



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Médicas

Instituto de Inmunología e

Institut für Normale und Pathologische Physiologie –

Immunphysiologie der Phillips Universität Marburg, Alemania.

Regulación Immunoneuroendócrina de la Respuesta Inmune.

Estudios en Pacientes Tuberculosos con distinto grado de

Afectación Pulmonar.

Autor: Carolina V. Mahuad

Director: Dr. Oscar A. Bottasso

Año 2005

ÍNDICE.

Página

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

RESÚMEN

1- INTRODUCCIÓN.

1.a- La Tuberculosis: Historia.	1
1.b- Epidemiología: Incidencia estimada, Prevalencia y Mortalidad por país.	3
1.c- Agente etiológico y Patogenia.	5
1.d- La Respuesta Inmune Frente al Bacilo Tuberculoso.	8
▪ <i>Interacción Inicial huésped - bacteria.</i>	9
▪ <i>Sobrevida de la micobacteria dentro del macrófago.</i>	10
▪ <i>Citocinas intervinientes. Su rol.</i>	12
▪ <i>Células T.</i>	14
○ <i>Células T CD4⁺</i>	15
○ <i>Células T CD8⁺</i>	16
○ <i>Células T $\gamma\delta$</i>	17
▪ <i>Evasión de la Respuesta Inmune del huésped.</i>	18
1.e- Eje Hipotálamo - Hipófisario - Suprarrenal.	18
▪ <i>Funciones de la neurohipófisis.</i>	19
▪ <i>Funciones de la adenohipófisis.</i>	20
▪ <i>Hormonas hipotalámicas hipofisotropas.</i>	20
▪ <i>Glándulas Suprarrenales.</i>	22
▪ <i>Interacciones inmunoendócrinas intraadrenales en la regulación de la esteroidogénesis adrenocortical.</i>	26
▪ <i>Efectos fisiológicos de los glucocorticoides.</i>	27
▪ <i>La dehidroepiandrosterona como antagonista de natural de glucocorticoides.</i>	28
▪ <i>Mecanismos básicos de la interacción de los esteroides corticales con las células blanco.</i>	28
1.f- Interacción Neuroinmunoendócrina.	30
▪ <i>Regulación Neuroendócrina de la función macrófágica.</i>	33
▪ <i>Efecto bidireccional del estrés y los glucocorticoides en las funciones inmunes.</i>	35
▪ <i>La activación del eje HPA conlleva a una inadecuada secreción de hormonas adrenales en enfermedades inflamatorias.</i>	38

- *Integración de las interacciones Inmunoneuroendócrinas en el contexto de la Tuberculosis pulmonar. Objetivos del estudio.* 41

2- MATERIALES Y MÉTODOS.

2.a- Grupos de estudio.	44
▪ <i>Pacientes.</i>	44
▪ <i>Controles.</i>	44
▪ <i>Criterios de Exclusión.</i>	44
▪ <i>Toma de Muestra.</i>	45
2.b- Estudios de linfoproliferación y efectos de GC y DHEA <i>in vitro</i>.	
Obtención de sobrenadantes para los estudios <i>in vitro</i> con la línea H295-R.	45
▪ <i>Separación de plasma y aislamiento de las células mononucleares (CPM).</i>	45
▪ <i>Estudios de linfoproliferación.</i>	46
▪ <i>Estudios de los efectos hormonales sobre la síntesis de citocinas <i>in vitro</i>.</i>	47
▪ <i>Cultivos celulares para la obtención de sobrenadantes para los estudios en la línea celular NCI- H295-R.</i>	47
▪ <i>Mediciones de citocinas.</i>	48
▪ <i>Medición de las hormonas plasmáticas.</i>	48
2.e- Estudios realizados en la línea celular adrenal NCI-H295-R.	48
▪ <i>Efecto de los sobrenadantes de cultivo de 36 hs y 4 días de CPM sobre la producción de cortisol y DHEA adrenales.</i>	48
2.h- Análisis Estadístico.	50

3- RESULTADOS.

3.a- Descripción poblacional.	51
3.b- Efectos de GC y DHEA sobre la linfoproliferación.	56
3.c- Efectos hormonales sobre la síntesis de citocinas <i>in vitro</i>.	64
3.d- Determinación de citocinas y hormonas circulantes.	77
3.e- Efecto de los sobrenadantes de cultivo sobre la secreción de esteroides.	92

4- DISCUSIÓN.

4.a- Efectos de GC y DHEA sobre la linfoproliferación y la producción de citocinas <i>in vitro</i>.	100
4.b- Citocinas y hormonas circulantes. Interacciones inmunoendócrinas.	103

4.c- Efecto de los sobrenadantes de Células Periféricas Mononucleares sobre la regulación de la esteroidogénesis intraadrenal.	107
5- <u>CONCLUSIONES GENERALES.</u>	110
6- <u>REFERENCIAS.</u>	111
7- <u>PRESENTACIÓN Y PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS REPORTADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS.</u>	129

AGRADECIMIENTOS.

El primer agradecimiento y con todo mi corazón se lo debo a mi Familia, a cada uno de sus miembros. Sin ustedes, quienes me acompañaron desde los primeros pasos, en quienes pude respaldarme, crecer y desarrollarme, no hubiera logrado muchas de las cosas que logré. Les doy gracias por el amor, la confianza que siempre supieron darme y el respaldo en cada decisión que tomé; así como también por establecer los límites que en su momento necesité.

A vos Mami, un agradecimiento especial. Porque no sólo me enseñaste a dar los primeros pasos en la vida, sino que me enseñaste los primeros pasos en este camino que estoy comenzando. Agradezco tu infinita generosidad, tu sencillez, tu humildad y sobre todo por enseñarme que las cosas para hacerlas, hay que hacerlas « bien », siempre dando todo de nosotros y con el corazón.

A vos Oscar, porque me das la oportunidad de aprender de tu experiencia y sobre todo, por el apoyo y la confianza que siempre me brindaste.

A Adriana y Hugo quiero agradecerles por varias cosas, igual de importantes: por darme un lugar y por hacerme sentir no sólo en el trabajo “como en casa” (a pesar de estar tan lejos de casa). Por la posibilidad de aprender con ustedes y de ustedes. Y además, por compartir conmigo una experiencia más que especial en mi vida.

Qué sería de esta tesis sin vos Vani !!! Sin dudas, no sería tan especial para mi. Agradezco el que hayamos trabajado juntas porque en vos encontré una persona y amiga excepcional, además de la mejor compañera en la mesada de flujo laminar.

A toda la gente del Servicio de Neumonología del Hospital Carrasco, porque a pesar de los problemas, siempre estuvieron dispuestos a colaborar.

A vos amor, porque quizás sin darte cuenta y aún sin proponértelo, con tu comprensión, tu contención y apoyo incondicional me ayudás en cada paso que doy, en cada cosa que hago...
Todo es mejor a tu lado.

A todos, muchas GRACIAS !!!

ABREVIATURAS.

