberse a la falta de progesterona y 17 $\beta$ -estradiol durante largo tiempo. (Bounman, A. y cols, 2005).

### 1-4.2.3 Citocinas

Las citocinas son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa que median muchas de las funciones de las células inmunocompetentes. Las citocinas se producen en respuesta a los microorganismos y a otros antígenos, y son capaces de promover diferentes respuestas por parte de las células que participan de la inmunidad y la inflamación. En los párrafos subsiguientes se hará mención a aquellas cuya participación en TB es notoria.

#### 1-4.2.3.1 TNF $\alpha$

Durante la infección por *Mtb*, los M $\emptyset$ , DC y LT producen y liberan TNF $\alpha$ . Esta citocina influye sobre la expresión de moléculas de adhesión, la producción de quimiocinas y sus receptores, la migración celular y la formación del granuloma (Lin, P. L. y cols, 2010; Ahmad, S. y cols, 2011). Se ha observado que la falta de TNF $\alpha$  lleva a un desarrollo anormal del granuloma, resultando en una deficiente contención de la bacteria, la exacerbación de la patología y el establecimiento de focos secundarios en pulmón y otros órganos. Numerosas investigaciones demostraron que los monocitos de machos, estimulados con endotoxinas, producen más TNF $\alpha$  que los de las hembras (Schwarz, E. y cols, 2000; Asai, K. y cols, 2001; Bouman, A. y cols, 2004b). Se ha demostrado asimismo una variación en los niveles de TNF $\alpha$  en las diferentes etapas de los estadios reproductivos.

#### 1-4.2.3.2 IL-1 $\beta$

Esta citocina pro-inflamatoria es un importante mediador de la respuesta inmune e inflamatoria y ha sido ampliamente estudiada en la TB. Es producida por monocitos, M $\emptyset$  y DC y estimula la producción de citocinas, la fagocitosis y mecanismos efectores de los M $\emptyset$ , así como el procesamiento y la presentación antigénica (Sims, J. E. y cols, 2010). Se identifica principalmente en el lavado bronquioalveolar (BAL) de pacientes con TB (Dahl, K. E. y cols, 1996; Law, K. y cols, 1996). Las deficiencias tanto del receptor como las formas alfa y beta de la IL-1 han derivado en una mayor susceptibilidad a la infección micobacteriana, con defectos en la formación de granulomas y menor producción de NO por los M $\emptyset$ A en modelos murinos (Juffermans, N. P. y cols, 2000; Yamada, H. y cols, 2000). Experimentos llevados a cabo en el ratón demostraron que cuatro horas después de la administración de LPS, los niveles plasmáticos de esta citocina resultaron ser cuatro veces más altos en hembras comparados con los machos (Li, X. y cols, 1995). Las diferencias entre géneros en la secreción de IL-1 se pueden relacionar con la función de esta citocina en el sistema reproductivo ya que tiene efectos sobre el desarrollo del

folículo ovárico. Por otro lado ello podría favorecer que la inmunidad natural de las hembras esté en un mayor estado de activación durante los años reproductivos (Olsen, N. J. y cols, 1996).

#### **1-4.2.3.3 IL-6**

Entre las diversas acciones de esta citocina pleiotrópica, se destaca su efecto estimulante para la diferenciación de linfocitos T y B, activación de MØ y células NK, Posee propiedades pro y anti-inflamatorias y es producida por una variedad de células además de MØ y monocitos. El papel de la IL-6 en la respuesta inmune protectora contra la TB es controvertido. IL-6 se expresa en el sitio de infección y el BAL de pacientes con TB (Law, K. y cols, 1996). Estudios *in vitro* demuestran que su producción en MØ infectados llega a ser 10,000 veces mayor respecto a MØ no infectados y se la ha asociado a un efecto supresor de la respuesta de células T reversible con anticuerpos anti IL-6. Adicionalmente, se ha observado que IL-6 es capaz de inhibir la producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en monocitos humanos (Schindler, R. y cols, 1990). *In vitro*, la producción de IL-6 por MØ es inducida de forma dosis dependiente por la LAM de *Mtb* a través de la activación de NF-IL6 y NF $\kappa$ B; a su vez NF-IL6 puede regular la expresión del gen de IL-1 $\beta$  (Zhang, Y. y cols, 1994). Los resultados con ratones *knock-out* para IL-6 demuestran que son altamente susceptibles a la infección por *Mtb*, aunque son capaces de controlar la infección con BCG acompañado de niveles altos de IL-4 y niveles bajos IFN $\gamma$  (Ladel, C. H. y cols, 1997). Existen datos a favor de un efecto inhibitorio directo de los esteroides gonadales sobre la síntesis y liberación de IL-6. Los andrógenos suprimen la producción de esta citocina en MØ y células derivadas de médula ósea (Bellido, T. y cols, 1995; Kanda, N. y cols, 1997). Asimismo, la testosterona y la DHEA inhiben la expresión génica de IL-6 (Bellido, T. y cols, 1995; Papadopoulos, A. D. y cols, 2000). Además, en líneas generales, las hormonas sexuales femeninas producen una disminución de los niveles plasmáticos de IL-6. (Bouman, A. y cols, 2005).

#### **1-4.2.3.4 IL-12**

Esta citocina es producida principalmente por los monocitos, MØ, DC y LB y sus niveles se elevan durante la infección por *Mtb* (Fulton, S. A. y cols, 1996). El aumento de IL-12 resulta ser crucial para generar una respuesta inmune protectora contra el *Mtb*, tanto en humanos como en modelos animales, dado que es capaz de favorecer la activación de la respuesta inmune celular (Song, C. H. y cols, 2000; Zhang, M. y cols, 1999). En modelos murinos se ha visto que su administración

temprana induce una disminución significativa de la carga bacteriana y un aumento de la supervivencia (Flynn, J. L. y cols, 1995).

#### **1-4.2.3.5 IL-18**

Originariamente fue descrita como un factor inductor de IFN $\gamma$  (Lebel-Binay, S. y cols, 2000), sin embargo ahora se conoce que puede estimular tanto las respuestas Th1 como Th2. IL-18 junto a IL-12 pueden dirigir la respuesta inmune hacia Th1, mientras que en ausencia de IL-12 favorece una respuesta Th2. (Nakanishi, K. y cols, 2001). Diferentes estudios llevados a cabo en modelos animales demostraron su efecto protector en las infecciones por micobacterias, entre ellas el *Mtb*. No se conoce mucho acerca de las variaciones de la IL-18 en los distintos estadios reproductivos, aunque sí se observó que sus concentraciones plasmáticas son mayores en mujeres post-menopáusicas, (Cioffi, M. y cols, 2002) y durante el embarazo. (Iida, A. y cols, 2000).

#### **1-4.2.3.6 IL-2**

Producida por los linfocitos Th1, es la citocina más importante en la activación y proliferación de LT, sea en forma autócrina o parácrina (Smith, K. A. 1988) y es imprescindible en el mantenimiento de los LTreg. También favorece las funciones de crecimiento en el desarrollo de las células B. Los efectos de los estrógenos sobre la producción de IL-2 son discutidos, algunos trabajos hallaron que la producción de IL-2 por los linfocitos no revela diferencias de género (Giron-Gonzalez, J. A. y cols, 2000), mientras que en otros se observó una menor cantidad de IL-2 en machos respecto de las hembras (Bouman, A. y cols, 2004b).

#### **1-4.2.3.7 IFN $\gamma$**

Es una citocina con un papel fundamental en las infecciones debidas a patógenos intracelulares, que es liberada por M $\phi$ , células NK y LT activados (Reljic, R. 2007). Es capaz de activar las células fagocíticas y estimular la presentación de antígenos (Reljic, R. 2007). Se ha demostrado que durante la infección con *Mtb*, el mismo es capaz de alterar la respuesta de los macrófagos interfiriendo en las vías de señalización de IFN $\gamma$  (Ting, L. M. y cols, 1999). El IFN $\gamma$  es la principal molécula para la activación de los M $\phi$  y junto con el TNF $\alpha$ , activa la sintetasa inducible de NO, que deriva en altos niveles de NO bactericida para el *Mtb* en los ratones. El IFN $\gamma$  también induce la expresión de LRG-47, una GTPasa que induce la lisis de *Mtb* por parte de

los MØ independientemente de la producción de NO. Junto con IFN $\gamma$ , LRG-47 induce autofagia en los MØ con lo cual inhibiría sobrevida intracelular *Mtb*

#### **1-4.2.3.8 IL-10**

Es una citocina producida por los MØ, así como por los linfocitos Th2, y LTreg durante la respuesta adaptativa, cuya función resulta ser antagonista de las citocinas pro-inflamatorias. Altera la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-12, disminuye la actividad de las células CD8<sup>+</sup>, inhibe el procesamiento y la presentación antigénica y la expresión de moléculas co-estimuladoras. En la TB se observó que los niveles elevados de esta citocina se correlacionaron con una mayor carga bacteriana, mientras que la deficiencia de IL-10 se asoció con una disminución de los niveles de *Mtb*. Además, se determinó que en los pacientes tuberculosos, la expresión del ARNm de IL-10 detectada en el fluido pleural y en lavados bronquio-alveolares, se encuentra aumentada. La IL-10 se asoció a la persistencia de la *Mtb* dentro de los MØ durante la infección (Kaufmann, S. H. 2002).

#### **1-4.2.3.9 IL-4**

Esta citocina es sintetizada por diversos tipos celulares (Th0, Th2, mastocitos y basófilos entre otros), con múltiples funciones durante la respuesta inmune, actuando sobre los LT y LB, monocitos, mastocitos y fibroblastos. IL-4 se comporta como una citocina significativamente antiinflamatoria debido a su actividad antagonista contra la respuesta Th1 y la inhibición de las células Th17. (Steinmann, L. 2007). Experimentos de bloqueo de la conversión de testosterona a DHEA indujeron una mayor producción de IL-4 (Araneo, 1991). La progesterona incrementa la producción de IL-4 (Piccinini, M. P. y cols, 1995), y los ratones gestantes produjeron más IL-4, en concordancia con los mayores niveles hallados en las concentraciones en plasma, típicos de este estadio fisiológico (Dudley, D. L. y cols, 1993). Dado que es capaz de inhibir la producción de IFN $\gamma$ , su incremento ha sido asociado con un aumento de la severidad de la TB (Brown, M. A. 2008; Nelms, K. y cols, 1999).

#### **1-4.2.3.10 IL-17**

Existen cuatro isoformas de IL-17 (IL-17A, B, C y D, esta última conocida como IL-15), siendo la IL-17A la más estudiada de ellas (Crome, S. Q. y cols, 2010). Es secretada por una población particular de LT CD4<sup>+</sup>, que no son Th1 ni Th2, conocidos con LTh17 (Afzali, B. y cols, 2010). Esta citocina es capaz de reclutar neutrófilos y

aumentar la sobrevivencia de los MØ y estimula la producción de mediadores pro-inflamatorios. Además, favorece la producción de IL-2 incrementando así la proliferación de LT con actividad regulatoria (Crome, S. Q. y cols, 2010).

#### **1-4.2.3.11 IL-23**

Se halla producida por DC y MØ en respuesta a la activación a través de TLR-2 y favorece la producción de mediadores pro-inflamatorios como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Iwakura, Y. y cols, 2006). Los monocitos infectados por *Mtb* aumentan la producción de IL-23 (Giacomini, E. y cols, 2011). Además IL-23 es capaz de sostener la actividad de los LT  $\gamma\delta$  y la expansión de los clones Th17, tipos celulares esenciales para la inmunidad protectora hacia micobacterias (Giacomini, E. y cols, 2011).

#### **1-4.2.3.12 IL-27**

Incrementa la producción de IFN $\gamma$  por parte de los LCD4+, aumentando la protección efectiva contra el *Mtb*. Sin embargo, y para disminuir los efectos perjudiciales del IFN $\gamma$  sobre los LCD4+ (aumento de la susceptibilidad a las señales apoptóticas) esta citocina es capaz también de favorecer el incremento de IL-10 (Li, X. y cols, 2007; Torrado, E. y cols, 2011).

#### **1-4.2.3.13 TGF- $\beta$**

Es una citocina que posee muchas funciones durante el crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares. En el sistema inmune se comporta como supresora de la respuesta dado que es capaz de inhibir la proliferación y funcionalidad de los linfocitos, la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ . Durante la TB activa los monocitos y DC expresan TGF- $\beta$  en forma constitutiva (Toosi, Z. y cols, 1995; Van Crevel, R. y cols, 2002). Los pacientes con TB pulmonar poseen altos niveles plasmáticos de esta citocina. Dado su papel en la reparación tisular resulta esencial para la formación del granuloma, sin embargo, una producción excesiva y sostenida de TGF- $\beta$  se asocia con fibrosis pulmonar y hepática (Bonecini-Almeida, M. G. y cols, 2004; Cua, D. J. y cols, 2006).

## **1-5 Justificación del presente trabajo de tesis**



La enfermedad tuberculosa afecta esencialmente al pulmón donde puede producir desde algunas pocas lesiones hícticas hasta un cuadro de intensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Dicho espectro de afectación orgánica parece estar relacionado con la respuesta inmune celular hacia la micobacteria, habida cuenta que puede mediar tanto protección como patología. Como fuera adelantado los elementos esenciales que participan de esta respuesta comprenden a los macrófagos y a las células T. Los primeros fagocitan a la micobacteria, promoviendo la producción de diferentes citocinas y la presentación de antígenos a células T CD4+, las que a su vez sintetizan mediadores tipo Th1, como el IFN $\gamma$  y la IL-2, capaces de potenciar la acción bacteriostática-bactericida de los M $\phi$  y promover la proliferación de los linfocitos respondedores, respectivamente. Como contraparte las células T también pueden diferenciarse hacia el tipo Th2 para sintetizar citocinas estimuladoras de la inmunidad humoral como la IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Estudios en pacientes con TB de distintas geografías concuerdan en observar alteraciones en la producción de citocinas Th1 y Th2 con un predominio de las primeras en las formas leves, no así en los casos avanzados donde prevalece la síntesis de citocinas Th2. Los factores por los cuales se produce esta alteración involucran no sólo a mediadores inmunológicos sino también a componentes del sistema neuroendócrino dado su estrecha interconexión. Es sabido que las citocinas inflamatorias estimulan el eje HHA con la consecuente secreción de cortisol y DHEA. Ambas hormonas pueden afectar, a su vez el desarrollo de la respuesta inmune. Así, los glucocorticoides facilitan la actividad Th2 en parte a través de una inhibición de las células Th1, mientras que la DHEA y la DHEAs contrarrestan los efectos de los GC favoreciendo respuestas Th1. Un trabajo reciente sobre la relación entre los niveles de cortisol y DHEA en pacientes tuberculosos varones con distinto grado de lesión pulmonar puso de manifiesto que todos ellos presentaban un aumento en los valores de cortisol, no así la DHEA cuyas concentraciones se ubicaron muy por debajo de los controles, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos (Del Rey, A. y cols, 2007). Estudios simultáneos apuntan asimismo que este desequilibrio entre ambos esteroides pueden favorecer un desbalance Th1/Th2 lo cual tendría una repercusión desfavorable para la TB puesto que el control de la replicación del patógeno depende fundamentalmente de una respuesta Th1 apropiada.

Del Rey y colaboradores (Del Rey, A. y cols, 2007) también comunicaron una disminución en los niveles de testosterona en presencia de mayores concentraciones de estradiol en pacientes varones con Tuberculosis moderada a severa.

Muy pocos estudios han tenido en cuenta la participación de los esteroides sexuales en la resistencia/susceptibilidad a la TB tanto en humanos como modelos

experimentales. El tema no es menor habida cuenta de las demostraciones comentadas más arriba respecto de la influencia de los esteroides sexuales sobre distintos componentes de la respuesta inmune. Al respecto, un par de trabajos señalan que los ratones hembras son más resistentes a la infección con micobacterias no tuberculosa, y que el tratamiento con testosterona eleva la susceptibilidad a la infección con *Mycobacterium marinum* (Yamamoto, Y. y cols, 1990; Yamamoto, Y. y cols, 1991).

En función de todo lo expuesto resulta de sumo interés analizar la influencia de las hormonas sexuales en la enfermedad tuberculosa. Para una aproximación más mecanística el estudio se centró inicialmente en un modelo muy bien caracterizado de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal con *Mtb* cepa H37Rv. En un paso posterior se abordó el estudio de los perfiles para hormonas sexuales en pacientes con TB pulmonar y su relación con citocinas involucradas en el proceso inmuno-inflamatorio que coexiste en esta patología.

# OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

### 2-1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al mejor conocimiento de la interrelación entre la respuesta inmune y componentes del eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal durante la infección tuberculosa

### 2-2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2-2.1 En el modelo experimental

➤ Establecer las diferencias en el curso de la enfermedad (mortalidad, carga bacilar pulmonar, extensión de daño histológico, expresión de citocinas (primordialmente de tipo Th1 y Th2) e iNOS, entre ratones machos y hembras de la cepa Balb/c infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de *M. tuberculosis* de probada virulencia (cepa H37Rv).

➤ Comparar la evolución de la enfermedad entre ratones machos y hembras castrados y no castrados

➤ Cuantificar las concentración de testosterona en el suero de ratones machos infectados a lo largo de la enfermedad

#### 2-2.2 En la infección en el hombre

➤ En pacientes con TB pulmonar de distinta severidad, HIV negativos y que aún no han iniciado tratamiento antibacilar.

➤ Investigar en qué medida las variaciones en los niveles circulantes de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona y citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-6 se correlacionan entre sí y con la severidad de la enfermedad.

➤ Ahondar en el conocimiento de la interrelación entre citocinas y esteroides sexuales.

# MATERIALES Y MÉTODOS

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3-1 EL MODELO EXPERIMENTAL

##### 3-1.1 Organización e infección de los grupos experimentales

Para realizar la infección en el modelo animal, la cepa de *Mtb* H37Rv (ATCC N° 25618) se cultivó en medio Middlebrook 7H9 (DIFCO), suplementado con glicerol 0,2% (v/v), 10% de medio de enriquecimiento OADC (DIFCO) y Tween-80 0,02% v/v a 37°C. Para todos los experimentos los cultivos se utilizaron cuando se arribó a la fase logarítmica de crecimiento. Las micobacterias se contaron y almacenaron a -80°C hasta su uso. Las alícuotas fueron descongeladas y sonicadas para impedir su aglomeración.

Se trabajó con cuatro grupos de animales:

- **45 ratones machos castrados** de la cepa BALB/c, de 8 semanas de edad y 21-23 gr de peso. La castración se realizó removiendo ambos testículos mediante una incisión quirúrgica a lo largo de la línea media del escroto, bajo anestesia en cámara de gas, utilizando 0.2 ml de sevofluorano (ABBOT, USA), por ratón.

- **45 ratones machos** BALB/c de 8 semanas de edad y 21-23 gr de peso, conformaron el grupo simulado (*sham*), en el que se realizó una cirugía simulacro de castración. Para ello se realizó una incisión a lo largo de la línea media del escroto, a través de la cual los testículos se sacaron fuera del escroto y se colocaron nuevamente dentro, sin seccionarlos.

- **45 ratones hembras castradas** BALB/c, de 8 semanas de edad y 21-23 gr de peso. Este grupo fue gonadectomizado retirando ambos ovarios a través de incisiones bilaterales realizadas en el dorso. Los ratones estaban sedados bajo anestesia utilizando cámara de gas, con 0.2 ml de sevofluorano por ratón.

-**45 ratones hembras** BALB/c pertenecientes al grupo simulado, de 8 semanas de edad y 21-23 gr de peso. Para esta operación, se realizó la incisión quirúrgica en el dorso, los ovarios fueron identificados y se suturó la incisión con hilo estéril.

Luego de dos semanas de recuperación, todos los animales fueron anestesiados en cámara de gas, utilizando 0.1 ml de sevofluorano por ratón, y se infectaron por instilación intratraqueal con  $2.5 \times 10^5$  de bacilos vivos, en cabina de bioseguridad nivel III. Los ratones se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación espontánea. Los

ratones infectados se colocaron, en grupos de 5, en cajas equipadas con microaisladores conectados a un sistema de presión negativa de acuerdo con las normas de bioseguridad nivel III.

Los animales se mantuvieron con luz entre las 6 y las 18 hs y alimentados con alimento estéril *ad libitum* y agua esterilizada por autoclave.

En los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 post infección, se sacrificaron 5 animales por grupo, por exsanguinación bajo anestesia con 56 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal, en cabina de bioseguridad nivel III. Para los estudios histopatológicos se fijaron y prepararon 3 pulmones, derecho o izquierdo, por tiempo. Para la determinación de carga bacilar y estudios de expresión génica, se congelaron y mantuvieron a -70°C, 7 pulmones más, luego de eliminar los nódulos linfáticos y tejidos del timo.

Se conservaron 10 animales por grupo para registrar la mortalidad y construir curvas de supervivencia. Estos animales fueron monitoreados todos los días y cuando mostraban anormalidades como insuficiencia respiratoria, caquexia acentuada o inmovilización total, fueron sacrificados bajo anestesia inducida por pentobarbital intraperitoneal, de acuerdo a los estándares éticos internacionalmente establecidos y aprobados por los comités de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Dr Salvador Zubirán” y de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario

### **3-1.2 Preparación del tejido pulmonar para análisis histológico y morfometría.**

Los pulmones destinados al análisis histológico se perfundieron, por vía intratraqueal, con 10% de formaldehído diluido en PBS, se mantuvieron así por 24 horas y luego fueron embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se montaron en portaobjetos, fueron desparafinados y teñidos con hematoxilina-eosina. Para la cuantificación de infiltrado inflamatorio se evaluaron pulmones de al menos 3 ratones diferentes. Se seleccionaron 10 campos microscópicos al azar y se analizaron con un aumento de 20x. Se midió, en un equipo de Morfometría Q-win Leica 500, el área ocupada por el infiltrado inflamatorio en torno a las vénulas (de aproximadamente 100  $\mu$  de diámetro), bronquial (150-200  $\mu$  de diámetro), el intersticio alvéolo-capilar, tamaño de los granulomas y área del pulmón ocupada por neumonía.

### **3-1.3 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmones infectados**

Para este análisis, se utilizó el pulmón derecho o izquierdo de 4 ratones por tiempo, en dos experimentos separados. Los pulmones fueron homogeneizados con un Polytron (Kinematica, Luzern, Switzerland) en tubos estériles de 5 ml conteniendo 3 ml de solución salina isotónica. Los homogenatos fueron sonicados previo a cada siembra para evitar la aglomeración de bacterias y disminuir el error. De cada homogenato se sembraron 4 diluciones en placas de Petri, por duplicado. Dichas placas contenían agar Bacto Middlebrook 7H10 (Difco Labs, Detroit, MI, USA), enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa (OADC). Las placas sembradas permanecieron en estufa de CO<sub>2</sub> durante 21 días. Se realizó un conteo de colonias crecidas a los 14 días y el definitivo a los 21 días de incubación. (Hernández-Pando, R. y cols, 1996). Luego se realizaron las correcciones correspondientes a cada dilución.

### **3.1-4 Análisis de citocinas presentes en los homogenatos de pulmón por PCR en Tiempo Real**

Este análisis se realizó en dos experimentos diferentes, en tres lóbulos, derecho o izquierdo, de 3 ratones diferentes por grupo y por tiempo de sacrificio. Se aisló el mensajero del Acido Ribonucleico (mARN) de los pulmones utilizando un ARN easy Mini Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones indicadas en el kit. La calidad y cantidad de ARN se evaluó en geles de agarosa y a través de espectrofotometría (260/280). Para realizar la transcripción reversa del mARN se utilizaron 5 µg de ARN, oligo-dT y el Kit Omniscript (Quiagen, Inc). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real se desarrolló usando el 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA) y QuantitectSYBR Green Mastermix kit (Quiagen). Se incluyeron en la corrida de PCR las curvas estándar de los productos cuantificados y diluidos de la PCR, como así también los controles negativos. Se utilizó, como gen constitutivo, la proteína ácida ribosomal RLP0 (Hernández-Pando y cols, 2010). Los iniciadores (*primers*) específicos de los genes fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA), y sus secuencias fueron las siguientes:



**RLP0:**

FWD: 5'-CTC TCG CTT TCT GGA GGG TG-3';  
 RV: 5'-ACG CGC TTG TAC CCA TTG AT-3'.

**Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS):**

FWD: 5'-GCGAGAGCAGGTGGAAG-3',  
 RV: 5'-CATTTGCTGTCTCCCAA-3';

**Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ):**

FWD: 5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3',  
 RV: 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3';

**Interferón gama (IFN- $\gamma$ ):**

FWD: 5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3',  
 RV: 5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3';

**Interleucina 4 (IL-4):**

FWD: 5'-CGTCCTCACAGCAACGGAGA-3',  
 RV: 5'-GCAGCTTATCGATGAATCCAGG-3'.

**Interleucina 12 (IL-12):**

FWD: 5'-GGATGGAAGAGTCCCCCAA-3',  
 RV: 5'-GCTCTGCGGGCATTTAACAT-3'

**Interleucina 17 (IL-17):**

FWD: 5'-CACCAGCTGATCAGGACGCGC-3',  
 RV: 5'-GGACCCCAACAGCTGGAATAGA-3

Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 34 segundos. Las cantidades de mRNA específico en la muestra se midieron de acuerdo al correspondiente gen específico estándar. El número de copias del mRNA de cada citocina fue relacionado a un millón de copias de mRNA codificante del gen RLP0 (Dheda, K. y cols, 2004).

**3.1-5 Cinética de la concentración de testosterona en el suero y el efecto de la castración de ratones machos durante la enfermedad progresiva tardía.**

Se midieron los niveles de testosterona en el suero de ratones machos usando un ELISA kit para ratones específico para testosterona (EIA 1559, DRG Instruments, GmbH, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las lecturas se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas Tecan Sunrise. Se llevaron a cabo dos experimentos de castración independientes durante la etapa progresiva tardía de la enfermedad (a los dos meses post infección), en 20 ratones machos BALB/c. Se infectaron por vía intratraqueal como ya fue descrito, y dos meses luego de la infección, 10 animales fueron castrados y otros sufrieron la cirugía de simulación de la castración (sham) como ya se detalló. Treinta días después de la castración (90 días después de la infección) los animales fueron sacrificados y se realizó morfometría pulmonar, recuento de la carga bacilar y expresión de citocinas como antes se describió.

### 3-2 LA INFECCIÓN EN EL HOMBRE

#### 3-2.1 Grupos de Estudio

##### 3-2.1.1 Pacientes con TB Pulmonar

Para esta sección del trabajo de tesis, la muestra de enfermos estuvo constituida por 36 pacientes varones, que habían sido diagnosticados recientemente con TB pulmonar. Todos los pacientes eran HIV negativos y al momento de la recolección de sangre no habían recibido aún tratamiento. Los pacientes varones tenían una edad promedio de 40,7+/- 16,8 (promedio +/- desvío estándar). Se identificaron bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo de todos los pacientes y, sobre la base de criterios clínicos y radiológicos, fueron clasificados en tres categorías:

- **Leves:** presentaban un solo lóbulo involucrado, sin cavidades visibles, N= 12
- **Moderados:** Involucramiento unilateral de dos o más lóbulos con cavitaciones, si están presentes, que alcanzan un diámetro no mayor a 4 cm. N=12
- **Severos:** enfermedad bilateral con múltiples cavidades. N= 12

##### 3-2.1.2 Voluntarios Sanos (H-Co)

El grupo control estuvo integrado por 21 voluntarios hombres, con un promedio de edad de 44+- 11,3 años; y 18 mujeres, de edad promedio 35,3 +- 2,6 años. Ninguno de los voluntarios estuvo en contacto con pacientes infectados con TB y son denominados HCo (*healthy contacts*). Todas las personas otorgaron su consentimiento de participación en el estudio, y el protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario.

Se consideraron, como criterios de exclusión: patologías que afectaran el eje Hipotálamo-Hipófisis- Adrenal (tumores o vasculares por ejemplo), compromiso directo de la glándula adrenal, edad menos a 18 años, o algún desorden que requiriese tratamiento con corticosteroides, inmunomoduladores o inmunosupresores.

### **3-2.2 Determinación de citocinas en plasma**

Las muestras de sangre de los pacientes y los voluntarios sanos se recolectaron a las 8 hs de la mañana. El plasma se obtuvo de sangre tratada con EDTA. Se agregó a continuación aprotinina (100U/ml plasma; Trasylol, Bayer, Germany). Las muestras fueron preservadas a -70°C. Se realizó en ellas la determinación de los niveles de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  (Pharmingen, Alemania), IL6 (Amersham, Reino Unido), cortisol, DHEA, testosterona, progesterona, estradiol, LH y FSH (DRG Systems, Alemania) utilizando kits de ELISA disponibles comercialmente.

Los límites de detección para cada determinación fueron: IFN- $\gamma$ : 4,7 pg/ml; TGF $\beta$ : 2 pg/ml; TNF- $\alpha$ : 7,8 pg/ml; IL-6: 0,1 pg/ml; cortisol: 2,5 ng/ml; DHEA: 0,1 ng/ml; progesterona: 2 ng/ml; testosterona: 0,07 ng/ml; estradiol: 4,6 pg/ml; LH: 0,2 ng/ml (rango del ensayo: 0,86-100 mU/mL); FSH: 0,4  $\mu$ g/dl (rango del ensayo: 127-200 mIU/mL). Los resultados fueron expresados como el promedio de dos determinaciones (pg/ml) en un lector de ELISA de microplaca Tecan sunrise, a 450 nm. La cuantificación de citocinas se realizó usando como referencia curvas estándar generadas con citocinas recombinantes humanas.

### **3-2.3 Detección de citocinas por inmunohistoquímica en muestras de testículos**

#### **3-2.3.1 Cortes de necropsias**

Con el fin de determinar la producción local de citocinas por inmunohistoquímica, se estudiaron los testículos en tres necropsias de pacientes fallecidos por TB, y otros tres (controles) cuyos decesos se debieron a cáncer (leucemia) en dos de los casos, y a necrosis cortical y choque séptico en el tercero. La edad de los pacientes controles fue de 24, 42 y 40 años y no poseían antecedentes de uso de alcohol o drogas. El estudio histológico de los testículos no demostró signos de infiltración leucémica en los compartimentos intersticiales de los testículos. Las muestras fueron obtenidas de los archivos del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, de México. Se realizaron cortes de los tejidos, que fueron deparafinados y mantenidos en PBS Tween 20. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con un agente bloqueador de peroxidasa (BioSB, USA) durante 30 min. Luego del bloqueo con el bloqueador universal (BIOCARE Medical, USA), los cortes de tejido fueron incubados con anticuerpos primarios, durante toda la noche, a 4°C, a una dilución óptima establecida para cada caso.

### 3-2.3.2 Anticuerpos utilizados

Para la detección de

- TNF- $\alpha$ : anticuerpo policlonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, USA);
- IFN- $\gamma$ : anticuerpo policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, USA);
- TGF- $\beta$ : anticuerpo policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, USA);
- IL-6: IgG policlonal de rata (BD; Pharmingen, USA);
- IL-1 $\beta$ : anticuerpo policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, USA);
- *Mycobacterium tuberculosis*: anticuerpo policlonal contra diversos antígenos micobacterianos (BIOCARE Medical, USA). Se utilizó como sistema de inmunodetección HRP/DAB de ratón-conejo, y HRP de cabra-conejo (BIOCARE Medical, USA) para desarrollar la reacción. Finalmente, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

### 3-2-4 Producción de testosterona *in vitro*, por células de Leydig pre-incubadas con citocinas

La línea celular TM3, derivada de células de Leydig de ratón, fue adquirida de ATCC (ATCC® CRL1714™). Las células fueron cultivadas en medio F12 de Ham y medio

de Eagle modificado de Dulbecco 1:1 vol, con 2.5 mM de L-glutamina, 0,5 mM de piruvato de sodio, 1,2 g/L de bicarbonato de sodio y 15 mM de HEPES (todos de Corning Life Technologies, USA), 92.5%; 5% de suero de caballo y 2.5% de suero fetal bovino (ambos de Thermo Scientific, USA ). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda (95%) a 5% CO<sub>2</sub>. Para medir la producción de testosterona, las células TM3 se plaquearon en placas de 96 wells. Luego de 48 hs, el medio fue reemplazado por medio con 2.5 UI/ml hCG (Sigma, USA), provisto gentilmente por la Dra Lorenza Díaz, del Departamento de Biología Reproductiva, INCMNSZ, durante dos horas, y luego se colocaron las citocinas recombinantes de ratón TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF- $\beta$ , gentilmente provistos por el Dr Lopez Casillas, del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional de México. Las citocinas se colocaron en las siguientes dosis: TNF- $\alpha$ , 5 ng/ml; IFN- $\gamma$ : 4000 pM y TGF- $\beta$ : 1 ng/ml, según lo hallado en la literatura y luego de realizar curvas de dosis-respuesta. Las diferentes condiciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Cuatro horas más tarde, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se midieron las concentraciones de testosterona utilizando un kit de ELISA comercial (DRG systems, USA), según las instrucciones del fabricante.