Ac	Anticuerpos	IL-6	Interleucocina-6
ACTH	Adenocorticotrofina	IL-10	Interleucocina-10
ADH	Hormona Antidiurética	IL-12	Interleucocina-12
AR	Artritis Reumatoide	iNOS	Enzima óxido-nítrico sintetasa inducible
BAAR	Bacilo Ácido-Alcohol Resistente	ITso	Índice de Tso
BBB	Barrera hematoencefálica	KO	Ratones knockout
BMI	Índice de masa corporal	LB	Linfocitos B
CO ₂	Dióxido de carbono	LES	Lupus Eritematoso Sistémico
CR	Receptores para Complemento	LH	Hormona luteinizante
CRH	Hormona liberadora de Corticotrofina	LT	Linfocitos T
CPM	Células Periféricas Mononucleares	Mc	Mineralocorticoides
cpm	cuentas por minuto	MC	Medio de Cultivo
DHEA	Dehidroepiandrosterona	MCC	Medio de Cultivo Completo
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona sulfato	MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
DHT	Rta. de Hipersensibilidad Retardada	MSH	Hormona Melanocito estimulante
DOC	Desoxicorticosterona	MTB	<i>M. tuberculosis</i>
E ₂	Estradiol	NADPH	Nicotinamida Adenina dinucleótido
ELISA	Enzimoimmunoensayo	NO	Óxido Nítrico
EPOC	Enf. Pulmonar Obstruictiva Crónica	OL	Alcohol
FC	Frecuencia Cardíaca	PO ₂	Presión de oxígeno
FcR	Receptor para la porción Fc	POMC	Proopiomelanocortina
FR	Frecuencia Respiratoria	PRL	Prolactina
FSH	Hormona folículo estimulante	RI	Respuesta Inmune
GC	Glucocorticoides	SE/ES	Error estándar
GH	Somatotrofina u Hormona de Crecimiento	SD	Desvío estándar
GH-RH	Hormona liberadora de Somatotrofina	SI	Sistema Inmune
GR	Receptor de GC	SN(-In)	Sobrenadantes (-de la línea H295-R)
GRE	Elementos de Respuesta a GC	SNC	Sistema Nervioso Central
HCG	Gonadotrofina Coriónica Humana	SNS	Sistema Nervioso Simpático
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana	T3	Triiodotironina
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal	T4	Tiroxina
HSP	Proteínas de choque térmico	TB	Tuberculosis
IFN- γ	Interferón- γ	TCR	Receptor de células T
IGF-I	Factor de crecimiento insulino-símil -I	TGF- β	Factor de crecimiento Transformante- β
IgG	Inmunoglobulina G	Th1	T helper 1
IgM	Inmunoglobulina M	Th2	T helper 2
IL-1	Interleucocina-1	TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
IL-1R	Receptor de IL-1	TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
IL-2	Interleucocina-2	TRH	Hormona liberadora de Tirotrófina
IL-3	Interleucocina-3	TSH	Tirotrófina
IL-4	Interleucocina-4	Tso	Sonido total de MTB
IL-5	Interleucocina-5	VES	Velocidad de eritrosedimentación

RESUMEN.

La Tuberculosis representa la principal causa de muerte producida por un agente infeccioso, transformándose en uno de los principales problemas en salud pública. Existe evidencia que demuestra que el tipo de RI que el huésped desarrolla, condicionaría el estadio clínico y curso de la TB. Asimismo, se conoce que productos del SI son capaces de desencadenar respuestas neuroendócrinas, las cuales podrían modular la RI en curso.

Con el fin de explorar el rol de las interacciones entre ambos sistemas en el contexto de esta patología, en pacientes de diferente severidad se estudiaron: los efectos *in vitro* de cortisol y DHEA sobre la linfoproliferación y la producción de citoquinas; el perfil endócrino y de citoquinas plasmáticas y la capacidad de sobrenadantes de cultivos de células periféricas mononucleares basales y estimulados con Tso (sonicado de *M.tuberculosis*) para modificar la esteroidogénesis adrenal.

In vitro se observó un efecto dosis dependiente supresor de cortisol tanto sobre la blastogénesis como sobre la producción de la mayoría de las citoquinas determinadas; particularmente cuanto mayor fue la capacidad de respuesta al antígeno Tso. La DHEA mostró efectos inmunoestimulantes en forma aislada o cuando se la combinó con GC, pero fue incapaz de revertir totalmente la inhibición mediada por cortisol. Existieron diferencias entre pacientes y controles.

El perfil endócrino y de citoquinas arrojó diferencias significativas con los controles y así como entre subgrupos de severidad de la enfermedad. A medida que aumentaba la misma, el perfil hormonal tendió a favorecer respuestas humorales, ineficaces para enfrentar al MTB.

Pudo demostrarse asimismo, que productos de la RI específica frente a MTB son capaces de afectar directamente la esteroidogénesis adrenal, generando una disminución en la producción de DHEA proporcional a la severidad de la TB.

En base a lo observado puede concluirse que la interacción entre ambos sistemas influenciaría en buena medida el curso de la TB pulmonar en el huésped.

1- INTRODUCCIÓN.

Dentro de la complejidad de los Sistemas Biológicos es hoy reconocida la interacción entre los Sistemas Inmunitario y Neuroendócrino. Esta "comunicación bidireccional" comenzó a ser visualizada a partir de los años 70 con los trabajos pioneros de Besedovsky y colaboradores (1, 55). De este modo se llegó a conocer que sumado a la inicialmente identificada participación de la Interleucocina-1 (IL-1), otras citocinas también son capaces de influir sobre la actividad secretoria del Eje Hipotalámico - Hipofisario - Suprarrenal (HPA), sea por su ingreso a través de la circulación o por la síntesis dentro del mismo Sistema Nervioso Central o la Hipófisis, sitios donde se han identificado receptores específicos para estos mediadores. No obstante el importante cúmulo de conocimientos en torno a la red de interacciones neuroinmunoendócrinas, es de suponer que tales mecanismos no sólo tengan que ver con la regulación en sí de respuestas biológicas, sino que también puedan tener alguna relación con la generación de distintas entidades clínicas vinculadas al desarrollo de respuestas inmunes patológicas, tales como las infecciosas, autoinmunes y neoplásicas.

Dentro de las enfermedades infecciosas, la Tuberculosis (TB) continúa siendo a pesar del transcurso de los años y del desarrollo científico una enfermedad paradigmática digna de estudio.

1.a- La Tuberculosis: Historia.

Existe ya evidencia paleopatológica que indica la presencia de tuberculosis espinal en esqueletos de los períodos neolíticos y precolombinos, así como en restos Egipcios de los más antiguos. En la antigua Grecia, el término utilizado por los médicos para describirla fue *phthisis*; el cual intentaba describir el característico cuadro de pérdida progresiva de peso (pudiendo incluso culminar en caquexia), debilidad general, astenia e hiporexia, fiebre prolongada, tos y ocasionalmente hemóptisis.

Sin embargo, no fue hasta los comienzos de la urbanización generada en tiempos previos a la primera revolución industrial, donde se establecieron las condiciones óptimas para el contagio y expansión de la patología, que la TB se transformó en un verdadero problema de salud pública el cual se traslada hasta nuestros días.

En los siglos XVII y XVIII, la TB fue la responsable de un cuarto de las muertes de los adultos europeos. Las características clínicas antes mencionadas de la *phthisis*, eran fácilmente reconocibles pero no así su agente etiológico. Diferentes fueron entonces las explicaciones que se dieron a la ocurrencia de esta patología: en el sur de Europa se la consideraba contagiosa, mientras que en los países del norte, debido a su ocurrencia familiar, era atribuida a una predisposición constitucional. En otro extremo de esta variedad de posturas, Virchow postuló la teoría de neoplasma para tratar de explicar la etiología de esta enfermedad.

Los conceptos modernos de TB fueron desarrollados recién en la segunda mitad del siglo XIX como resultado de tres hechos trascendentales para la medicina de la época: en primer lugar, los estudios de múltiples autopsias convencieron a Laennec que las varias formas de TB pulmonar y extra pulmonar, antes consideradas no vinculadas, formaban parte de una misma patología. En segundo lugar, en 1865, el médico militar francés Jean-Antoine Villemin demostró que la TB podía ser transmitida al cobayo con la inyección de tejido enfermo. Y finalmente, en tercer lugar, se encuentra el invaluable hallazgo de Koch en 1882, quien fue capaz de demostrar la existencia del bacilo y su patogenicidad.

Así como el conocimiento acerca de la enfermedad se fue profundizando y modificando con el correr de los años, también lo hizo el perfil terapéutico de la enfermedad. Durante la última mitad del siglo XIX y principios del XX, la piedra fundamental del tratamiento residía en la recuperación al aire libre, generalmente sanatorios especializados apartados de las ciudades que eran considerados “saludables” (Figura 1).

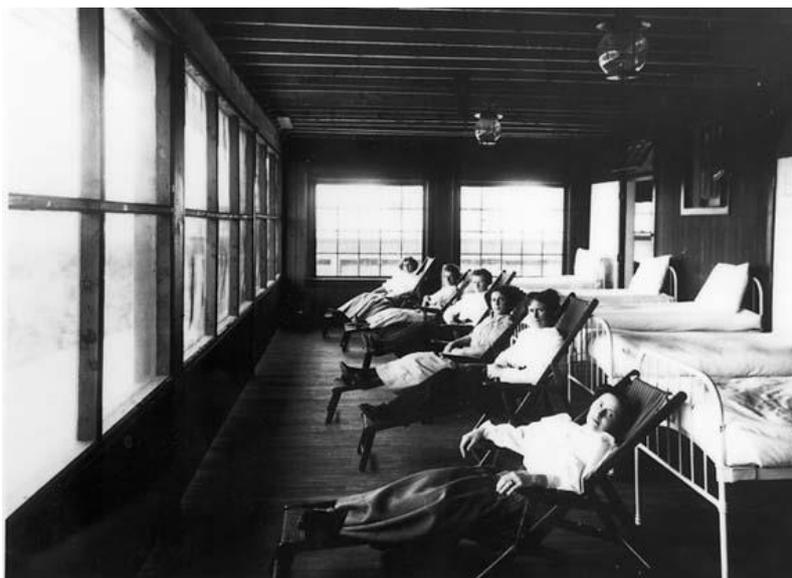


Figura 1. Pacientes tomando aire en el Ninette Tuberculosis Sanatorium, Manitoba.

Con el desarrollo de la radiología, pudo asignársele a la caverna tuberculosa importancia fundamental en la evolución de la enfermedad. Así, las técnicas terapéuticas se dirigieron entonces a la eliminación de las mismas. Para ello la gama de posibilidades se extendió desde el simple reposo en cama hasta el neumoperitoneo, neumotorax terapéutico y medidas quirúrgicas destinadas a disminuir el tamaño pulmonar como la toracoplastia. Si bien los casos diagnosticados en forma temprana y previamente a la cavitación se veían más beneficiados por la terapéutica disponible, el impacto en aquéllos pacientes avanzados no era realmente relevante (6).

La era moderna del tratamiento para la TB comenzó en 1946 con la Estreptomina (7). El efecto en la sintomatología fue dramático, pero incluso de mayor relevancia fue el hecho que pacientes con TB miliar o meníngea, condiciones hasta el momento fatales, se recuperaban con el tratamiento antibiótico.

En 1952, surge la Isoniazida, mucho más potente como fármaco antituberculoso y comienzan a instituirse entonces los tratamientos combinados, para evitar la resistencia antibiótica y la toxicidad medicamentosa, producto de dosis demasiado elevadas de los fármacos disponibles. Fue entonces por primera vez, que la tuberculosis se transformó en una enfermedad curable en casi todos los casos.

En 1970 aparece la Rifampicina como fármaco equivalente en eficacia a la Isoniazida. A partir de entonces se realizaron numerosos ensayos clínicos para tratar de lograr la mayor eficacia terapéutica, adherencia al tratamiento, menor tiempo del mismo y los menores costos. En la actualidad son cinco las drogas utilizadas como primera línea en el tratamiento de la TB: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol y Estreptomina (8, 9,196). Las primeras cuatro son administradas usualmente en forma oral y son recomendadas en base a su capacidad bactericida (habilidad para reducir rápidamente el número de bacilos viables), su capacidad esterilizante (habilidad para eliminar todos los bacilos y de este modo esterilizar el órgano afectado, medido a través de la capacidad en la prevención de recidivas) y su baja tasa de inducción de resistencia medicamentosa. Existe asimismo una segunda línea de fármacos destinados a aquellos pacientes que padecen TB resistente a la primera línea de fármacos. Dentro de este grupo de drogas se encuentran la Kanamicina, Amikacina y Capreomicina, de administración parenteral; y Etionamida, Cicloserina y PAS, de administración oral. Recientemente se ha incluido a las quinolonas en este grupo de segunda línea (Ofloxacina y Sparfloxacin) (196). El tratamiento actual se basa en una etapa inicial diaria bactericida con cuatro drogas (Rifampicina, Pirazinamida, Isoniazida y Estreptomina); seguida por una etapa de esterilización intermitente (2 veces semanales) con Rifampicina e Isoniazida. Durante la fase inicial, la mayoría de los bacilos tuberculosos son eliminados, los síntomas resuelven y el paciente se transforma en no infeccioso. La fase siguiente es necesaria para eliminar a aquellos bacilos "latentes" aún persistentes. La duración del tratamiento es variable (entre 6 a 12 meses).

1.b- Epidemiología: Incidencia estimada, Prevalencia y Mortalidad por país.

Las publicaciones más recientes que estiman la distribución mundial de la TB (12-16) se basan en datos recolectados hasta 1990. Debe destacarse que la magnitud del problema "Tuberculosis" se ha modificado desde esa fecha, debido a los cambios en la forma de control de

la enfermedad, la extensión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el crecimiento poblacional (12).

Hoy en día la TB trasciende como uno de los problemas de Salud Pública más importantes del tercer mundo. Estimaciones de la OMS señalan una cifra de 10 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes anuales, representando el número más alto de fallecimientos ocasionados por un agente infeccioso (3,4). En 1990 se estimó aproximadamente en 90 millones la cifra de nuevos casos acumulada (1990-1999) para todo el mundo, siendo la cifra acumulada de fallecimientos por esta etiología estimada en 30 millones para el mismo período. Asimismo la epidemia de HIV, ha tenido una modesta repercusión en las tasas de TB hasta la fecha. Sin embargo, se espera que el efecto de la pandemia de HIV sea manifiesto en los próximos análisis.