### **3-3 Análisis Estadístico**

#### **3-3.1 En el modelo murino:**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  desvío estándar. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba de ANOVA, mientras que la diferencia entre cada uno de los grupos se evaluó utilizando la prueba t de student. Las curvas de supervivencia fueron analizadas mediante las curvas de Kaplan y Meir y la prueba de Log Rank. Se consideró estadísticamente significativa cuando el valor de  $p$  resultó menor a 0.05

#### **3-3.2 En los estudios clínicos:**

Se llevaron a cabo comparaciones estadísticas mediante la pruebas de Man-Whitney, o Kruskall-Wallis (esta última seguida de comparaciones post-hoc cuando correspondía).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las correlaciones entre hormonas y citocinas se realizaron por métodos no paramétricos. La significancia estadística se infirió para valores de  $p < 0.05$ .

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4-1 -EN EL MODELO MURINO

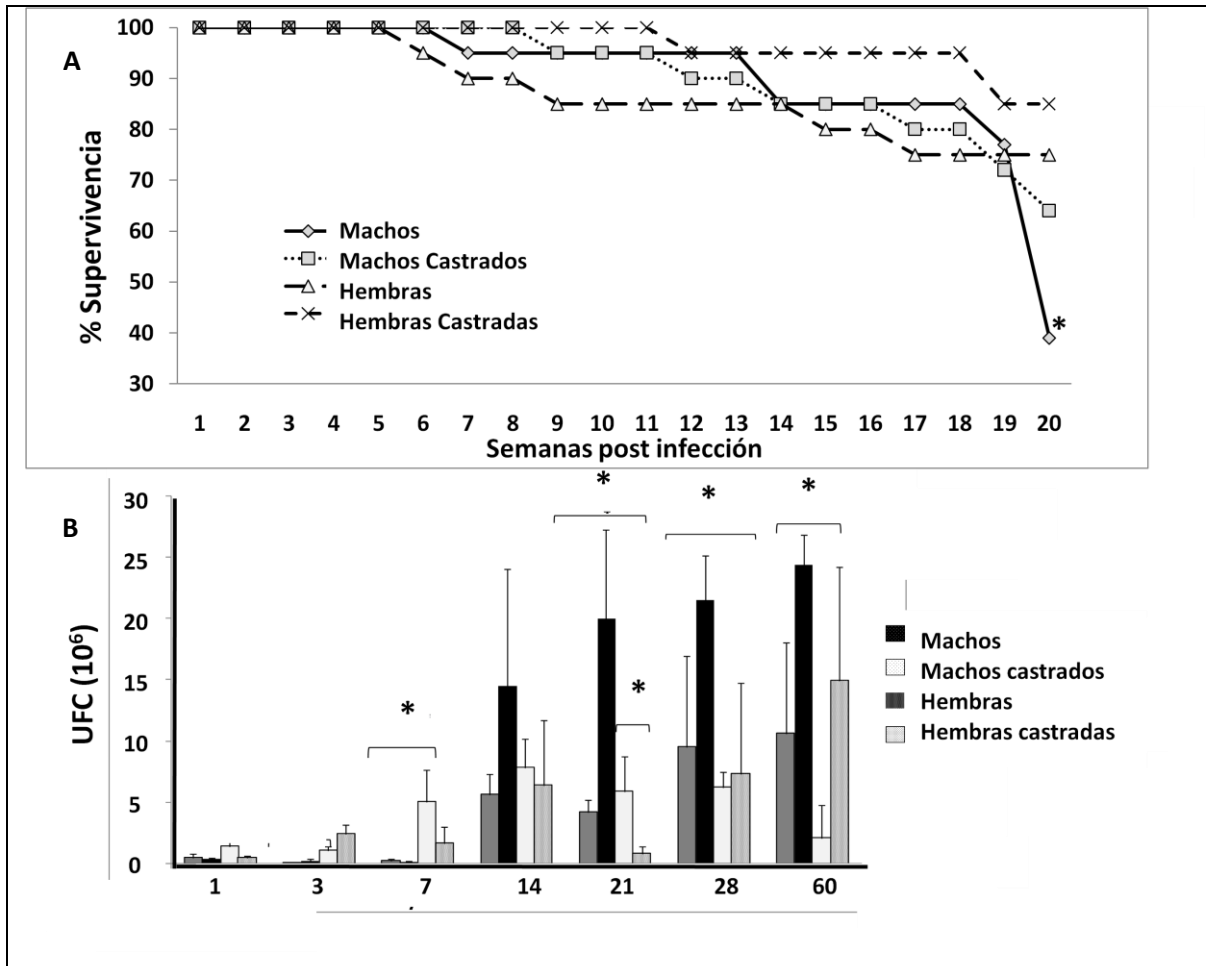
#### 4-1.1 Efecto del género y la castración en ratones sobre la supervivencia y la carga bacilar pulmonar luego de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

Con el objeto de estudiar el efecto del género sobre el curso de la TB experimental, se infectaron grupos de ratones BALB/c no castrados, machos (M) y hembras (F); y castrados, machos (CM) y hembras (CF). La infección se realizó por vía intratraqueal con la cepa H37Rv. Luego de 4 meses de infección, sólo el 40% de ratones machos sobrevivió. En contraste, las hembras infectadas mostraron una tasa de supervivencia del 75%. Se observó una tasa similar en el grupo CF, mientras que el 60% de CM permaneció con vida luego de 120 días post infección. (Fig 10 A) Estas tasas de supervivencia se correlacionan con el recuento de bacilos vivos en los homogenatos de pulmón, observándose, desde el día 14, que los M mostraban un número mayor de UFC que los grupos CM, F y CM. Se observaron diferencias significativas desde el día 21, siendo el grupo CM el que mostró el más bajo recuento de colonias al día 60 (Fig 10 B).<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Habida cuenta del número de grupos experimentales, los resultados de los experimentos llevados a cabo en el modelo murino se representan por medio de barras y desvío estándar.



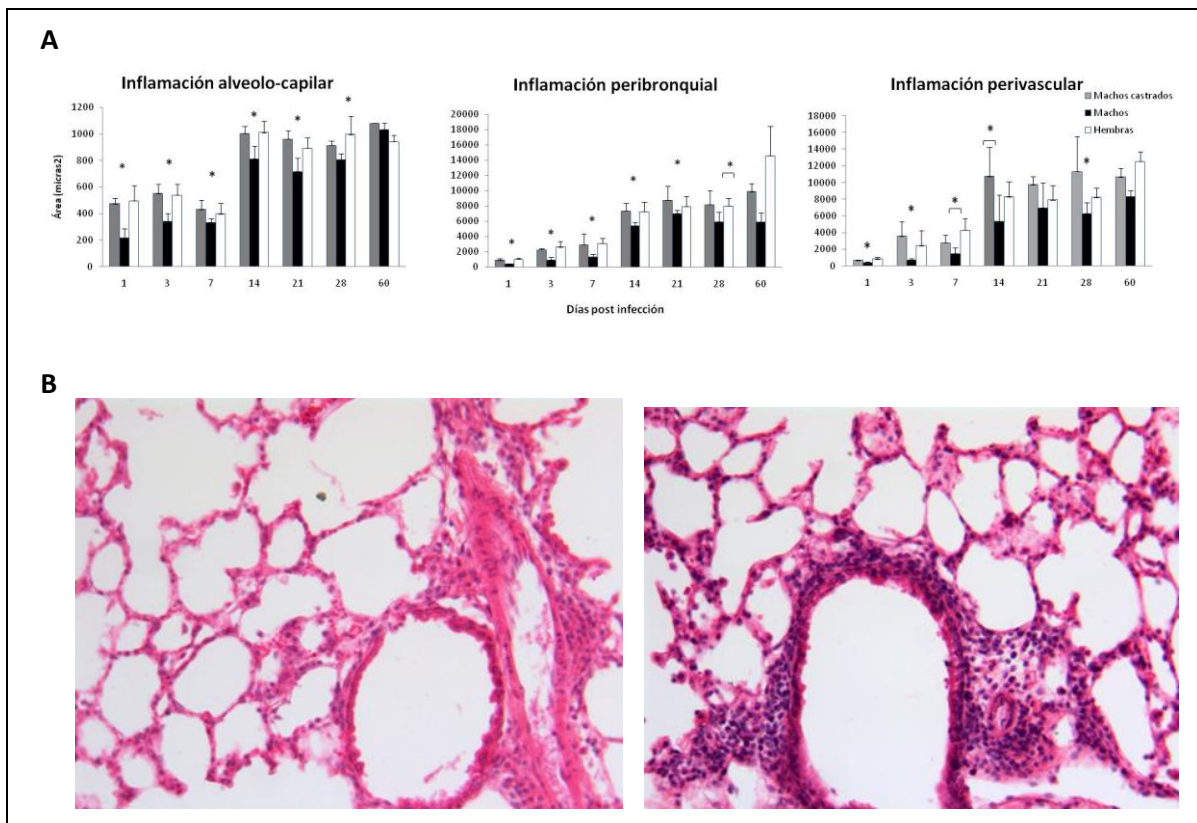


**Fig 10 Supervivencia y comparación de la carga bacilar pulmonar entre ratones Balb/c, machos y hembras, castrados y no castrados.** A) Curva de supervivencia, los ratones machos exhibieron diferencias en la supervivencia, significativamente menor en comparación con el grupo de las hembras ( $p < 0.005$  Log Rank Test). B) Recuento bacilar pulmonar: los ratones fueron sacrificados en los días indicados post infección, y los pulmones ( $n = 4$  por tiempo de sacrificio) fueron utilizados para el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Durante la enfermedad avanzada, los machos mostraron mayor recuento de colonias que los otros grupos. Los asteriscos representan el significado estadístico.

#### 4-1.2 Efecto del género y la castración sobre la respuesta inflamatoria durante la Tuberculosis pulmonar experimental

En todos los compartimentos pulmonares (intersticio alveolo-capilar y áreas perivascular y peribronquial) de los grupos CM y F se observó un infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y MØ significativamente por encima del constatado en el grupo

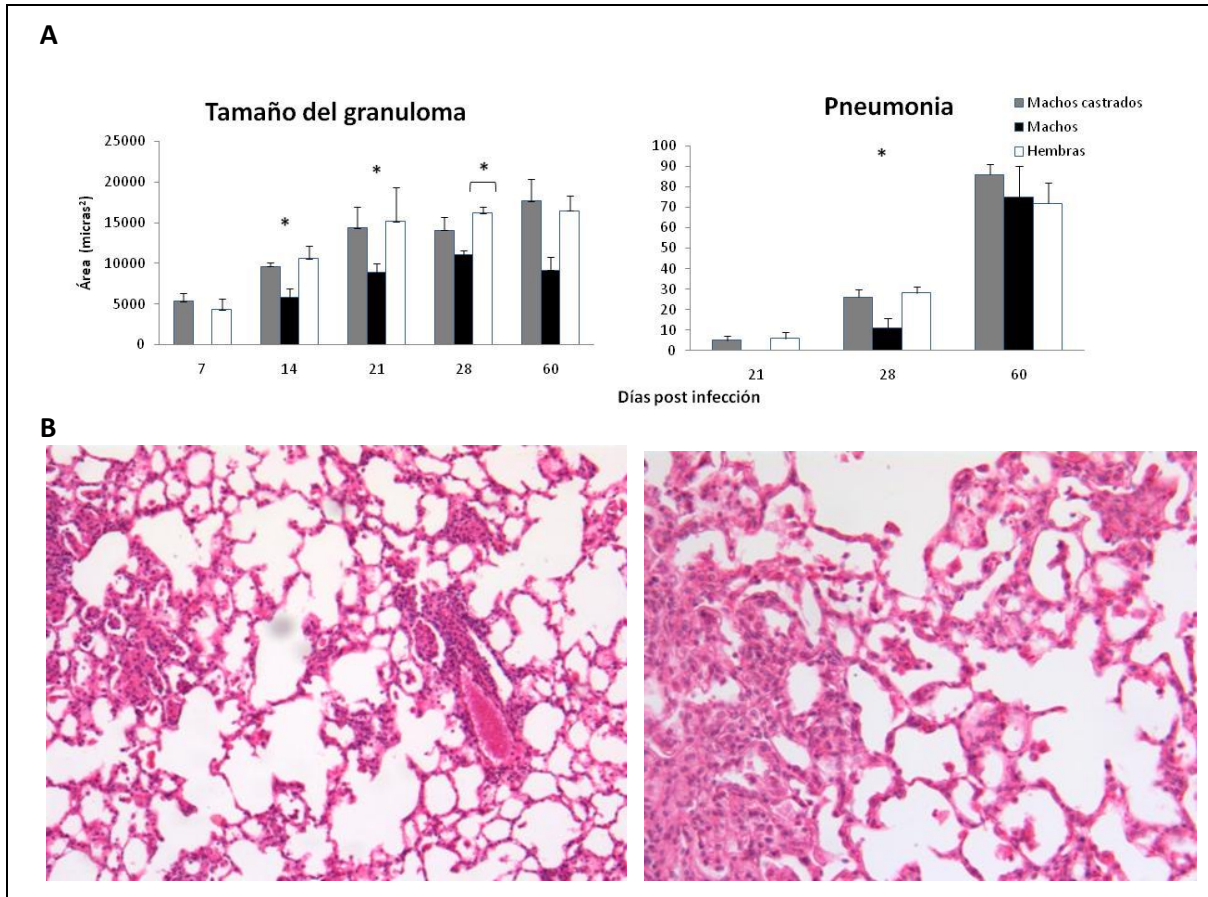
M, desde el día 1 hasta el 28 inclusive. (Fig 11). Los grupos F y CF no mostraron diferencias significativas en estas variables, por eso el grupo CF no se presenta en la figura.



**Fig 11 Cinética del infiltrado inflamatorio en los pulmones infectados de ratones Balb/c e histopatología pulmonar.** A) Cinética de los infiltrados inflamatorios pulmonares en ratones BALB/c, machos y hembras, castrados y no castrados. Tres pulmones de diferentes animales sacrificados en los tiempos indicados se procesaron para análisis histológico. El área inflamatoria de cada compartimento se determinó por Morfometría automatizada. Los asteriscos representan diferencias estadísticas. B) Histopatología del pulmón de ratón luego de 21 días de infección; la figura de la izquierda corresponde a un macho que muestra escaso infiltrado inflamatorio en las áreas peribronquial y perivascular. La micrografía de la derecha es un área similar correspondiente a una hembra con mucho infiltrado inflamatorio (flechas) incluyendo el intersticio alveolo-capilar (asterisco) (hematoxilina-eosina, Aumento: 10x).

Los pulmones de CM y F revelaron granulomas bien formados y de tamaño similar durante la primera semana de infección, mientras que el grupo M exhibió granulomas más pequeños luego de 2 semanas de infección y durante el resto de la misma (Fig 12A). Los ratones de los grupos CM y F mostraron pequeños parches de neumonía, que afectaban un poco menos del 10% de la superficie pulmonar, al cabo de 3 semanas de infección, mientras que en el grupo M, la neumonía comenzó después y fue

significativamente menor que la de los grupos CM y F. Sin embargo, hacia el día 60, la consolidación fue similar en los 3 grupos (Fig 12B).