Cálculos estimativos indican que un 50% de la población del mundo subdesarrollado se halla infectada con el *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (17); situación que se ve agravada puesto que la coinfección con HIV en los países en vías de desarrollo es cada vez más prevalente, lo que se traduce no sólo en un incremento de 500 veces en el riesgo de presentar la enfermedad tuberculosa sino también en la aparición de bacilos con resistencia múltiple a los fármacos corrientemente empleados para el tratamiento de la misma (18).

La verdadera incidencia de la TB no puede determinarse con exactitud debido a que gran parte de los infectados no la manifiestan clínicamente. En su mayoría cursan una infección asintomática y presentan reactividad frente a la tuberculina sin desarrollar necesariamente la enfermedad. Asimismo, todas las personas infectadas permanecen de forma indefinida con riesgo para desarrollar la enfermedad activa. En las *figuras 2 y 3* se muestran respectivamente la estimación realizada por la OMS del número de casos nuevos acumulados y número de muertes acumuladas con su distribución mundial, en el período 1990-1999.

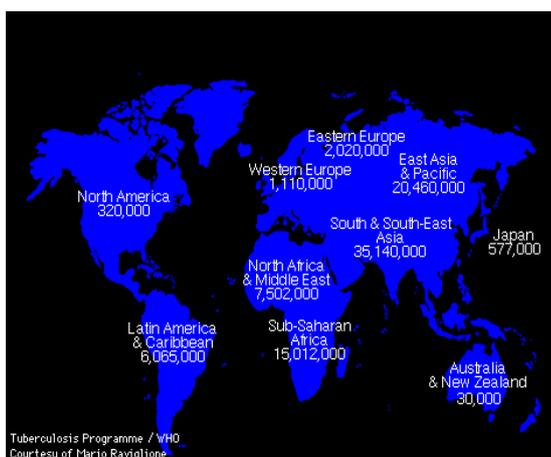


Figura 2: Estimación acumulada de Casos Nuevos de Tuberculosis en el período 1990-1999. Total de casos: 88 millones.



Figura 3: Estimación acumulada de Muertes ocasionadas por Tuberculosis en el período 1990-1999. Total de muertes: 30 millones.

1.c- Agente etiológico y Patogenia.

La TB es una enfermedad crónica, contagiosa de distribución mundial producida por dos especies de micobacterias: *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*. Suele afectar pulmones, pero puede afectar virtualmente cualquier órgano o tejido del cuerpo humano (6). El bacilo de Koch o tuberculoso pertenece al género de las micobacterias. Dentro de esta familia se han identificado ya más de 60 especies, las cuales han sido divididas en micobacterias de “crecimiento rápido” y de “crecimiento lento” (5). Comparten asimismo la estructura de pared por la que se les asigna el nombre de *bacilos ácido alcohol resistentes* (BAAR) y deben ser coloreados con la tinción de Ziehl-Nielsen. Muchas de estas micobacterias incluso no han podido ser cultivadas en medios artificiales. Las micobacterias son comunes en el medioambiente: han sido aisladas en toda la extensión del planeta con climas templados y tropicales; sin embargo no han podido aislarse en el mar o en regiones calurosas con actividad volcánica. La mayoría de las especies se desarrollan en forma lenta en temperaturas inferiores a los 25 °C. Unas pocas crecen entre 45 y 52 °C. Son extremadamente sensibles a la radiación ultravioleta y desarrollan en un rango de pH que oscila entre 5 y 8.5, con un punto óptimo en el pH neutro.

Algunas micobacterias son patógenos específicos; sin embargo es difícil descartar un reservorio medioambiental. Dentro de los principales patógenos para el hombre se encuentran MTB y *M. leprae*, los cuales pueden sobrevivir por meses en la tierra. Muchas especies son oportunistas, habitualmente no patógenas pero con capacidad potencial para generar diversas patologías tanto en humanos como en otras especies del reino animal (5).

MTB es un microorganismo bacilar, no formador de esporas, inmóvil, aerobio estricto. Su crecimiento es lento, con un tiempo de duplicación entre 15 y 20 hs. Cultivados en medio Löwenstein - Jensen, las colonias demoran en identificarse entre 3 y 6 semanas, y presentan características rugosas y friables. El requerimiento de oxígeno presenta valores óptimos para PO₂ de 140 mmHg; lo que explica su tendencia por afectar las porciones subapicales del pulmón y su escasez en tejidos necróticos que carecen de sangre oxigenada. Por otra parte, esta micobacteria puede persistir en forma latente en lesiones calcificadas y necróticas antiguas, que conservan la capacidad de reactivar su desarrollo frente a situaciones que lo favorezcan. Es por ello que se considera a esta enfermedad crónica y habitualmente extendida durante toda la vida del individuo (6).

Tras la colonización tisular, produce una reacción inflamatoria granulomatosa focal que típicamente sufre necrosis caseosa central. La transmisión de la enfermedad se produce por vía aerógena inhalatoria, a través de gotitas infectadas provenientes de pacientes con lesiones abiertas (focos tuberculosos en comunicación con las vías respiratorias). Si bien es posible la infección tras un único contacto, la mayor parte de las infecciones se producen por una exposición sostenida en el tiempo.

La patogenia de la TB se basa en:

- La virulencia de MTB.
- El papel desempeñado por la hipersensibilidad inducida.
- El rol de la respuesta inmune.
- El patrón característico, aunque no necesariamente diagnóstico, de la formación de granulomas.

El MTB no produce exotoxinas, endotoxinas ni enzimas histolíticas. El denominado factor cordonal (uno de los micósidos componente de la pared, dimicolato de trehalosa) es uno de los factores determinantes de virulencia. Las cepas que tienen la capacidad de formar cordones también poseen un glucolípido sulfatado que impide la fusión de los fagosomas con los lisosomas y favorece la supervivencia intracelular de las micobacterias en el interior de los macrófagos. Estos componentes lipídicos de pared contribuyen tanto a la virulencia como al estado de hipersensibilidad (6).

La hipersensibilidad frente al bacilo desempeña un papel muy importante en la destrucción tisular que se observa en la enfermedad. Asimismo, estos efectos lesivos están contrarrestados por el incremento simultáneo en el grado de resistencia frente a los microorganismos infectantes: aumento de la capacidad fagocítica e inhibitoria de la replicación intracelular de los bacilos (10,11). Aproximadamente entre la segunda y cuarta semana tras la infección por el bacilo tuberculoso, se puede demostrar la sensibilización por la prueba de la tuberculina. Entonces la positividad en la reacción implica infección del huésped, aunque no indica necesariamente enfermedad.

En la primoinfección (infección en una persona que no ha tenido contacto previo con el bacilo tuberculoso), los bacilos actúan como partículas inertes y producen una respuesta inflamatoria neutrofílica inespecífica. Durante este período se introducen en los fagocitos, se multiplican en forma incontrolada y pueden introducirse en los linfáticos y en el torrente sanguíneo alcanzando potencialmente cualquier órgano. Estos bacilos pueden ser destruidos, permanecer en fase latente o inducir focos de enfermedad. Producida la sensibilización, la reacción inflamatoria adopta un carácter granulomatoso.