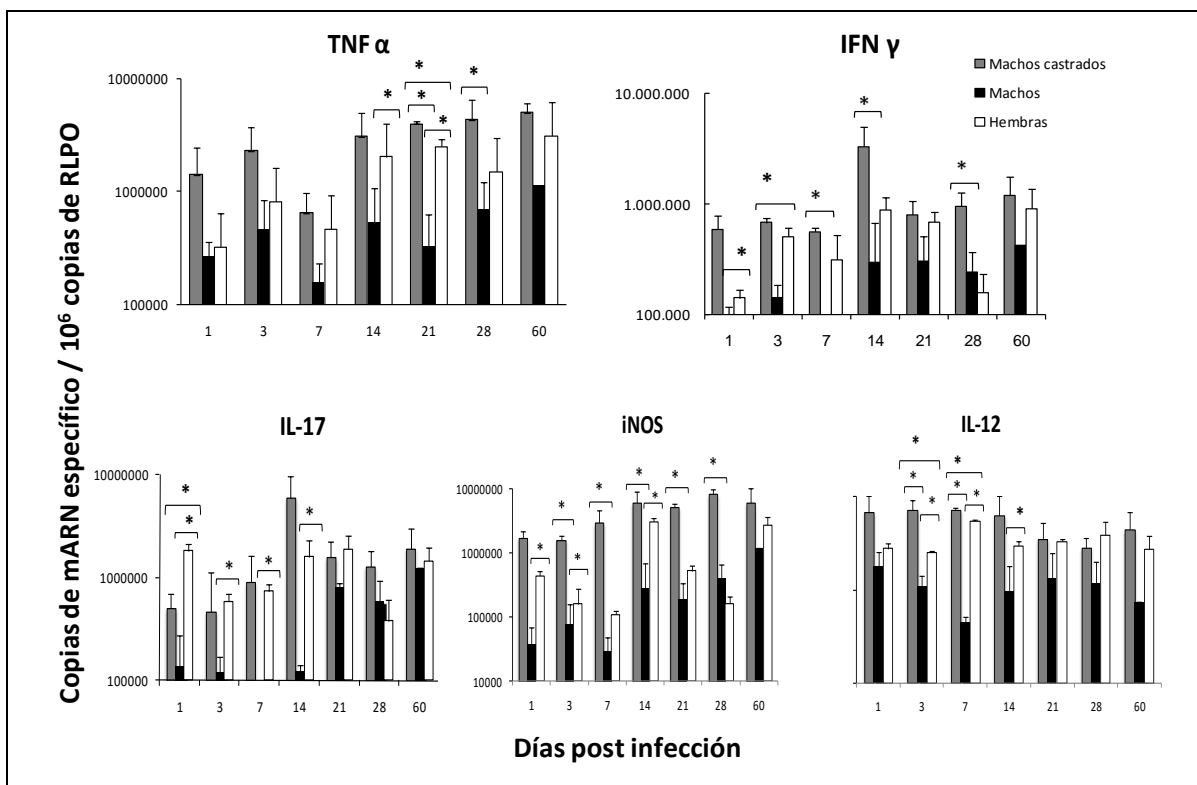
**Figura 12: Determinación del tamaño de granuloma y área afectada por neumonía en pulmones, luego de 28 días de infección.** A) Tamaño de los granulomas (en micras cuadradas) y porcentaje de la superficie pulmonar afectada por neumonía, determinados por Morfometría automatizada, en el tejido de tres ratones por tiempo y condición. Los asteriscos representan el significado estadístico. B) Campos histológicos de pulmones infectados de un ratón macho (no castrado) en la figura izquierda, y de un ratón hembra, en la figura derecha, luego de 28 días de infección. El pulmón del ratón hembra exhibe un área neumónica más extensa (asterisco) y granulomas más grandes (flechas) que el ratón macho. (hematoxilina-eosina, Aumento: 10x)

#### 4-1.3 Expresión génica de citocinas en los ratones infectados

La expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17 como así también de iNOS fue mayor en los ratones del grupo F y CM que en el M. (Fig 13), mientras que no se hallaron diferencias significativas entre los ratones del grupo F y CF

para ninguno de los mediadores estudiados (datos no presentados). En los grupos F y CM se observó una progresiva expresión de TNF $\alpha$ , mayor que la correspondiente al grupo M, en todos los tiempos, siendo estadísticamente significativa en los días 14 y 21 post infección. La mayor expresión se registró en el grupo CM.

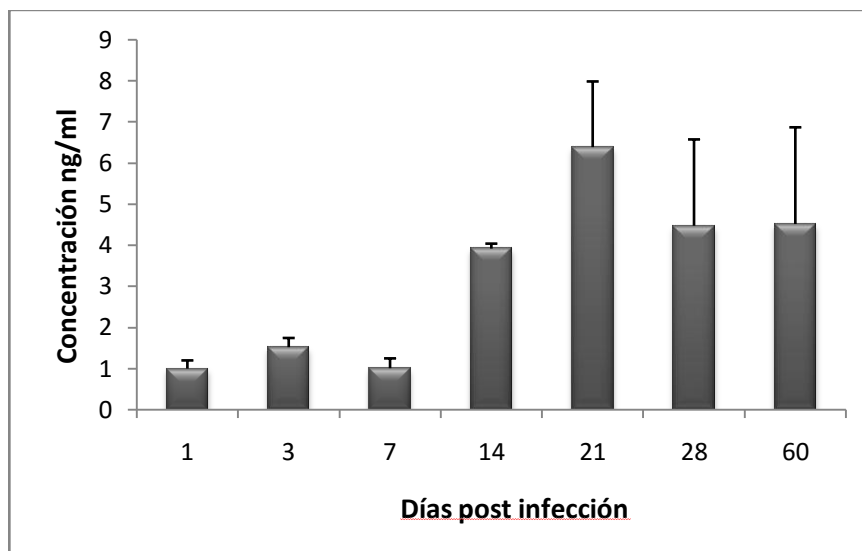
La expresión de IL-12, IFN $\gamma$  e IL-17 fue similar en los grupos F y CM y mayor que en el grupo M, siendo significativas durante la fase temprana de la infección (luego de la primera y segunda semana). La expresión de iNOS también se ubicó por encima en los grupos F y CM, con diferencia significativa respecto del grupo M durante el primer mes de infección (Fig 13). La expresión de IL-4 no arrojó resultados significativos (datos no presentados).



**Figura 13: Cinética de la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias e iNOS, determinada por RT-PCR, en los pulmones infectados. Ratones machos, castrados y no castrados, y ratones hembras Balb/c, infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, y sacrificados en distintos tiempos. Los pulmones de tres animales diferentes de cada tiempo se utilizaron para determinar la expresión génica de las citocinas indicadas- Los asteriscos representan la significación estadística entre grupos.**

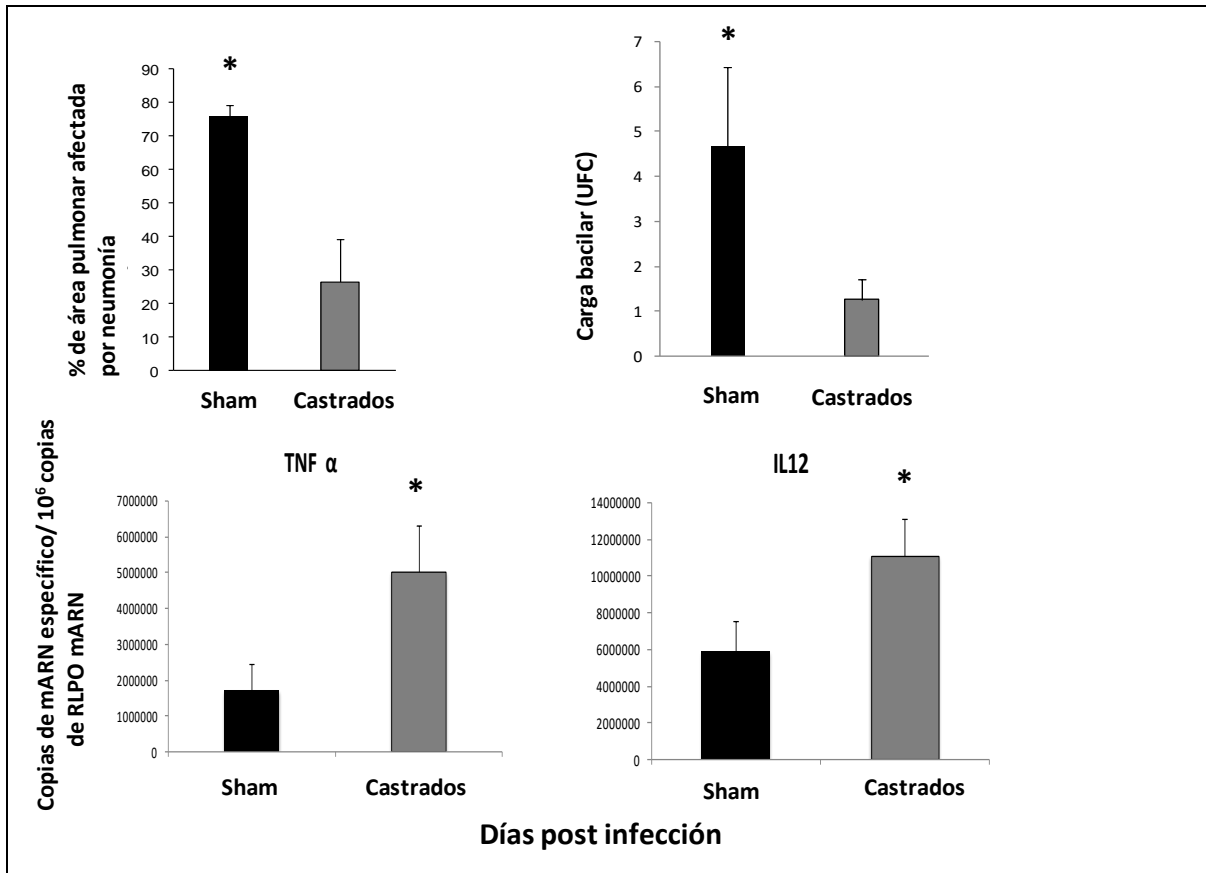
#### 4-1.4 Concentración de testosterona en el suero y efecto de la castración durante la enfermedad avanzada.

En la medición de las concentraciones de testosterona en el suero, durante la cinética de la TB pulmonar experimental, se registraron 1-1,5 ng/ml durante la primer semana de infección; al día 14 incrementó 4 veces y se mantuvo en una concentración similar hasta el día 60, excepto hacia el día 21, en que se registró un pico máximo en la concentración (6 ng/ml +/- 2) (Fig 14). Las concentraciones altas de testosterona coincidieron con la inflamación pulmonar progresiva debido a la formación de granuloma y neumonía, sugiriendo que el incremento en la producción de testosterona podría contribuir al control del daño tisular por inflamación excesiva. Sin embargo, esto podría permitir la proliferación bacilar.



**Figura 14: Concentración sérica de testosterona en el curso de la tuberculosis pulmonar.** Mediante ELISA se cuantificaron los niveles de testosterona sérica de ratones machos no castrados en los tiempos indicados luego de la infección intratraqueal con la cepa H37Rv de *M tuberculosis*. Los datos se expresan como media y desvío estándar de seis ratones por tiempo.

Con el objetivo de investigar este punto, se infectó un grupo de ratones machos. Sesenta días post infección fueron castrados, y 30 días más tarde (90 post infección), fueron sacrificados, para determinar colonias de bacilos en pulmones, extensión de neumonía y expresión de algunas citocinas proinflamatorias. En comparación con el grupo bajo operación simulada (*sham*), los ratones machos castrados mostraron una carga bacilar y neumonía significativamente menor, así como mayor expresión de TNF- $\alpha$  ( $p=0,001$ ), IL-12 ( $p=0,004$ ) y IFN- $\gamma$  (no significativa) (Fig 15).



**Figura 15: Efecto de la orquitectomía en ratones BALB/c 60 días después de la infección.** Luego de dos meses de infección intratraqueal con *Mtb* cepa H37Rv, seis ratones machos fueron castrados y seis se sometieron a simulación de castración (sham). Un mes después de la cirugía, los animales fueron sacrificados y sus pulmones se utilizaron para determinar las UFC, daño tisular y expresión de TNF- $\alpha$  e IL-12. Los animales castrados mostraron menor número de UFC y daño tisular y un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-12 respecto de los animales sham. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas

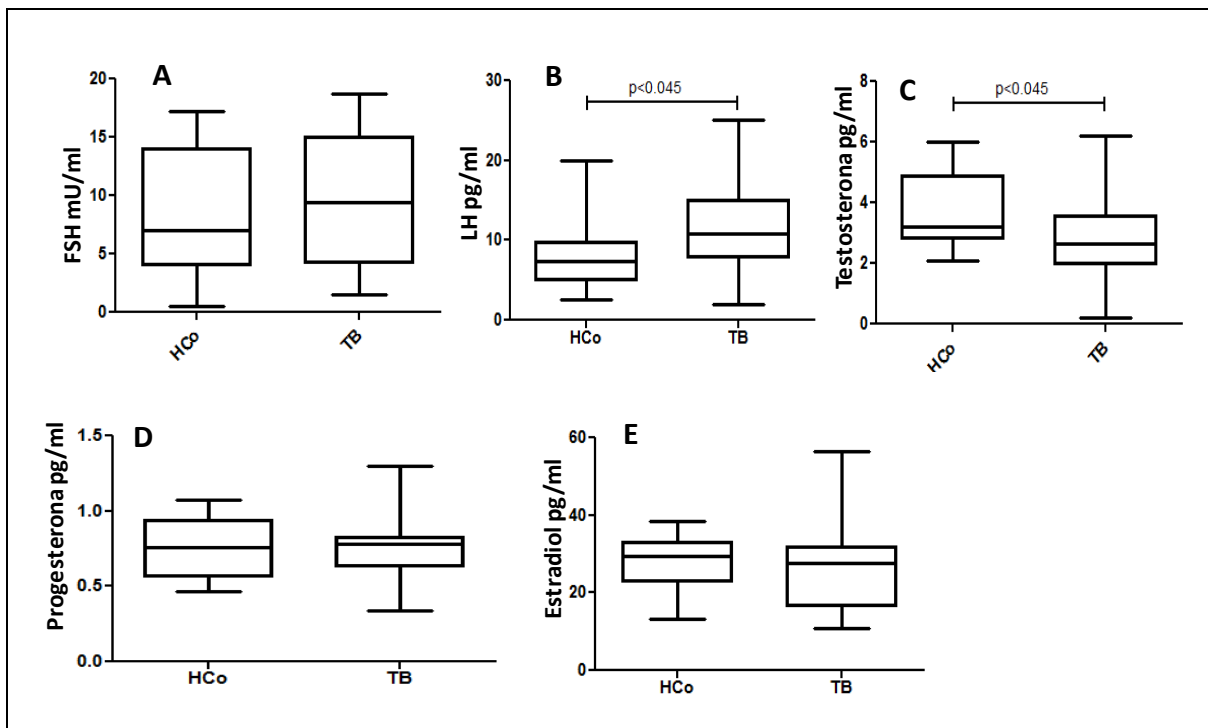
## 4-2 EN LA INFECCIÓN EN EL HOMBRE

Para ampliar el conocimiento en torno a la comunicación inmuno-endócrina, en esta parte de la tesis nos propusimos en primer término explorar las posibles relaciones entre componentes del eje HHG con las citocinas involucradas en la respuesta inmune e inflamatoria, en pacientes tuberculosos varones. En una primera aproximación se decidió analizar los mismos parámetros en un grupo de pacientes mujeres (6 con formas leves, 8 moderadas y otras 4 con enfermedad severa). Los resultados fueron inconcluyentes en gran medida porque la mayoría de las pacientes no estaban ciclando; lo cual puede estar

ligado al componente flogósico que se da en la enfermedad. Así las cosas, el estudio se centralizó en pacientes varones.

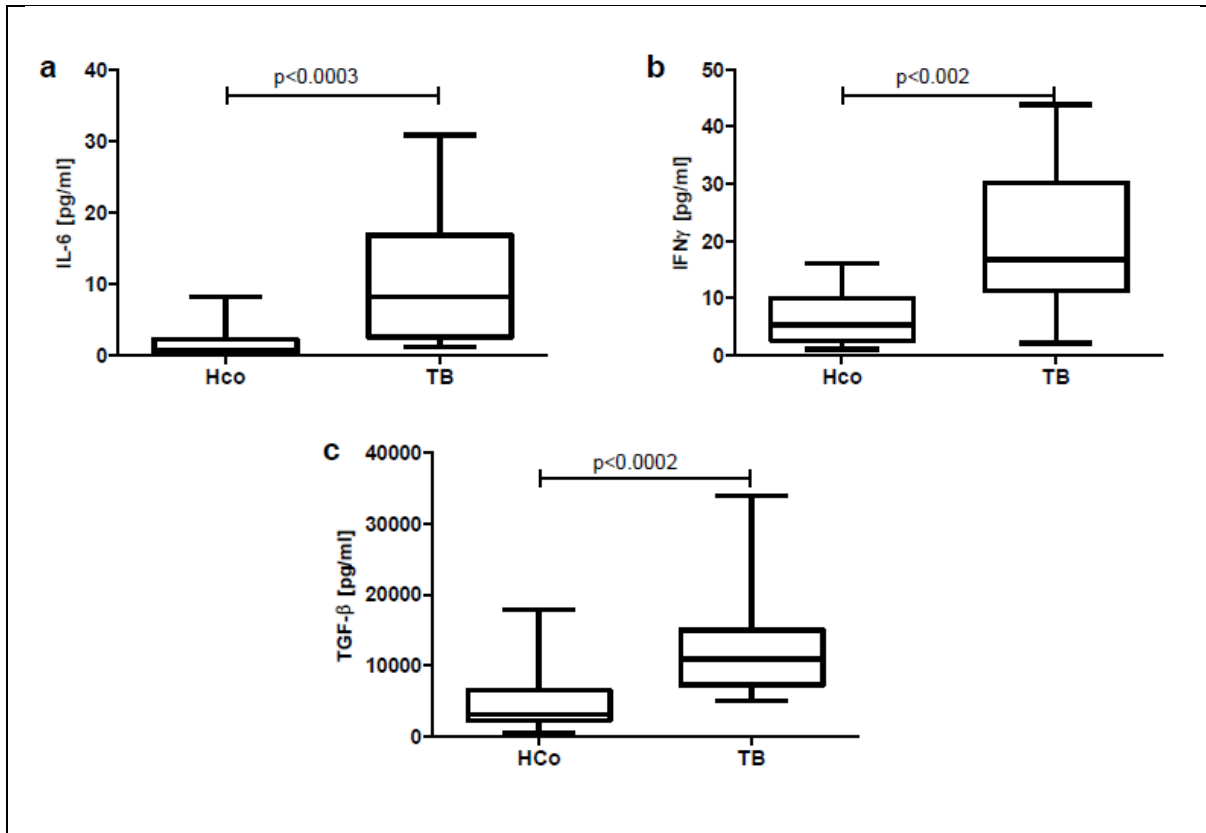
#### 4-2.1 Medición de hormonas y citocinas en plasma

La medición de hormonas relacionadas con el eje HPG mostró que los pacientes presentaban concentraciones disminuidas de testosterona, y concentraciones aumentadas de LH, en comparación con los controles sanos (HCo), sin cambios significativos para los valores de FSH, progesterona y estradiol (Fig 16, paneles a-e).



**Figura 16: Niveles circulantes de hormonas en pacientes con TB pulmonar activa y en controles sanos (HCo).** Los diagramas de caja muestran los percentiles 25-75 de los datos de cada grupo y los valores máximos y mínimos. La línea representa el valor medio. La comparación entre los grupos (TB vs. HCo) fue evaluada mediante pruebas no paramétricas (prueba de la U de Mann-Whitney).

En relación con las citocinas, no hubo diferencias importantes en la comparación entre grupos para los valores de TNF- $\alpha$  (datos no mostrados), mientras que los niveles de IFN- $\gamma$ , IL-6 y TGF- $\beta$  se encontraron aumentados en los pacientes con TB, presentando diferencia significativa con el grupo HCo (Fig 17, paneles a-c).



**Figura 17: Niveles circulantes de citocinas en pacientes con TB pulmonar activa y en controles sanos (HCo).** Los diagramas de caja muestran los percentiles 25-75 de los datos de cada grupo y los valores máximos y mínimos. La línea representa el valor medio. La comparación entre los grupos (TB vs. HCo) fue evaluada mediante pruebas no paramétricas (prueba de la U de Mann-Whitney).

Los componentes medidos no mostraron relación con la edad. Las comparaciones dentro del grupo TB, según severidad, demostraron que los pacientes con formas más avanzadas de la enfermedad tenían un incremento adicional, estadísticamente no significativo, de IFN- $\gamma$  e IL-6, respecto a los de que presentaban enfermedad leve (datos no mostrados).

Siguiendo la tendencia de hallazgos previos, los pacientes TB mostraron niveles decrecientes de DHEA ( $3.70 \pm 0.57$  ng/ml) y aumento en las concentraciones de cortisol ( $186.61 \pm 32.48$  ng/ml), en comparación con los valores de los HCo (DHEA:  $6.51 \pm 1.56$  ng/ml,  $p < 0.04$ ; cortisol:  $126.03 \pm 10.36$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) (Fig 18).



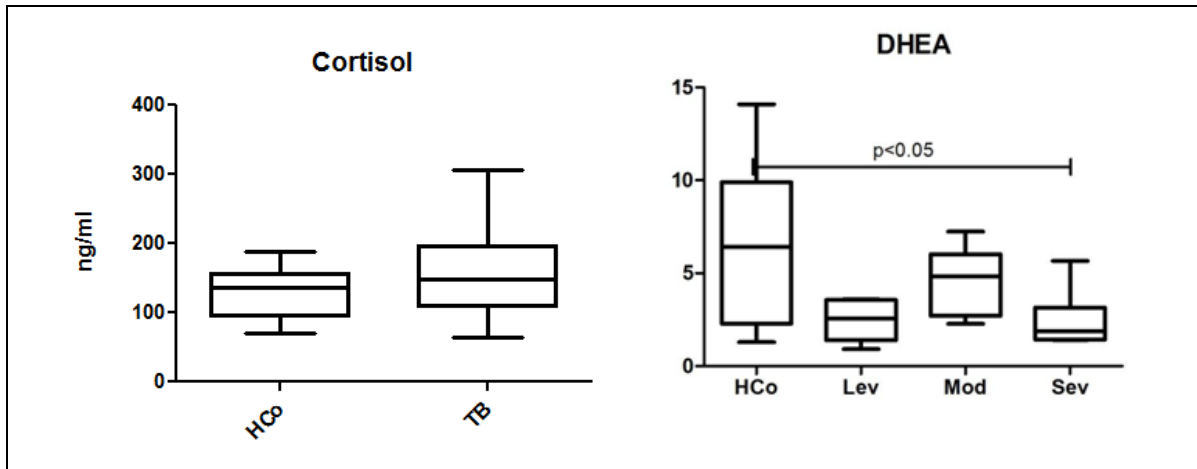


Figura 18: Niveles de cortisol y DHEA

El análisis de las correlaciones de a pares entre hormonas y citocinas reveló que los niveles de TGF- $\beta$  se correlacionaron inversamente con DHEA ( $r= -0.47$ ;  $p<0.04$ ). También se detectó una correlación inversa Testosterona/cortisol ( $r= -0.58$ ;  $p<0.003$ ) y Testosterona /IFN- $\gamma$  ( $r= -0.32$ ;  $p<0.035$ ) (Tabla 1)

Tabla 1 Correlaciones entre mediadores inmuno-endócrinos

| Variables                     | Coficiente | Valor de p |
|-------------------------------|------------|------------|
| Progesterona vs. TGF- $\beta$ | 0,61       | 0,015      |
| TGF- $\beta$ vs. DHEA         | -0,47      | 0,04       |
| Cortisol vs. Testo            | -0,58      | 0,003      |
| Testo vs. IFN- $\gamma$       | 0,31       | 0,003      |

#### 4-2.2 Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos en muestras de testículos

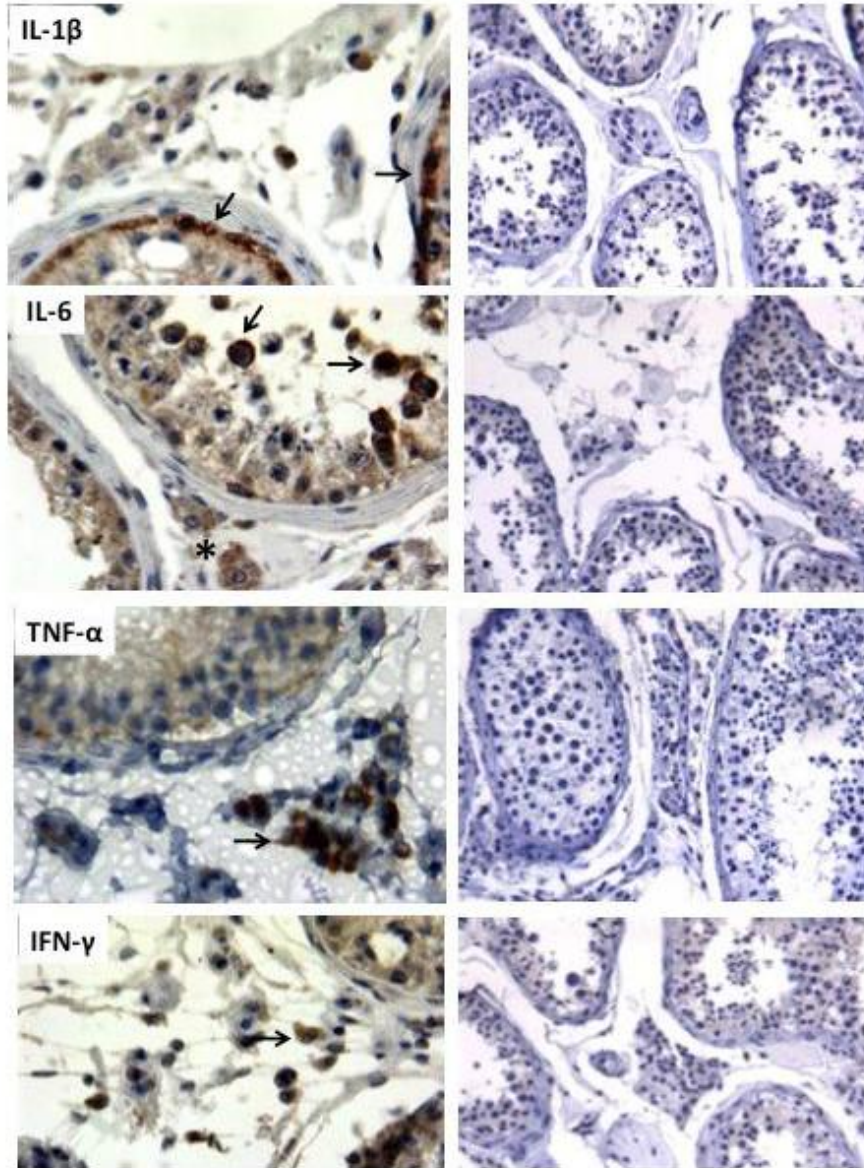
El hecho de detectarse niveles descendidos de testosterona en presencia de mayores cantidades de LH, planteaba que posiblemente la secreción de testosterona podía estar modulada *in situ* a raíz de influencias locales surgidas del proceso infeccioso, por ejemplo citocinas. En función de ello se estudiaron muestras de testículos obtenidas de necropsias de pacientes que habían fallecido de TB.

Los cortes de testículos de los casos de autopsias de pacientes con TB estudiados mostraron atrofia testicular leve, con fibrosis intersticial, infiltrado crónico focal y detención

## RESULTADOS

de espermatogénesis. No se hallaron datos a favor de una infección local por TB, como necrosis o formación de granuloma. En la detección por inmunohistoquímica de IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  se observó una fuerte tinción positiva en los macrófagos intersticiales, en células de Sertoli y en el área de espermatogénesis. Los macrófagos intersticiales mostraron fuerte inmunotinción para TNF- $\alpha$ , mientras que el área de espermatogénesis exhibió intensa positividad a IL6, y las células de Sertoli a IL-1 $\beta$  (Fig 19).

Algunos linfocitos y ocasionales macrófagos del intersticio testicular mostraron leve positividad para IFN- $\gamma$ . Algunos macrófagos mostraron tinción para antígenos de la micobacteria. No se observó reactividad contra TGF- $\beta$ . Los cortes de testículos de los sujetos controles fueron completamente negativos a todas las citocinas estudiadas (Fig 19).



**Figura 19: Inmunohistoquímica para la detección de citocinas en tejido testicular.** Los cortes histológicos de autopsias de pacientes con TB (columna izquierda) y sujetos controles, fallecidos por otras causas no asociadas a TB, (columna derecha), fueron incubados con anticuerpos específicos para cada citocina en particular. Las células de Sertoli mostraron una importante positividad para IL-1 $\beta$  (flechas), la espermatogonia denotó una fuerte inmunotinción para IL-6 (flechas) y reactividad moderada en macrófagos intersticiales (asterisco). Los macrófagos intersticiales revelaron una importante reactividad para TNF- $\alpha$  (flecha). Ocasionalmente, los macrófagos y linfocitos del intersticio testicular mostraron positividad para IFN- $\gamma$ . El tejido de las muestras control resultó negativo para todas las citocinas evaluadas. (Cortes TB 200x, cortes control 100x)

**4-2.3 Producción de testosterona por células de Leydig expuestas a diferentes citocinas.**

A partir de estos resultados, decidimos utilizar una línea de ratón de células de Leydig (no existen células humanas disponible en este sentido) las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de citocinas relevantes en la inmunopatología de la TB, tales como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  las cuales se hallaban muy presentes en los testículos y TGF- $\beta$  dado que en estudios previos esta citocina fue capaz de inhibir la producción de DHEA (D'Attilio, 2012).

Se prepararon cultivos de la línea celular TM3, derivada de células de Leydig de ratón, por triplicado, los cuales fueron tratadas con TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ , como se detalló en la sección de materiales y métodos.

La medición de los niveles de testosterona en los sobrenadantes de cultivo recolectados 24 hs más tarde reveló que las células en contacto con las citocinas indicadas produjeron cantidades mucho menores de testosterona, respecto de los cultivos donde no se adicionaron citocinas (Tabla 2).

**Tabla 2 Niveles de testosterona en los sobrenadantes de cultivo de células TM3 expuestas a las diferentes citocinas, o no**

| <b>Tratamientos</b> | <b>Niveles de testosterona (ng/ml)<sup>a</sup></b> |
|---------------------|--|
| TNF- $\alpha$       | 0.119 $\pm$ 0.012                                  |
| TGF- $\beta$        | 0.102 $\pm$ 0.042                                  |
| IFN- $\gamma$       | 0.130 $\pm$ 0.026                                  |
| Control             | 5.740 $\pm$ 0.026 *                                |

Los cultivos de células TM3 se suplementaron con hCG (para estimular la producción basal de testosterona) y citocinas recombinantes (TNF- $\alpha$  5ng/ml, IFN- $\gamma$  4000pM o TGF- $\beta$  1 ng/ml). Los cultivos controles sólo recibieron hCG, La concentración de testosterona en el medio de cultivo de las células de Leydig se evaluó por duplicado, 24 horas después.

<sup>a</sup> Los datos representan el promedio de los triplicados  $\pm$  DE de uno de dos experimentos independientes

\*Diferencia significativa respecto de los demás grupos  $p < 0.001$

# DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 EN EL MODELO MURINO

Más del 70% de los individuos que desarrollan TB activa son de sexo masculino, (Neyrrolles, O. y cols, 2009) y los estudios epidemiológicos en las áreas endémicas de países en desarrollo demostraron que los hombres sufren enfermedades más severas, tasas más altas de transmisión, mayor reactivación de infección latente y una respuesta más débil al tratamiento (Jimenez-Corona, M. E. y cols, 2006). Estas diferencias han sido atribuidas a factores socioeconómicos y culturales, que conllevan a barreras en el acceso a la asistencia hospitalaria, o a una disminución en el reporte de asistencia a la consulta por parte de las mujeres (Weiss, M. G. y cols, 2007). Sin embargo, estudios epidemiológicos de jerarquía llevados a cabo en México (Jimenez-Corona, M. E. y cols, 2006) y en India (Balasubramanian R. y cols, 2004), han demostrado que la tasa más alta de TB pulmonar detectada en hombres no es atribuible a un acceso desigual a los sistemas de salud para su diagnóstico y tratamiento. De hecho, la proporción de mujeres que fueron evaluadas para diagnóstico de TB fue más alta que la de los hombres (Jimenez-Corona, M. E. y cols, 2006), estos últimos evidencian mayores factores de riesgo asociados a la exposición a *Mtb*, como prisión (Tekkel M. y cols, 2002), indigencia (Curtis A.B. y cols, 2000), alcoholismo y tabaquismo (Kolappan C. & Goppi P. G., 2002). Por otro lado, estudios relevantes de casos y controles llevados a cabo en países de África occidental (Lienhardt C. y cols, 2005) y en Bangladesh (Hamid Salim M.A. y cols, 2004), concluyeron que el género masculino es un factor de riesgo para TB, independientemente de otros factores evaluados.

Las diferencias en las tasas de TB entre mujeres y hombres han sido además atribuidas a factores biológicos (Neyrrolles, O. y cols, 2009). Concerniente a esto, los polimorfismos o mutaciones en genes ligados al cromosoma X pueden conferir mayor susceptibilidad a TB en los hombres (Bustamante, J. y cols, 2007; Felipe Santos O. y cols, 2006), así como características específicas de metabolismo y nutrición relacionadas al género (Boelaert, J. R. y cols, 2007), o diferencias anatómicas y funcionales en el tracto respiratorio (Lin, C. M. y cols, 2008). Sin embargo, tal vez los factores biológicos más importantes asociados a una diferencia en la susceptibilidad a la TB entre hombres y mujeres, sean las influencias reguladoras que las hormonas sexuales ejercen sobre el

sistema inmune (Klein, S. L., 2000). Nuestros resultados refuerzan más este concepto, por la demostración que los ratones machos BALB/c exhibieron mayor mortalidad y carga bacilar más alta, con menor inflamación respecto de los ratones hembras, diferencias que desaparecían cuando los machos eran castrados.