En la figura 4 se muestra brevemente la evolución de la TB pulmonar:

En la TB primaria se suele observar una única lesión pulmonar (foco de Gohn: zona de 1-1.5 cm de consolidación inflamatoria bien delimitada) de localización subpleural en la parte superior de los lóbulos inferiores e inferior de los superiores de uno de los pulmones. Los bacilos libres en el interior de los fagocitos migran a través de los linfáticos peribronquiales a los ganglios drenantes regionales traqueobronquiales, dando lugar a la formación del Complejo de Gohn.

En la gran mayoría de los casos la infección no evoluciona y sufre inactivación con fibrosis, calcificación e incluso osificación. El estado de la bacteria dentro del granuloma no es

conocido. El microorganismo puede permanecer en un estado no replicativo, replicar y ser eliminado por el sistema inmune o alterar su actividad metabólica y presentar limitados o infrecuentes ciclos replicativos.

Cuando esta infección no presenta una evolución autolimitada se la denomina TB pulmonar progresiva (relativamente infrecuente y observada sobre todo en niños o ancianos). En esta forma progresiva, el foco primario no se autolimita, sino que las lesiones aumentan de tamaño, erosionan y se introducen en el árbol bronquial y provoca nuevas lesiones pulmonares satélite. Asimismo, estas lesiones pueden invadir y sembrar el torrente sanguíneo con bacilos tuberculosos dando lugar a la diseminación miliar de la enfermedad (Meningitis TB, potencialmente mortal, nefritis TB, etc.).

La TB Secundaria o Posprimaria es la fase de la infección tuberculosa que se produce en una persona previamente sensibilizada, tanto si los bacilos provienen de origen endógeno (reactivación, más frecuente) o exógeno (reinfección). Se inicia en los segmentos apicales o posteriores de uno o ambos lóbulos superiores con afectación radiológica de la zona vecina a la clavícula constituyendo los llamados focos de Simon y se supone que aparecen durante el período precoz de la bacteriemia favorecido por la alta PO₂ de la zona. En inmunodeprimidos las lesiones pueden representarse únicamente por focos necróticos inespecíficos.

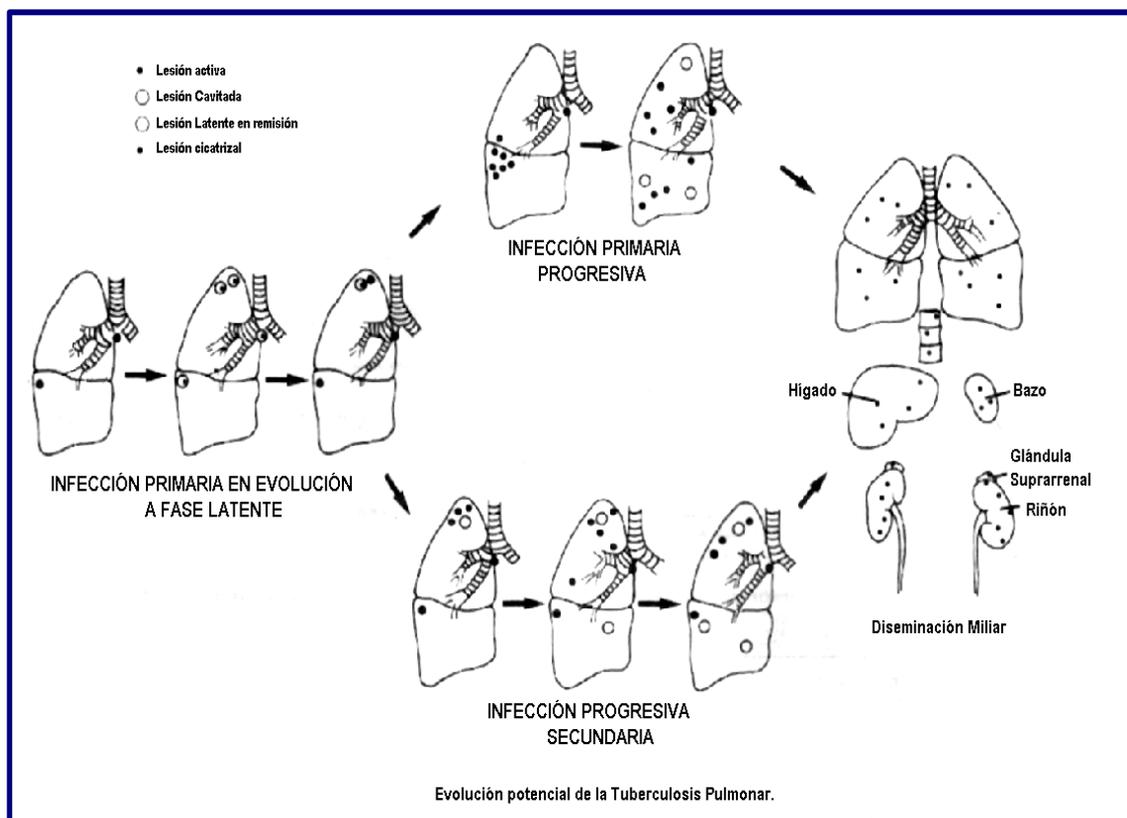


Figura 4

La evolución de esta infección es sumamente variable:

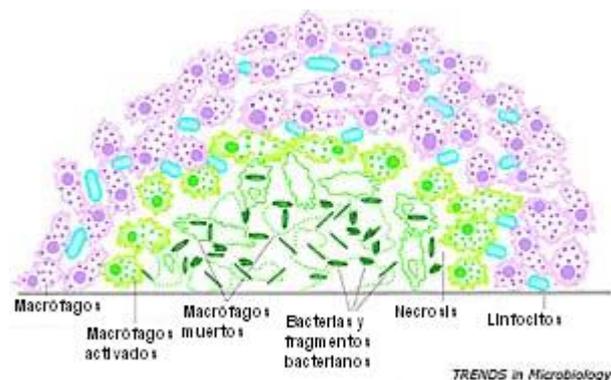
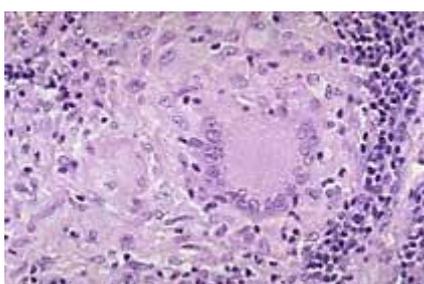
1. Cicatrización y calcificación
2. Diseminación a otras zonas del pulmón a través de vías hematógenas, linfáticas y broncógenas: TB progresiva.
3. Extensión a pleura: fibrosis, derrames, adherencias, empiema.
4. Erosión de bronquios con eliminación de material caseoso a través de la tos y afectación de toda la mucosa de revestimiento bronquial: TB traqueobronquial, laríngea.
5. Deglución: TB intestinal.
6. TB miliar: las zonas de localización más frecuente son aquéllas con mayor volúmen minuto cardíaco, si bien todo el organismo es potencialmente afectable.
7. TB progresiva de órganos aislados (2,6).

1.d- La Respuesta Inmune Frente al Bacilo Tuberculoso.

Se sostiene que la infección con MTB ocurre inicialmente en el macrófago alveolar. La bacteria se replica en el macrófago e induce la secreción de citocinas que inician la respuesta inflamatoria en el pulmón. Así, macrófagos y linfocitos migran al sitio de infección y forman la lesión característica: el granuloma (20).

El granuloma típico (Figura 5) es una lesión anatomopatológica bien estructurada y organizada constituida por linfocitos T de diversos fenotipos y macrófagos en diferentes estadios madurativos. Estos últimos incluyen células gigantes multinucleadas, células epitelioides, monocitos recientemente reclutados en tejido y macrófagos maduros, entre los cuales se distribuyen linfocitos T CD4⁺. Este conjunto de células se encuentra circundado por un grupo de células de distribución marginal principalmente constituido por linfocitos T CD8⁺. Los microorganismos se sitúan dentro de los macrófagos integrantes del granuloma. Como resultado de la necrosis de las células de localización central, el centro de la lesión adquiere características de *caseum* (necrosis caseosa típica en la infección por MTB). Eventualmente esta lesión puede curar por fibrosis y/o calcificación (Ver punto 1.c).

Figura 5: Corte histológico y representación esquemática de un granuloma tuberculoso.



La función del granuloma es la de contener la infección iniciada y prevenir entonces su diseminación sistémica, así como la de concentrar la respuesta inmune en el sitio preciso de la infección. El granuloma así constituido persiste en un huésped infectado, probablemente debido a la estimulación crónica de células del sistema inmune. Como fuera mencionado anteriormente, el bacilo es capaz de persistir en estas lesiones por varios años (21). De este modo, en el nivel más elemental, la tuberculosis latente, debe ser vista como un equilibrio entre el huésped y el bacilo. La respuesta así montada por el huésped previene el desarrollo de la enfermedad activa, y la bacteria evade su eliminación. Habitualmente la respuesta del huésped es suficiente para mantener al individuo libre de enfermedad por toda la vida. Sin embargo ocasionalmente, la respuesta inmune falla de algún modo y la infección se reactiva originando enfermedad.

Interacción Inicial huésped - bacteria.

El éxito o fracaso de la infección depende del encuentro inicial de la micobacteria con la célula huésped, usualmente un macrófago. En esta interrelación juegan un rol importante las características de ambas superficies celulares y sobre todo la vía de ingreso a la célula huésped. En el caso de las micobacterias, el alto contenido en ceras de su pared celular les confiere una característica única. Por otro lado, la abundancia de glicolípidos, incluyendo lipoarabinomananos y ácidos micólicos, es la responsable de características particulares en el tipo de respuesta inmune que este microorganismo es capaz de inducir.

Se ha postulado que el MTB tiene la capacidad de unirse a una gran variedad de receptores celulares, incluyendo el receptor para la porción Fc (FcR) de las inmunoglobulinas, receptores para complemento –CR- (con o sin previa opsonización), el receptor para manosa del macrófago, receptores para surfactante y CD14 (22); todo ello posible a través de una gran variedad de moléculas de su superficie (23). Asimismo se ha propuesto que el tipo de receptor utilizado para ingresar al macrófago influiría en la respuesta celular: la internalización de una micobacteria opsonizada por IgG utilizando el FcR, induce la producción de metabolitos reactivos del oxígeno y permite la fusión del fagosoma con el lisosoma. Mientras que el ingreso de la micobacteria por el CR3 impide el estallido respiratorio y produce el arresto del fagosoma en el estado madurativo de endosoma temprano (24).

La gran diversidad de moléculas que pueden ser utilizadas entonces por la micobacteria para ingresar a su huésped hace bastante difícil sostener el planteo que existe una vía preferida para el ingreso. Por el contrario, sugiere que la misma utiliza cualquier medio posible, tanto receptores celulares como otras moléculas, para maximizar su internalización.

Recientemente se ha descrito un rol del colesterol como esencial en el ingreso de la micobacteria al macrófago. Se observó que la depleción de colesterol de la membrana plasmática

inhibe específicamente la internalización de MTB. La importancia de esta descripción radica en que el colesterol media la asociación del fagosoma con una de las proteínas (TACO: tryptophan aspartate-containing coat) que evita la maduración del fagosoma hacia fagolisosoma (25).

Los receptores *Toll-like* (TLR) constituyen una familia de receptores identificada inicialmente en la *Drosophila*, en quienes desempeña un rol fundamental para la resistencia a patógenos microbianos. Hasta la fecha se han identificado al menos 10 TLRs, entre los cuales TLR-2, TLR-4 y TLR-9 parecen ser responsables de las respuestas celulares al peptidoglicano y lipopéptidos bacterianos, endotoxinas de bacterias gram negativas y ADN bacteriano respectivamente (195, 197). Los TLRs desempeñarían aparentemente un importante rol en el reconocimiento innato de micobacterias. Los TLR humanos son proteínas de transmembrana que poseen sitios ricos en leucina en el dominio extracelular, mientras que el dominio intracitoplasmático es homólogo al del receptor de IL-1 (IL-1R). El ingreso a partir de estos receptores deriva en la activación del NF- κ B, así como en la expresión de ciertas citocinas controladas por este factor y en la expresión de la molécula coestimuladora B7.1 (195). Es interesante notar que esta vía de activación del NF- κ B es mediada por la proteína MyD88, la misma que media la transducción de la señal a partir del IL-1R. Se conoce que la lipoproteína 19-kD de MTB induce una respuesta de tipo T helper 1 (Th1) promoviendo la citocina Interleucocina-12 (IL-12) a partir de monocitos humanos a través de un mecanismo dependiente de TLR-2 y que este único receptor es capaz de mediar este efecto (24). Esta lipoproteína posee además la capacidad de activar el promotor de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) cuando interactúa con TLR-2. La iNOS es responsable de la catálisis de los reactivos intermedios de nitrógeno y consecuentemente la generación de uno de los mecanismos microbicidas más importantes del macrófago. La interacción de MTB con los TLRs es aún más complicada, y se ha probado que diferentes componentes micobacterianos interactúan con diferentes miembros de la familia TLR generando diversos tipos de señalización.

Sobrevida de la micobacteria dentro del macrófago.

Tras el ingreso de MTB al macrófago, se inicia el desafío de supervivencia no sólo en el macrófago como célula huésped, sino en una de las células efectoras de la respuesta inmune. Para poder lograrlo, MTB ha desarrollado una serie de adaptaciones que le permiten utilizar al macrófago como nicho intracelular.

Una vez que la micobacteria se encuentra en el ambiente intracelular, si bien se las ha observado libres en citoplasma, el sitio intracelular elegido es el fagosoma debido a la capacidad que ha generado MTB de evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma. Este último, de hecho, es la organela con mayor acidez hallada en células animales, encontrándose su pH entre 4.5-5;

ambiente ácido que es mantenido a través de bombas de protones dependientes de ATP: ATPasas vacuolares (194).