En general, pareciera que los andrógenos tienen efectos supresores en las respuestas celular y humoral, por lo que pueden ser considerados como hormonas naturalmente antiinflamatorias (Roden, A. y cols, 2004), mientras que los estrógenos aumentan la inmunidad humoral y afectan el balance celular T y B (Ahmed, S. A. y cols, 1999). Esto es muy importante en relación con TB, ya que el control de la infección micobacteriana por el hospedero, tanto en el hombre como el ratón, se ha asociado con el accionar de células Th1 y los MØ activados (Silver, R.F. y cols, 1998). Estudios experimentales en ratones demostraron mayor susceptibilidad de los machos a *M. lepramurium* (Brown, I. N. & Glynn, A. A., 1987), complejo *M. avium* (Tsuyuguchi, K. y cols, 2001), *M. marinum* (Yamamoto, Y. y cols, 1991). El tratamiento con testosterona incrementó la susceptibilidad a *M. marinum* (Yamamoto, Y. y cols, 1990; Yamamoto, Y. y cols, 1991) mientras que la administración de estradiol descendió la carga bacilar de *M. avium* (Tsuyuguchi, K. y cols, 2001), en los ratones CF. Sin embargo, es importante considerar que los esteroides sexuales poseen diferentes funciones, y hasta actividades opuestas, dependiendo de sus concentraciones. Esto es particularmente evidente en mujeres que exhibieron fluctuaciones significativas durante su ciclo menstrual y en estados fisiológicos específicos, como embarazo o menopausia. Más aún, altos niveles de testosterona podrían resultar en altos niveles de cortisol, con una reducción asociada de la respuesta inmune (Roberts, M. y cols, 2009).

Nuestros resultados muestran que los ratones machos BALB/c murieron antes, la diferencia de la tasa de supervivencia fue significativa, y presentaron una carga bacilar mayor durante la fase avanzada de la enfermedad, respecto de las hembras. Estos datos hablan de una mayor susceptibilidad a la infección por *Mtb* en los machos.

El estradiol es la hormona sexual esteroidea prototipo del género femenino, posee una influencia significativa en la inflamación (Okada, M. y cols, 1997), ya que induce la expresión del mRNA de moléculas de adhesión (E-selectinas, ICAM-1 y VCAM-1), y de ese modo favorece la migración de células inflamatorias, lo cual está mediado por TNF $\alpha$  de células endoteliales. Esto concuerda con nuestros resultados del análisis morfométrico, donde en ratones F se observó una formación más temprana de granulomas y mayor inflamación en todos los compartimentos pulmonares, en comparación con los ratones M.

Además, los ratones F, exhibieron inflamación alveolar (formación de neumonía), una semana antes que el grupo M, en coexistencia con una expresión más alta del mRNA para citocinas proinflamatorias y menor carga bacilar. En la enfermedad avanzada, al día 60 post-infección, el grupo F presentó menor carga bacilar que el grupo M, pero similar consolidación pulmonar, implicando que el grupo F también puede sufrir un mayor daño pulmonar debido a la inflamación excesiva.

Un estudio realizado en ratones DBA/2 ovariectomizados, infectados por vía intratraqueal con *M. avium*, mostró una carga bacilar significativamente mayor que los ratones F sin dicha intervención (Tsuyuguchi, K. y cols, 2001). A diferencia de este trabajo, en el nuestro no encontramos diferencias en términos de mortalidad y carga bacilar entre ratones tuberculosos F y CF. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden ser explicados por la influencia de diversos factores, como la diferencias en la línea de ratones, agente infeccioso con otro nivel de virulencia (la virulencia de *M. avium* es menor que la de *Mtb*) y constitución antigénica. Aún más, la calidad y cantidad de estímulo antigénico puede modificar el nivel de los receptores de hormonas sexuales expresados por macrófagos y modular así su respuesta (Asai, K. y cols, 2001). La participación de otras hormonas sexuales, como GnRH, que se encuentra elevada en animales gonadectomizados, puede además participar en la protección de los ratones CF, dado que esta hormona promueve la expansión celular T y su supervivencia (Buklei, A. R., 2001). Es importante, además, considerar el basamento genético del hospedero. Estudios previos demostraron que las cepas de ratón C57BL o DBA/2 presentaron mayor resistencia a infección por micobacterias atípicas que los ratones de la cepa BALB/c (Yamamoto, Y. y cols, 1991).

Llamativamente, los ratones CM mostraron una tasa de supervivencia mayor, y menor carga bacilar que los ratones M. Así pareciera que la resistencia disminuida a la TB que presentan los ratones M es en parte mediada por la testosterona. La castración de los machos luego de la pubertad derivó en un incremento en el tamaño del timo y del hígado, con un número más alto de LT CD4+ periféricos y células TCD8+ (Roden, A. y cols, 2004). Roden *et al* demostraron que estas células presentaron una proliferación más vigorosa luego de la estimulación con el antígeno y exhibieron (transitoriamente), una respuesta exagerada a la co-estimulación (Roden, A. y cols, 2004). Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, donde los ratones CM tuberculosos, muestran mayor inflamación pulmonar con más alta expresión de citocinas y granulomas más grandes que los ratones M. Los ratones CM desarrollaron granulomas una semana antes,



con un recuento de bacterias significativamente más bajo que los ratones M. Además, el área de pulmón afectado por neumonía en la fase avanzada de la enfermedad fue similar en los ratones CM que en los M, sugiriendo que, del mismo modo que en el grupo F, la castración puede favorecer una inflamación excesiva y daño tisular. En este sentido, el hecho que los varones con enfermedad moderada a severa, posean niveles decrecientes de testosterona en el suero, con un modesto incremento en las concentraciones de estradiol, podría ser visto como un intento fallido de aumentar los mecanismos de la inmunidad celular protectora (Del Rey, A. y cols, 2007). En contraste con estos resultados en el hombre, en el presente estudio los ratones BALB/c M tuberculosos aumentaban sus niveles de testosterona en el suero, en coincidencia con la inflamación progresiva, desde el día 14, en que se forman los granulomas, hasta el día 60 donde un área substancial del pulmón se encuentra afectada por neumonía. Estos hallazgos sugieren que la testosterona debe ser considerada en parte durante la modulación de la inflamación, disminuyendo el daño tisular ocasionado por la inflamación excesiva. Sin embargo, esta modulación de la inflamación puede disminuir la producción de citocinas proinflamatorias protectoras, favoreciendo así el crecimiento bacilar y la progresión de la enfermedad. Este concepto está consolidado por nuestros resultados con el experimento de ratones machos que fueron castrados en la fase avanzada de la enfermedad (día 60 post infección), los cuales mostraron carga bacilar más baja y mayor expresión del mRNA para TNF $\alpha$ , IL-12 e IFN $\gamma$  que los ratones no castrados.

En conclusión, los ratones M son más susceptibles a la TB que los ratones F. Esta mayor susceptibilidad fue sorteada por la castración previa a la infección o durante la fase avanzada de la enfermedad, sugiriendo que la testosterona es un factor potencial de mayor susceptibilidad. Estos estudios experimentales muestran que el sistema endócrino, en este caso las hormonas sexuales, modifican substancialmente la actividad del sistema inmune y la respuesta inflamatoria, influenciando el curso de la TB pulmonar experimental.

### **5-2 EN LA INFECCIÓN EN EL HOMBRE**

La TB es una enfermedad en la cual la patología tisular posee un componente inmunológico, donde la producción excesiva y prolongada de citocinas es capaz de afectar la comunicación inmunoendócrina. Asimismo, un número variado de factores exógenos al sistema inmune parece jugar un rol funcional en la regulación de la

inmunidad celular, a través de la modificación del microambiente en el cual las células inmunes residen y funcionan. En el contexto de esta comunicación bidireccional, los productos de la respuesta inmune pueden alterar la producción hormonal, lo que de algún modo llega a afectar procesos fisiológicos de diferente índole.

Un hallazgo interesante en el presente estudio fue la demostración que pacientes con TB activa poseen niveles decrecientes de testosterona en presencia de cantidades crecientes de LH. La producción de testosterona por las células de Leydig se encuentra bajo el control de LH, la cual es secretada por la pituitaria anterior y llega a testículos a través del torrente sanguíneo. A nivel de las gónadas, la LH se une a los receptores de superficie de las células de Leydig para estimular la producción de testosterona a través de la activación de un segundo mensajero intracelular (Hales, D. B., 2000). La presente disociación LH/testosterona implica algún grado de resistencia del testículo a la LH, y/o la supresión de esteroidogénesis. Entre los factores que han sido implicados a este respecto, se han reportado algunas citoquinas que interfieren con la esteroidogénesis a nivel de las células de Leydig y la producción de testosterona (Bornstein, S. R. y cols, 2004). Este fenómeno puede ser asociado a un estímulo por la infección, ya que se ha demostrado que la inflamación inducida por LPS, afecta la función testicular, incluyendo una disminución en la esteroidogénesis y alteración de la espermatogénesis (Reddy, M. M. y cols, 2006; O'Brian, M. K. y cols, 2000).

Por ello fue relevante analizar si existían alteraciones inmunológicas a nivel de las gónadas. Este estudio es el primero que documenta la presencia de citocinas proinflamatorias en testículos de pacientes con TB. La asociación íntima entre las células de Leydig y células vecinas expresando tales mediadores, sugieren que debe existir una asociación funcional.

Nuestros hallazgos concuerdan con estudios experimentales en testículos que revelan la presencia de citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  e IL-6 de M $\emptyset$  intersticiales (Stephan, J. y cols, 1997; Kerns, S. y cols, 1995), células de Leydig (Bookfor, F. R. y cols, 1994), células de Sertoli (Cudicini, C. y cols, 1997), como así también TNF $\alpha$  en M $\emptyset$  y espermatocitos (Bryniarski, K. y cols, 2005; De, S. K. y cols, 1993). Es importante destacar que todos estos mediadores han demostrado inhibir la producción de testosterona por las células de Leydig (Guazzone, V. A. y cols, 2009). En el mismo sentido, los estudios en voluntarios humanos sanos que recibieron inyecciones subcutáneas de IL-6, hasta niveles elevados como los que se registran en las

inflamaciones severas, demostraron niveles decrecientes de testosterona sin cambios aparentes en los niveles de gonadotrofinas (Tsigos, C. y cols, 1999).

Vale la pena comentar que las citocinas pro-inflamatorias (empleadas en los estudios comentados) se encontraron aumentadas en esta serie de pacientes con tuberculosis, así como en estudios previos en pacientes con esta enfermedad (del Rey, A. y cols, 2007; Santucci, N. y cols, 2011, Bongiovanni, B. y cols, 2012).

Dado que los testículos de los pacientes con TB contienen niveles incrementados de citocinas proinflamatorias, llevamos adelante un experimento para reproducir la influencia de esta situación en la producción de testosterona. Confirmando lo observado por otros laboratorios, las citocinas proinflamatorias inhibieron significativamente la producción de testosterona por las células de Leydig (Bornstein, S. R. y cols, 2004; Guazzone, V. A. y cols, 2009).

Analizando el efecto de las citocinas, quisimos estudiar además el efecto de TGF- $\beta$ , dado que éste mediador también se encontró elevado en los pacientes (Dlugovitzky, D. y cols, 1999), y es bastante relevante en numerosos aspectos inmunopatogénicos de la TB (Toossi, Z. & Ellner, J. J., 1998). Nuestros hallazgos revelaron que las células de Leydig expuestas a TGF- $\beta$ , produjeron cantidades menores de testosterona. En el testículo, el TGF- $\beta$  regula la función secretora de las células de Leydig y de Sertoli, así como el desarrollo de la gónada y la espermatogénesis (Itman, C. y cols, 2006; Gnessi, I. y cols, 1997).

TGF- $\beta$ 1 inhibe la producción de testosterona por las células de Leydig a través de la inhibición de la expresión del receptor LH/hCG y de la expresión de genes esteroideogénicos, como StAR and P450c17 (Le Roy, C. y cols, 1999). Así como reduce la producción de testosterona, estudios previos han demostrado que el TGF- $\beta$  es capaz de inhibir la producción de DHEA por las células adrenales (D' Attilio, L. y cols, 2012), lo que es reforzado en el presente estudio, debido a la asociación inversa entre TGF- $\beta$  y DHEA. Tomados en su conjunto, esto implica un rango más amplio de la inhibición de la producción de andrógenos por esta citocina y las consecuencias adversas que esto conlleva, debido a los efectos anabólicos y antiinflamatorios de la testosterona (Malkin, C.J. y cols, 2004). En este contexto, los valores reducidos de testosterona no serían suficientes para contrarrestar la síntesis de los mediadores que acompañan las reacciones inflamatorias. Debido a los efectos antiinflamatorios de la testosterona y el cortisol, la correlación negativa entre ambos esteroides podría reflejar una interacción entre el eje HPG y HPA, para asegurar alguna forma de balancear los efectos de anti-

inflamatorios. Además, la correlación inversa entre los niveles de testosterona y de IFN $\gamma$  puede ser explicada a la luz de los efectos inhibitorios del esteroide gonadal en la diferenciación celular Th1 (Kissicka, H.T. y cols, 2014).

Posicionados desde una visión más especulativa y teleológica si se quiere, las razones para la inhibición de la producción de testosterona podrían estar relacionadas con la necesidad de conservar energía para el mantenimiento de la respuesta inmune. O tal vez, es un mecanismo adaptativo para evitar la reproducción de personas susceptibles a esta enfermedad y prevenir así la propagación de este defecto.

Sea cual sea el caso, es claro que cuando el patógeno no puede ser contenido por mecanismos defensivos, como ocurre en TB, se desarrolla una respuesta sistémica, caracterizada por múltiples cambios, metabólicos y neuroendócrinos. Esto puede afectar funciones biológicas esenciales, como el desarrollo de una respuesta protectora, control del daño tisular y funciones fisiológicas, las cuales en esencia están implicadas en un curso más mórbido de la enfermedad.

# CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

Posicionados desde la comunicación bidireccional entre esteroides sexuales y respuesta inmune, el presente trabajo de tesis estuvo orientado a explorar rasgos sustantivos de esta interacción en el escenario de la enfermedad tuberculosa. Por un lado se analizó la influencia del sexo en cuanto a las características de la infección experimental en ratones, un abordaje que obviamente permite una mejor aproximación a la relación entre el predictor y fenómeno de interés, respectivamente. Desde el ángulo clínico y no obstante las limitaciones que impone la investigación en seres humanos, el estudio también estuvo dirigido a analizar el correlato fisiopatológico que podía darse en los pacientes tuberculosos en términos del diálogo cruzado entre componentes del eje HPG y productos de la respuesta inmune, esencialmente citocinas.

Para el análisis en cuanto a la evolución de la TB en ratones machos y hembras se utilizó un modelo muy bien validado en ratones BALB/c, los cuales desarrollan una enfermedad progresiva. En función de la propuesta se tomaron dos grupos iniciales de ratones (machos y hembras) los cuales fueron aleatorizados para someterse a castración u operación simulada. Tras ello fueron infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de *Mtb* cepa H37Rv y posteriormente sacrificados a diferentes tiempos de infección a fin de analizar la carga bacilar, la reacción inflamatoria, la expresión de citocinas, supervivencia como puntos finales esenciales. Los machos sin castrar presentaron una mayor mortalidad y número de micobacterias durante la fase tardía de la enfermedad en relación a lo observado con la contraparte castrada y las hembras. Estos dos últimos grupos también exhibieron una mayor reacción inflamatoria en todos los compartimentos pulmonares, como así también un desarrollo más temprano de granulomas y neumonía, sin que se observaran diferencias de este tipo entre las hembras gonadectomizadas o no. La expresión de ARN mensajeros para TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12, iNOS e IL-17 fue superior en las hembras y machos castrados durante el primer mes de infección. La orquitectomía en la fase tardía de la enfermedad (día 60 post-infección) dio lugar a un descenso sustancial de la carga bacilar coexistentemente con una expresión aumentada de TNF $\alpha$ , IL-12 e IFN $\gamma$ . Hallazgos que en su conjunto hablan a las claras de la mayor susceptibilidad de los machos a la enfermedad y el rol de los andrógenos en esta respuesta deficitaria ante la infección experimental.