Los primeros estudios se focalizaron en productos de MTB que pudieran impedir esta fusión. Así se han descrito que sulfátidos micobacterianos y derivados de la trealosa 2-sulfato multiacetilada, un glicolípido polianiónico lisosomotrópico, tienen la habilidad de inhibir la fusión fagolisosomal (195). Asimismo, se ha documentado que la habilidad de MTB de producir importantes cantidades de amonio, le permite al bacilo evadir el medioambiente tóxico de la vacuola lisosomal a través de la inhibición de la fusión fagolisosomal, así como disminuir la potencia de las enzimas intralisomales a través de la alcalinización de las mismas (195). Otro mecanismo descrito que evita la unión fagolisosomal es a través del secuestro de la proteína TACO, mencionada en el apartado anterior. Esta proteína fue asociada con la red de microtúbulos corticales en macrófagos no infectados. Curiosamente, tras la infección con MTB, esta proteína es relocalizada dentro de las 2 hs post infección, concentrándose en la membrana fagosomal y manteniéndose allí por prolongados períodos de tiempo. De esta manera, a través de la retención de TACO y consecuentemente interceptando la fusión fagolisosomal, MTB evade una de las potentes vías microbicidas macrofágicas (195). Con respecto a esto último debe mencionarse que TACO no es expresada en las células de Kupffer, fagocitos residentes hepáticos, lo cual puede justificar la resistencia relativa de este órgano a la infección micobacteriana.

El primer punto a resolver una vez dentro del nicho, es la obtención de nutrientes. El macrófago necesita hierro como cofactor en la inducción de mecanismos efectores microbicidas. A su vez este ion es un requerimiento obligado para la supervivencia de MTB. Consecuentemente se inicia la competencia por este elemento. La célula huésped se provee de hierro a través del receptor para la transferrina, mediante el cual se internaliza el hierro extracelular unido a transferrina y lactoferrina. Este complejo es internalizado para su reciclado constituyendo un endosoma temprano; las condiciones de mediana acidez en el mismo, permiten la separación del hierro de sus transportadores (24). El MTB se vale de una serie de mecanismos que le aseguran una provisión irrestricta de hierro. En primer lugar, debido a que el fagosoma que contiene a MTB es arrestado en el estado madurativo de endosoma temprano, y reside por ello en la vía de reciclado endosomal, éste tiene libre acceso al receptor de transferrina con el hierro fijado en la misma (26). Más aún, MTB ha desarrollado moléculas especiales para la fijación de hierro: sideroporos. Ellos tienen gran afinidad por el hierro intracelular y lo transfieren desde las proteínas del huésped hasta moléculas especializadas de la pared micobacteriana (micobactinas) (27). La contracara clínica de esta situación se encuentra en el aporte efectuado por Moyo et al en el año 1997, quienes describieron un aumento en la incidencia de TB entre aquellas personas que presentan una sobrecarga nutricional de hierro. En ellas, se observa una característica acumulación de hierro tanto en macrófagos como otras células parenquimatosas. Este ejemplo refleja el delicado balance que debe ocurrir en la célula huésped: demasiado hierro regula en

menos la capacidad microbicida del macrófago, permitiendo entonces el crecimiento de la micobacteria; mientras que escaso hierro es inhibitorio para el desarrollo de vías que tiendan a eliminar al patógeno.

Resultados recientes describen que en el tejido pulmonar crónicamente infectado, el MTB obtiene carbonos de los ácidos grasos. Una de las enzimas que interviene en esta vía es la isocitrato liasa, la cual está regulada en más cuando MTB se encuentra dentro de los macrófagos. Más aún, experimentos *in vitro* mostraron que la expresión de esta enzima se halla prolongada en macrófagos activados, no así en células en reposo (28,29). Todo esto sugiere que la manipulación de los aportes nutricionales, asociado al estado inmunológico del huésped, alteran en forma dramática el curso de la infección.

Citocinas intervinientes. Su rol.

Tan crítico como es para MTB poder residir dentro del macrófago, es para el huésped poder eliminar cuanto antes al patógeno a través de la producción de metabolitos reactivos del nitrógeno y el oxígeno. Modelos de TB experimental mostraron que ratones knockout (KO) para iNOS presentan una muy elevada susceptibilidad para contraer la enfermedad, reflejado en muy incrementadas cargas bacterianas, así como un tiempo de sobrevida disminuido (30,31). Asimismo, recientemente se ha demostrado el rol de superóxido en la infección utilizando ratones deficientes para el gen de p47 citosólico (*phox*), el cual es esencial para la producción de superóxido dependiente de NADPH. Los ratones *phox* *-/-* mostraron un incremento en la carga bacteriana en la infección temprana. Sin embargo, una vez que la secreción de Interferón- γ (IFN- γ) a partir de linfocitos T antígeno específicos fue iniciada, estos ratones mutantes fueron nuevamente capaces de controlar la infección y estabilizar la carga de micobacterias (32). Lo dicho anteriormente sugiere que la producción temprana de IFN- γ y la inducción de la iNOS no son suficientes para controlar la replicación inicial de MTB.

En humanos el rol del óxido nítrico (NO) es bastante más controvertido que en modelos animales. Sin embargo, experimentos *in vitro* demostraron la inducción de su producción en monocitos humanos y en macrófagos alveolares. Asimismo, ello se correlacionó con la inhibición de la replicación de MTB (24). Como contracara de lo expuesto, también se ha reportado que MTB posee la capacidad de evadir los efectos tóxicos de los metabolitos reactivos del oxígeno. Así, el lipoarabinomano bacteriano y el glicolípido fenólico I son potentes captadores de radicales derivados del oxígeno. Más aún, los sulfátidos micobacterianos interfieren en el mecanismo antimicrobiano dependiente de radicales libres macrofágicos (195).

Por otro lado, la producción de IFN- γ es crítica en el control de la infección por MTB, tanto cuando es producido en forma inespecífica en las primeras etapas de la infección como reflejo de

la activación del sistema inmune, así como producto de la activación de células T antígeno específicas. Esto último ha sido demostrado en una variedad de sistemas. Experimentalmente, en modelos de ratones deficientes tanto en la producción de IFN- γ como de IL-12, citocina crítica en la inducción de IFN- γ , se demostró que los mismos fueron altamente susceptibles al desafío con MTB (24). La contraparte clínica de este hallazgo se refleja en pacientes con deficiencia parcial o total del receptor de IFN- γ . Éstos presentan una marcada susceptibilidad para padecer infecciones bacterianas intracelulares, incluyendo micobacterias medioambientales oportunistas, y además sufren infecciones diseminadas por BCG (24).

Como se mencionara recientemente, la IL-12 es otra de las citocinas fundamentales en la respuesta frente a MTB. Es inducida tras la fagocitosis de MTB por macrófagos y células dendríticas, siendo crítica tanto en el desarrollo de un perfil de respuesta del tipo Th1, así como para la producción de IFN- γ . Otra citocina relevante, es el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Éste actúa en forma sinérgica con IFN- γ en la activación del macrófago induciendo la producción de NO e intermediarios reactivos derivados del oxígeno; a la vez que también actúa en la activación de células T. Sin embargo, posiblemente el rol esencial de esta citocina sea el que desempeña en la formación y organización del granuloma, muy probablemente debido a sus efectos sobre moléculas de adhesión, quemoquinas y expresión de receptores de quemoquinas (21). Así, ratones deficientes en TNF- α exhiben una pobre formación de granuloma y áreas de extensa necrosis pulmonar. Consecuentemente a la falla en la contención de la infección, se produce una rápida diseminación de la misma y muerte del animal (33). Asimismo, la producción de TNF- α debe ser finamente controlada, ya que su sobreproducción conduce a un incremento de la acumulación celular, compromiso de la función pulmonar y exacerbación del daño tisular.