## CONCLUSIONES

La cronicidad de la TB y la respuesta inflamatoria prolongada que ello implica está involucrada en una serie de cambios metabólicos e inmuno-endócrinos que acompañan a la enfermedad. Dentro de este contexto exploramos componentes del eje HPG y su relación con citocinas de relevancia en la inmunopatología de la enfermedad. Se estudiaron 36 pacientes varones con enfermedad activa sin tratamiento en quienes se evaluaron los niveles de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TGF-}\beta$ , IL-6, cortisol, dehidroepiandrosterona, testosterona, progesterona, estradiol, LH y FSH, como así también 21 voluntarios sanos similares en sexo y edad. Los pacientes mostraron niveles aumentados de  $\text{IFN}\gamma$ , IL-6 e  $\text{TGF-}\beta$ . Llamativamente los enfermos presentaron valores descendidos de testosterona en presencia de concentraciones aumentadas de LH, lo cual daba pie para pensar que la secreción de testosterona podía estar modulada *in situ* por influencias surgidas a raíz del proceso infeccioso (por ejemplo las citocinas). Así las cosas se procesaron preparados histológicos de testículos tomados de necropsias de pacientes que habían fallecido de tuberculosis para ver si detectaban mediadores como IL-1 $\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 e  $\text{IFN}\gamma$  por inmunohistoquímica. Las marcaciones revelaron una presencia abundante de IL-1 $\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and  $\text{IFN}\gamma$  en M $\emptyset$  intersticiales, células de Sertoli y algunas espermatogonias. A partir de esta evidencia se decidió trabajar con células de Leydig murinas (línea celular TM3) la cual fue expuesta a diferentes concentraciones de citocinas de ratón relevantes en la inmunopatología de la TB como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$   $\text{TGF-}\beta$ . Los estudios *in vitro* pusieron de manifiesto que el tratamiento con cualquiera de las citocinas analizadas llevaba a un descenso en la producción de testosterona. Lo cual pone de relieve las implicancias de la respuesta inflamatoria sobre la síntesis de esteroides gonadales con todas las consecuencias que ello puede tener en términos de las funciones ejercidas por la testosterona como hormona anti-inflamatoria, inmunomoduladora, anabólica y obviamente de la reproducción.

Si bien las posibilidades actuales del abordaje científico no nos habilitan para treparnos a indagar sobre las grandes causas, el ejercicio especulativo sigue siendo válido puesto que de lo contrario caeríamos en la autocensura. Todo trabajo de tesis aporta datos que corren nuestra frontera de conocimiento en torno a la problemática esbozada, como los aquí provistos, y a la vez plantean nuevos interrogantes con distintos niveles de complejidad y posibilidades de resolución. Dentro de este contexto cabe preguntarse si la inhibición en la producción de testosterona no representa un intento de preservación energética para el mantenimiento de la respuesta inmune, o bien constituir un mecanismo adaptativo para evitar la reproducción de los más susceptibles a la

## **CONCLUSIONES**

enfermedad. En razón de los efectos deletéreos de los andrógenos sobre la enfermedad experimental, el hipoandrogenismo de los pacientes también podría estar reflejando un mecanismo contraregulatorio que de alguna manera apuntara a crear una situación menos adversa.



# REFERENCIAS

## 7. REFERENCIAS

-Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. (2010) Translational mini-review series on TH17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 159: 120-130.

-Ahmad S. (2011) Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical & developmental immunology*; 2011: 814943.

-Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. (1999) Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect*; 107: 681-686.

-Akner G, Wikström AC and Gustafsson JA. (1995) Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules. *J Steroid Biochem & Mol Biol*; 52:1.

-Ansar AS, Penhale WJ, Talal N. (1985) Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. *Mechanisms of sex hormones action. Am J Pathol*; 121: 531-551.

-Araneo BA, Dowel T, Diegel M, Daynes RA. (1991) Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of Interleukine-4 (IL-4), IL-5, and gamma interferon, but not IL-2 by activated T lymphocytes. *Blood*; 78: 688-689.

-Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. (2001) Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: Role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock*; 16: 340-343.

-Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A. (2008) Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol*; 28: 232-236.

-Azad N, La Paglia N, Jurgens KA, Kirsteins L, Emanuele NV, Kelley MR, Lawrence AM, Mohaghehpour N. (1993) Immunoactivation enhance the concentration of luteinizing hormone-releasing hormone peptide and its gene expression in human peripheral T-lymphocytes. *Endocrinology*; 133: 215-223.

-Azad N, LaPaglia N, Kirsteins L, Udin S, Steiner J, Williams DW, Lawrence AM, Emanuele NV. (1997) Jurkat cell proliferative activity is increased by luteinizing hormone-releasing hormone. *J Endocrinol*; 153: 241-249.

- Bagchi MK, Tsai SY, Weigel NL, Tsai MJ, O'Malley BW. (1990) Regulation of in vitro transcription by progesterone receptor. Characterization and kinetic studies. *J Biol Chem*; 265: 5129-5134.
- Balasubramanian R, Carg R, Santha T, Gopi PG, Subramani R, Chandrasekaran V, Thomas A, Rajeswari R, Anandkrishnan S, Perumal M, Niruparami C, Sdha G, Jaqqarajamma K, Frieden TR, Narayanan PR. (2004) Gender disparities in tuberculosis: report from a rural DOTS programme in south india. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8(3):3232-332.
- Barrios-Payán J, Saqui-Salces M, Jeyanathan M, Alcántara-Vazquez A, Castañon-Arreola M, Rook G, Hernandez-Pando R. (2012) Extrapulmonary Locations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA during Latent Infection. *J Infect Dis*; 206: 1194-205.
- Baumann H, Gauldie J. (1994) The acute phase response. *Immunol Today*; 15:74-80.
- Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton WJ. (1999) Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol*; 162: 3504-11.
- Bebo BF, Schuster JC, Vandenbark AA, Offner H. (1999) Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *J Immunol*; 162: 35-40.
- Bekker LG, Maartens G, Steyn L, Kaplan G. (1998) Selective increase in plasma tumor necrosis factor alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis* 178: 580-4.
- Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC. (1995) Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest*; 95: 2886-2895.
- Ben-Hur T. (2007) Immunomodulation by neural stem cells. *J Neurol Sci*; 265: 102-104.
- Benten WP, Stephan C, Wunderlich F. (2002) B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids*; 67: 647-654.
- Besedovsky H, del Rey A. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypothesis. *Endocr Rev*; 17: 64-102.
- Bini EI, Bottasso O, Hernández-Pando R. (2011) Immunity, Sex hormones and Infection. *Advances in Neuroimmune Biology* 1: 163-177. DOI 10.3233/NIB-2011-010
- Bini EI, Hernández-Pando R, Cap 20, libro "Neuroinmunología", en prensa

## REFERENCIAS

- Bini EI, Hernández-Pando R. (2014)<sup>a</sup> Pathogenesis and Immune Response in Tuberculous Meningitis. *Malays J Med Sci*; 21: 4-10.
- Bini EI, Hernández-Pando R. (2014)<sup>b</sup> New Chemotherapy and Immunotherapy for Tuberculosis. *Current Respiratory Medicine Reviews*; 10: 1-14.
- Bini EI, Hernández-Pando R. Cap 7 “Introducción y aspectos generales del sistema inmunológico normal” en libro “Patología General” eds: Pedro Valencia Mayoral y Jesús Ancer Rodríguez. Ed Mc Graw- Hill, 2014. ISBN 978-607-15-0937-6.
- Boeleart JR, Vandecasteele SJ, Appelberg R, Gordeuk VR. (2007) The effect of the host's iron status on tuberculosis. *J Infect Dis*; 195: 1745–1753.
- Bonecini-Almeida MG, Ho J, Boechat N, Huard R, Chitale S, Jiayuan G, Rego L, Oliveira Lazarini LC, Kritski A, Johnson WJ, McCafferey T, Lapa, Silva J. (2004) Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) and analysis of TGF- $\beta$  receptors I y II in active tuberculosis. *Infection and Immunity*; 72: 2628-2634.
- Bongiovanni B, Díaz A, D'Attilio L, Santucci N, Dídoli G, et al. (2012) Changes in the immune and endocrine responses of patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. *Ann NY Acad Sci*; 1262:10-15.
- Borgdorff MW, Nagaldkerke NJ, Dye C, Nunn P. (2000) Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore gender differences in case detection. *Int J Tuberc Lung Dis*; 4: 123-132.
- Boockfor FR, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. (1994) Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology*; 134:2150-2155.
- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinology*; 215:135-141
- Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Faas MM. (2001) The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertil Steril*; 76: 555-559.
- Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas MM. (2004) Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. *Am J Reprod Immunol*; 52: 19-26.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas M. (2005) Sex hormones and immune response. *Hum Reprod Update*; 11: 411-423.
- Brown IN, Glynn AA (1987) The *Ity/Lsh/Bcg* gene significantly affects mouse resistance to *Mycobacterium lepraemurium*. *Immunology* 62: 587–591.

- Brown MA. (2008) IL-4 Production by T Cells: You Need a Little to Get a Lot. *The journal of immunology*; 181: 2941-2942.
- Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. (2005) The influence of collagenase treatment on the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. *J Immunol Methods*; 301:186-189.
- Buckley AR. (2001) Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus*; 10: 684-690.
- Bustamante J, Picard C, Fieschi C, Felipe Santos O, Feinberg J, et al. (2007) A novel X-linked recessive form of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *J Med Genet*; 44:e65
- Butts C, Shukair S, Duncan K, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg E. (2007) Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol*; 19: 287-296.
- Butts CL, Bowers E, Horn JC, Shukair SA, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg EM. (2008) Inhibitory effects of progesterone differ in dendritic cells from female and male rodents. *Gender medicine*; 5: 434-47.
- Butterworth M, McClellan B, Allansmith M. (1967) Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature*; 214: 1224-1225.
- Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. (2009) Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. *Am J Respir Crit Care Med*; 180: 521-532.
- Caminero JA. (2003) A tuberculosis guide for specialist physicians. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Paris.
- Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiol*; 148: 2967-2973.
- Casanova JL, Abel L. (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*; 20: 581-620.
- Castro JE. (1974) Orchidectomy and the immune response: Effect of orchidectomy on lymphoid tissues of mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 185: 425-436.
- Chao TC, Vanalten PJ, Walter RJ. (1994) Steroid sex-hormones and macrophage function - modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. *Am J Reprod Immunol*; 32:43-52.

## REFERENCIAS

- Cioffi M, Esposito K, Vietri MT, Gaggero P, D'Auria A, Ardivino I, Puca GA, Molinari AM. (2002) Cytokine pattern in postmenopause. *Maturitas*; 41: 187-192.
- Crome SQ, Wang AY, Levings MK. (2010) Translational mini-review series on TH17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*; 159: 109-119.
- Cua DJ, Hinton DR, Stohlman SA. (1995) Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice: Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol*; 155: 4052-4059.
- Cua DJ, Kastelein RA. (2006) TGF- $\beta$ , a "double agent" in the immune pathology war. *Nat Immunol*; 7: 557-559.
- Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jegou B. (1997) Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat Sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. *Endocrinology*; 138:2863-2870.
- Curtis AB, Ridzon R, Novick LF, Dirscoll J, Blair D, et al. (2004) Analysis of Mycobacterium tuberculosis transmission patterns in homeless shelter outbreak. *Int J Tuberc Lung Dis*; 4:308-313.
- Cutolo M, Serio B, Villaggio B, Pizzorni C, Cravotto C, Sulli A. (2002) Androgens and Estrogens modulate the Immune and Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Ann NY Acad Sci*; 966: 131-142.
- D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Farruggio R, Miceli DM, Miele M, Castagnetta L, Cillari E. (1999) Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann NY Acad Sci*; 876: 426-429.
- D'Attilio L, Bozza VV, Santucci N, Bongiovanni B, Didoli G, Radcliffe S, Besedovsky H, Del Rey A, Bottasso O, Bay ML. (2012) TGF- $\beta$  neutralization abrogates the inhibited DHEA production mediated by factors released from M. tuberculosis-stimulated PBMC. *Ann N Y Acad Sci*; 1262: 1-9.
- Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z. (1996) Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by liparabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*; 64: 399-405.
- Dalal M, Kim S, Voskuhl RR. (1997) Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol*; 159: 3-6.
- De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, et al. (1993) Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology*; 133:389-396.

- Del Rey AD, Mahuad CV, Bozza VV, Bogue C, Farroni MA, Bay ML, Bottasso OA, Besedovsky HO. (2007) Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun*; 21: 171-179.
- Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MDY. (1997) Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol*; 38: 46-54.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real- time PCR. *BioTechniques* 37: 112-119.
- Díaz- Chico BN, Ogasawara Y, Chamness GC, Salman M, Mc Guire WL. (1988) A 46 kDa antigen associated with estrogen receptor in human breast cancer. *J Steroid Biochem*; 30: 315.
- Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, Urizar L, Rondelli CF, et al. (1999) *In vitro* synthesis of interferon- $\gamma$ , interleukin-4, transforming growth factor- $\beta$ , and interleukin 1- $\beta$  by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement. *Scand J Immunol*; 49:210-217.
- Dudley DJ, Chen CL, Mitchell MD, Daynes RA, Araneo BA. (1993) Adaptative immune responses during murine pregnancy: Pregnancy/induced regulation of limphokine production by active T lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol*; 168: 1155-1163.
- Eidinger D, Garrett TJ. (1972) Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J Exp Med*; 136: 1098-1116.
- Ellis TM, Moser MT, Le PT, Flanigan RC, Kwon ED. (2001) Alterations in peripheral B cells and B cell progenitors following androgen ablation in mice. *Int Immunol*; 13: 553-558.
- Ernst JD. (2012) The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*; 12: 581- 91.
- Faas M, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij L and Schuiling G. (2000) The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil Steril*; 74: 1008-1013.
- Federman DD. (2006) The biology of human sex differences. *N Engl J Med*; 354: 1507-1514.

## REFERENCIAS

- Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. (1995) Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*; 2: 561-72.
- Flynn JL, Chan J. (2001) Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*; 19: 93-129.
- Flynn JL. (2006) Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect*; 8:1179-88.
- Fortunati N. (1999) Sex hormone-binding globulin: Not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest*; 22: 223-234.
- Fox HS, Bond BL, Parslow TG. (1991) Estrogen regulates the IFN gamma promoter. *J Immunol*; 146: 4362-4367.
- Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, Sieburth DS, Boom WH. (1996) Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. *Infect Immun*; 64: 2523-31.
- Gerloni M, Xiong S, Mukerjee S, Schoenberger SP, Croft M, Zanetti M. (2000) Functional cooperation between T helper cell determinants. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:13269-74.
- Giacomini E, Remoli ME, Scandurra M, Gafa V, Pardini M, Fattorini L, Coccia EM. (2011) Expression of proinflammatory and regulatory cytokines via NF- $\kappa$ B and MAPK- dependent and INF regulatory factor-3-independent mechanism in human primary monocytes infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*; 2011: 841346
- Giglio T, Imro MA, Filaci G, Scudeletti M, Puppo F, De Cecco L, Indiveri F, Costantini S. (1994) Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sci*; 54: 1305-1312.
- Giron-Gonzalez JA, Moral FJ, Elvira J, García-Gil D, Guerrero F, Gavilan I, Escobar L. (2000) Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur J Endocrinol*; 143: 31-36.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G. (1997) Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev*; 18:541-609.
- Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, Bozon MV, Ugliarolo AM, Turbay D, Cohen C, Yunis EJ. (1998) Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA*; 279: 226-8.



## REFERENCIAS

- Gonzalez-Juarrero M, Orme IM. (2001) Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*; 69: 1127-1133.
- Gorocica P, Jimenez-Martinez M, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. (2005) Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*; 18: 142-153.
- Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. (2009) Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech*; 72:620-628.
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. (2005) Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS Pathog*; 1: e5.
- Hales, D.B. (2000) Cytokines and Testicular Function in Cytokines and Reproduction (Hill, J.A. ed.) John Wiley & Sons, NY, 17-42.
- Hamid Salim MA, Declercq E, Van Deun A, Saki KA. (2004) Gender differences in tuberculosis: a prevalence survey done in Bangladesh. *Int J tuberc Lung Dis*; 8:952-957.
- Hart BL. (1990) Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neurosci Biobehav Rev*; 14: 273-94.
- Heinlein CA, Chang C. (2002) The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Non genomic Androgen Actions. *Molecular Endocrinology*; 16: 2181-2187.
- Hernández Pando R, Orozco EH, Arriaga K, Sampieri A, Larriva SJ, Madrid MV. (1997) Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*; 90: 507-516.
- Hernández Pando R, Streber Ma de la Luz, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Al-Nakhli SA, Rook GA. (1998) The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology*; 5: 234-241.
- Hernández-Pando R, Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, Estrada I. *Immunology, Pathogenesis, Virulence*. Cap 5, en libro "Tuberculosis 2007". From basic science to patient care. 1st edition. Bourcillier Kamps. pp157- 206. [www.Tuberculosis Textbook.com](http://www.Tuberculosis Textbook.com).
- Hernández-Pando R, Smith I, Manganeli R. (2010) Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*; 78: 3168-76.
- Hernández-Pando R, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Hernández-Ramírez D, Botasso OA, Bini EI. (en Prensa) The role of High Mobility Group

Box 1 protein (HMGB1) in the immunopathology of experimental pulmonary Tuberculosis. PLoS One.

-Hickman SP, Chan J, Salgame P. (2002) Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol*; 1; 168: 4636-42.

-Hu SK, Mitcho YL, Rath NC. (1988) Effects of Estradiol on Interleukin-1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol*; 10: 247-252.

-Ida A, Tsuji Y, Muranaka J, Kanazawa R, Nakata Y, Adachi S, Okamura H, Koyama K. (2000) IL-18 in pregnancy: The elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *J Reprod Immunol*; 47: 65-74.

-Igarashi H, Kouro T, Yokota T, Comp PC, Kincade PW. (2001) Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 15131-15136.

-Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. (2006) All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction*; 132:233-246.

-Iwakura Y, Ishigame H. (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Inv*; 116: 1218-1222.

-Jacobson J, Ansari M. (2004) Immunomodulatory actions of gonadal steroids may be mediated by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*; 145: 330-336.

-Jameson SC. (2002) Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*; 2: 547-556.

-Jensen EV, Sujuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 59: 632.

-Jensen EV (1991) Overview of the nuclear receptor family. In *Nuclear hormone Receptor*, M Parker Ed. Academic Press.

-Jiménez –Corona ME, García-García L, DeReierner K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osaornio J, Ponce de León A. (2006) Gender differential s of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemis area. *Thorax*;61(4):348-353

-Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, van Deventer SJ, van Der Poll T. (2000) Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*; 182: 902-908.

## REFERENCIAS

- Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. (1997) Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; 40: 1703-1711.
- Kaufmann S, Mc Michael A. (1995) Annuling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and Tuberculosis. *Nature Medicine Supplement*; 11: 533-544.
- Kaufmann SH. (2002) Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis*; 61; Suppl 2: ii54-ii58.
- Kaur D, Guerin ME, Skovierová H, Brennan PJ, Jackson M. (2009) Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol*; 69: 23-78.
- Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S. (1995) Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod*; 53:1407-1416.
- Kissicka HT, Sandab MG, Dunna LK, Pellegrinic KL, Ona ST, et al. (2004) Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *PNAS*; 111:9887-9892.
- Klein SL. (2000) The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioural Rev*; 24: 627-638.
- Kolappan C, Gopi PG. (2002) Tobacco smoking and pulmonary tuberculosis. *Thorax*; 57:964-966.
- Kovats S, Carreras E. (2008) Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands. *Cell Immunol*; 252: 81-90.
- Kuiper GG, Emmark E, Peltó-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 5925-5930.
- Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. (2010) Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 10; 403-414.
- Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. (1997) Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun*; 65: 4843-4849.
- Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Lubahn DB, Estes DM. (2004) Estrogen receptor-alpha deficiency promotes increased TNF-alpha secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J Leukoc Biol*; 75:1166-1172.
- Law K, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K, Chi C, Rom WN. (1996) Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by

bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 153: 799-804.

-Lebel-Binay S, Berger A, Zinzindohoué F, Cugnenc P, Thiounn N, Fridman WH, Pagès F. (2000) Interleukin-18: biological properties and clinical implications. *Eur Cytokine Netw*; 11: 15-26.

- Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. (1999) Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 69:379-384.

-Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei F, Wong W, Kamen R, Seshadri T. (1995) Mice deficient in IL-1 $\beta$  converting enzyme are defective in production of mature IL-1 $\beta$  and resistant to endotoxic shock. *Cell*; 80: 401-411.

-Li X, McKinstry KK, Swain SL, Dalton DK. (2007) IFN-gamma acts directly on activated CD4+ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals. *J Immunol*; 179: 939-949.

-Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, Bah B, Benagiano M, Diallo A, Manetti R, Manneh K, Gustafson P, Bennett S, D'Elis MM, McAdam K, Del Prete G. (2002) Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol*; 32:1605-13.

-Lienhardt C, Fielding K, Sillah JS, Bah B, Gustofson P, et al. (2005) Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. *Int J Epidemiol*; 34:914-923.

-Lin CM, Davidson TM, Ancoli-Israel S. (2008) Gender differences in obstructive sleep apnea and treatment implications. *Sleep Med Rev*; 12: 481–496

-Lin PL, Flynn JL. (2010) Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *The journal of immunology*; 185: 15-22.

- Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, et al. (2004) The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*; 89:3313-3318.

-Mann DR, Howie S, Paulsen DF, Akinbami MA, Lunn SF, Fraser HM. (1998) Changes in lymphoid tissue after treatment with a gonadotropin releasing hormone antagonist in the neonatal marmoset (*Callithrix jacchus*). *Am J Reprod Immunol*; 39: 256-265.

## REFERENCIAS

- Marques-Deak A, Cizza G, Sternberg E. (2005) Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry*; 10: 239-250.
- Martínez AN, Rhee JT, Small PM, Behr MA. (2000) Sex differences in the epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *Int J Tuberc Lung Dis*; 4: 26-31.
- Mathur S, Mathur RS, Goust JM, Williamson HO, Fudenberg HH. (1979) Cyclic variations in white cell subpopulations in the human menstrual cycle: correlations with progesterone and estradiol. *Clin Immunol Immunopathol*; 13: 246-253.
- McCracken SA, Drury CL, Lee HS, Morris JM. (2003) Pregnancy is associated with suppression of the nuclear factor  $\kappa$ B/I $\kappa$ B activation pathway in peripheral blood mononuclear cells. *J Reprod Immunol*; 58: 27-47.
- Millington KA, Gooding S, Hinks TS, Reynolds DJ, Lalvani A. (2010) Mycobacterium tuberculosis specific cellular immune profiles suggest bacillary persistence decades after spontaneous cure in untreated tuberculosis. *J Infect Dis*; 202: 1685-1689.
- Möller M, Flachsbarf F, Till A, Thye T, Horstmann RD, Meyer CG, Osei I, van Helden PD, Hoal EG, Schreiber S, Nebel A, Franke A. (2010) A functional haplotype in the 3' untranslated region of TNFRSF1B is associated with tuberculosis in two African populations. *Am J Respir Crit Care Med*; 181: 388-393.
- Morale MC, Batticane N, Bartoloni G, Guarcello V, Farinella Z, Galasso MG, Marchetti B. (1991) Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor in neonatal rats with a potent LHRH antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune response. *Endocrinology*; 128: 1073-1085.
- Mosmann TR, Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*; 17: 138-46.
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. (2001) Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*; 19: 423-474.
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. (1999) The IL-4 receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology*; 17: 701-738.
- Neyrolles O, Quintana Murci L. (2009) Sexual inequality in tuberculosis. *PLoS Med* 6: e1000199.
- O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. (2000) Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*; 141:238-246

- O’Gorman MR, Donnenberg AD. (2008) Handbook of human immunology. 2nd ed; CRC press.
- Okada M, Suzuki A, Mizuno. (1997) Effects of 17 $\alpha$ -estradiol and progesterone on migration of human monocytic THP-1 cells stimulated by minimally oxidized low-density lipoprotein in vitro. *Cardiovasc Res*; 34: 529–535.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. (1996) Gonadal steroids and Immunity. *Endocrine Rev*; 17: 369-384.
- Olsen NJ, Gu X, Kovacs WJ. (2001)<sup>a</sup> Bone marrow stromal cells mediate androgenic suppression of B lymphocyte development. *J Clin Invest*; 108: 1697-1704.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. (2001)<sup>b</sup> Effects of androgens on T and B lymphocyte development. *Immunol Res*; 23: 281-288.
- Palomino, Leão, Ritacco. Cap 1, en libro “Tuberculosis 2007”. From basic science to patient care. 1st edition. Bourcillier Kamps. [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com).
- Papadopoulos AD, Wardlaw SL. (2000) Testosterone suppresses the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-6. *Neuroimmunomodulation*; 8: 39-44.
- Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. (2005) Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 97: 107-113.
- Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. (1995) Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*; 155: 128-133.
- Rajashree P, Krishnan G, Das SD. (2009) Impaired phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*; 89: 77-83.
- Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, Reddy MC, Roy KR, et al. (2006) Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol*; 22:493-500.
- Reljic R. (2007) IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. *J Interferon Cytokine Res*; 27: 353-364.
- Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. (2008) Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod*; 78: 432-437.

- Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. (2009) Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology*; 150: 3877-3884.
- Rhodes K, Scott A, Markham RL, Monk Jones ME. (1969) Immunological sex differences: a study of patients with rheumatoid arthritis, their relatives, and controls. *Ann Rheum Dis*; 28: 104-120.
- Rivas-Santiago B, Contreras JC, Sada E, Hernández-Pando R. (2008) The Potential Role of Lung Epithelial Cells and  $\beta$ -defensins in Experimental Latent Tuberculosis. *Scand J Immunol*; 67: 448-452.
- Roberts M, Buchanan K, Evans M, Marin RH, Satterlee DG. (2009) The effect of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *J Exp Biol*; 212: 3125–3131.
- Roden AC, Moser MT, Tri SD, Mercader M, Kuntz S, Dong H, Hurwitz AA, McKean DJ, Celis E, Leibovich BC, Allison JP, Kwon ED. (2004) Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J Immunol*; 173: 6098-6108.
- Rook GA, Hernández Pando R, Dheda K, Teng Seah G. (2004) IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunol*; 25: 483-488.
- Russell DG. (2007) Who put the tubercle in tuberculosis?. *Nature Rev Microbiol*; 5: 39-47.
- Santucci N, D'Attilio L, Kovalevski L, Bozza V, Besedovsky H, et al. (2011) A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*; 6:e26363
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*; 75: 40-47.
- Schuurs AH, Verhuel HA. (1990) Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem*; 35: 157-172.
- Schwarz E, Schafer C, Bode JC, Bode C. (2000) Influence of the menstrual cycle on the LPS-induced cytokine response of monocytes. *Cytokine*; 12: 413-416.
- Senaldi G, Yin S, Shaklee CL, Piguet PF, Mak TW, Ulich TR. (1996) *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J Immunol*; 157: 5022-5026.

## REFERENCIAS

-Silva CL, Lowrie DB. (2000) Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*; 68: 3269-3274.

-Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ (1998) Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv within human Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ (1998) Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv within human monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative–positive, but not in purified protein derivative–negative subjects. *J Immunol* 160: 2408–2417.

-Silverthorn DU. (2014) Fisiología humana. 6° edición. Ed Panamericana.

-Sims JE, Smith DE. (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*; 10: 89-102.

-Smith KA. (1988) Interleukin-2: Inception, impact and implications. *Science*; 240: 1169-1176.

-Smith SM, Dockrell HM. (2000) Role of CD8 T cells in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol*; 78: 325-33.

-Smithson G, Couse JF, Lubahn DB, Korach KS, Kincade PW. (1998) The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis. *J Immunol*; 161: 27-34.

-Song CH, Lee JS, Kim HJ, Park TH, Jo EK. (2000) Interleukin-8 is differentially expressed by human-derived monocytic cell line U937 infected with Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Micobacterium marinum. *Infect Immun*; 17: 5480-5487.

-Steinman L. (2007) A brief story of Th17. The first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of Tcell-mediated tissue damage. *Nat Med*; 13: 139-145.

-Stephan JP, Syed V, Jegou B. (1997) Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol Cell Endocrinol*; 134:109-118.

-Tait S, Butts CL, Sternberg EM. (2008) The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory,autoimmune, and infectious disease. *Journal of Leukocyte Biology*; 84: 924-931.

-Tanriverdi F, Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. (2003) The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Immune function and autoimmunity. *J Endocrinol*; 176: 293-304.

Tekkel M, Rahu M, Loit HM, Baburin A. (2002) Risk factors for pulmonary tuberculosis in Estonia. *Int J Tuberc Lung Dis*; 6:887-894.



- Thongngarm T, Jenkins JK, Ndebele K and McMurray RW. (2003) Estrogen and progesterone modulate monocyte cell cycle progression and apoptosis. *Am J Reprod Immunol*; 49: 129-138.
- Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. (1999) Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunology*; 163: 3898-3906.
- Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. (2011) Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol*; 32: 66-72.
- Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. (1995) Enhanced production of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol*; 154: 456-473.
- Toossi Z, Ellner JJ. (1998) The role of TGF- $\beta$  in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol*; 87:107-114.
- Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Raptis SA, Chrousos GP. (1999) Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *J Interferon Cytokine Res*; 19:1271-1276.
- Tsuyuguchi K, Suzuki K, Matsumoto H, Tanaka E, Amitani R, et al. (2001) Effect of oestrogen on Mycobacterium avium complex pulmonary infection in mice. *Clin Exp Immunol* 123: 428–434.
- Uplekar M, Rangan S, Ogden J. (1999) Gender and tuberculosis control: towards a strategy for research and action, WHO/TB/2000.280. Geneva: World Health Organization.
- Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van der Meer JW. (2002) Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*; 15: 294-309.
- Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*; 366: 689-704.
- Villemagne B, Crauste C, Flipo M, Baulard AR, Déprez B, Willand N. (2012) Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance. *Eur J Med Chem*; 51: 1-16.
- Viselli SM, Stanziale S, Shults K, Kovacs WJ, Olsen NJ. (1995) Castration alters peripheral immune function in normal male mice. *Immunology*; 84: 337-342.
- Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. (1999) Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest*; 103: 1023-1029.
- Wehling M, Schultz A, Losel R. (2007) To be or not to be (a receptor). *Steroids*; **72**: 107-110.

## REFERENCIAS

- Weiss MG, Sommerfeld J, Uplekar MW. (2008) Social and cultural dimensions of gender and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*; 12:829-830.
- Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J. (1984) Nuclear localization of unoccupied estrogen receptor. *Nature*; 307: 747-749.
- Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. (1999) A gender gap in autoimmunity. *Science*; 283: 1277-1278.
- WHO (2009) Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO. Available: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/)
- WHO (2013). Global Tuberculosis report 2013. Pdf available at: [www.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656\\_eng.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf)
- WHO (2014) Global Tuberculosis report 2014. Available at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
- Wilcoxon SC, Kirkman E, Dowdell KC, Stohlman SA. (2000) Gender-Dependent IL-12 Secretion by APC Is Regulated by IL-10. *J Immunol*; 164: 6237-6243.
- Wilson CA, Mrose SA, Thomas DW. (1995) Enhanced production of B lymphocytes after castration. *Blood*; 85: 1535-1539.
- Xing Z, Wang J, Croitoru K, Wakeham J. (1998) Protection by CD4 or CD8 T cells against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection. *Infect Immun*; 66: 5537-5542.
- Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. (2000) Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest*; 80: 759-767.
- Yamamoto Y, Tomioka H, Sato K, Saito H, Yamada Y, Setogawa T. (1990) Sex differences in the susceptibility of mice to infection induced by *Mycobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis*; 142: 430-433.
- Yamamoto Y, Saito H, Setogawa T, Tomioka H. (1991) Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun*; 59: 4089-496.
- Yang CS, Yuk JM, Jo EK. (2009) The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Netw*; 9: 46-52.
- Yang H, Antoine D, Andersson U, Tracey K. (2013) The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leuk Biol*; 93: 865-873.
- Yang JH, Chen CD, Wu MY, Chao KH, Yang YS, Ho HN. (2000) Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not

reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. *Fertil Steril*; 74: 261-267.

-Zakharova LA, Malyukova IV, Admaskaya Ei, Kusnetsova TA, Shishkina IV. (2000) Luteinizing hormone-releasing hormone in thymus and hypothalamus of rat fetuses: Suppressing effect of antagonist and of antibodies on concanavalin A induced proliferation of thymocytes. *Biochemistry (Mosc)*; 65: 1135-1139.

-Zhang Y, Broser M, Rom WN. (1994) Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA*; 9: 2225-2229.

-Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. (1999). Expression of IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol*; 162: 2441-2447.

-Zuckerman SH, Bryan Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL. (1995) In vivo modulation of marine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology*; 86: 18-24.