Al igual que TNF- α , IL-1 β es una citocina proinflamatoria mayormente producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con TB, la misma es expresada en exceso y sobre todo en el sitio de infección. Estudios en ratones han sugerido un importante rol de la misma en la fisiopatogenia de la TB: ratones doble KO para IL-1 α , IL-1 β y ratones deficientes en el receptor tipo I para IL-1 muestran una incapacidad para controlar el crecimiento micobacteriano, así como una defectuosa formación de granulomas tras la infección con MTB (197).

IL-6 también ha sido implicada en la respuesta del huésped frente a MTB. Esta citocina cumple numerosos roles en la respuesta inmune, incluyendo inflamación, hematopoyesis y diferenciación de células T, así como funciones antiinflamatorias (197). Es producida en forma temprana tras la infección micobacteriana y se la considera relevante en la respuesta innata inicial frente a MTB. Se ha reportado un potencial rol supresor de la respuesta T frente al patógeno (195).

La IL-10 es generalmente considerada una citocina principalmente antiinflamatoria. Es producida por macrófagos y células T durante la infección por MTB. Es capaz de generar la desactivación de macrófagos, incluyendo la regulación en menos de la producción de IL-12, lo cual conlleva a la disminución de la producción de IFN- γ por parte de las células T. Se ha reportado en numerosos trabajos que los macrófagos de pacientes enfermos de TB se comportan como supresores de la proliferación T *in vitro*; y la inhibición de IL-10, es capaz de revertir parcialmente tal inhibición (195). Asimismo, la IL-10 inhibe directamente las respuestas mediadas por linfocitos T CD4⁺, así como la función de las células presentadoras de antígenos infectadas con MTB. Más aún, puede contrarrestar la activación mediada por IFN- γ .

El Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), es una clásica interleucocina antiinflamatoria implicada en la supresión de la respuesta T y la desactivación de macrófagos a través de la inhibición de la inducción de la iNOS por IFN- γ en enfermos de TB (195). Asimismo antagoniza la presentación antigénica, la producción de citocinas proinflamatorias y la activación celular (197). Al igual que IL-10, esta citocina es producida en exceso durante la TB y es expresada en el sitio de infección (197): TGF- β se encuentra presente en lesiones granulomatosas de pacientes tuberculosos y es producida por monocitos humanos tras la estimulación con MTB o lipoarabinomano. Se la ha implicado en el daño tisular y la fibrosis durante la TB, ya que promueve la producción y depósito de colagenasas y matriz colágena por parte del macrófago (197). En el marco de su función antiinflamatoria, TGF- β muestra una función sinérgica con IL-10: la primera estimula la producción de la segunda, y ambas citocinas actúan sinérgicamente en la supresión de la producción de IFN- γ (197). La regulación de esta citocina es compleja y ocurre en varios niveles. Aún no ha sido dilucidado el rol *in vivo* de esta citocina ya sea en función de un posible rol protector o facilitador de la patología.

Células T.

La TB es el prototipo de infecciones que requiere una respuesta inmune celular para su control (10,11). Si bien la infección se asocia a una rica producción de anticuerpos (Ac), no se ha podido demostrar un rol claro en la defensa del huésped. Una de las posturas sugiere una función auxiliar de los Ac en la protección frente a MTB mediada por células. Así, MTB opsonizados con Ac, perderían la capacidad de bloquear la descarga de enzimas lisosomales en el fagosoma, favoreciendo ello la destrucción de las micobacterias (19).

Existe consenso en que la inmunidad mediada por células hacia la bacteria es de fundamental importancia para el curso de la infección en el huésped. Los estudios efectuados en ratones y en humanos indican que la diferenciación de los linfocitos CD4⁺ es un evento primordial para que la respuesta inmune adaptativa devenga en la generación de reacciones de tipo celular

o bien en la síntesis de Ac. De este modo, las células T productoras de citocinas que aumentan la actividad de los macrófagos ($\text{IFN-}\gamma$) o expanden la población de linfocitos respondedores (Interleucina-2, IL-2) han sido designadas células Th1, mientras que aquellas cuyos mediadores estimulan la inmunidad humoral o inhiben respuestas Th1 (IL-4, IL-5, IL-6, y para el sistema humano en menor medida la IL-10) reciben el nombre de células Th2.

El vínculo que se desarrolla entre micobacterias / hombre es consecuencia de los efectos que se producen sobre el sistema inmune:

- Estímulos constantes en baja escala “boosting” por parte del medioambiente conducen al desarrollo de respuestas de tipo Th1 hacia los antígenos micobacterianos comunes, así como a una respuesta de duración corta en el tiempo hacia los antígenos micobacterianos específicos de especie (5).
- Por el contrario, un contacto excesivo con patógenos potenciales oportunistas de crecimiento lento, o bien, invasión subclínica de los tejidos, conduce a la supresión de respuestas del tipo Th1 y a la aparición de una respuesta prolongada en el tiempo de tipo Th2 hacia los antígenos específicos de especie (5).

- **Células T CD4⁺**

Como fuera mencionado anteriormente, el hábitat preferido por MTB para su desarrollo es el fagosoma del macrófago que parasita. Debido a ello, a partir de este compartimiento celular, los antígenos micobacterianos tienen rápido acceso a la maquinaria encargada de procesar los antígenos que serán presentados en el contexto de moléculas codificadas por MHC clase II. Por tal motivo se produciría tras la presentación en este contexto, la activación de células T CD4⁺ específicas. Prueba del rol esencial de estas células es el marcado incremento de la susceptibilidad a la infección con MTB que ocurre tras la infección con HIV (34).

Se postula que el rol fundamental de estas células sería la producción de citocinas, específicamente $\text{IFN-}\gamma$. Esta producción parece ser requerida en las etapas tempranas de la infección, ya que tras 2 semanas de infección con MTB, ratones CD4⁺ -/- y MHC clase II -/- mostraron un 50% menos $\text{IFN-}\gamma$ en pulmón. Mientras que a las 4 semanas pos infección, los niveles de esta citocina eran equivalentes a los controles. Esta compensación en la producción de $\text{IFN-}\gamma$ en los ratones mutantes fue generada a partir de linfocitos T CD8⁺ (24).

Evidencia en humanos, sugiere además que el rol de las células T CD4⁺ no se limita sólo a la producción de $\text{IFN-}\gamma$, sino que también cumplirían una función citolítica adicional, particularmente a nivel local pulmonar (35). Un posible mecanismo que explicaría esto último, es que ello fuera un proceso mediado por apoptosis dependiente de Fas-Fas ligando de los macrófagos infectados, lo cual consecuentemente reduciría la viabilidad de las micobacterias intracelulares

(36). Además, estas células son capaces de producir otras citocinas como IL-2, interactuar con otras poblaciones celulares (células CD8⁺ y linfocitos B), así como emplear otros mecanismos de activación macrófaga (21).

- **Células T CD8⁺**

A pesar de la localización intrafagosomal de MTB, se acepta que las células T CD8⁺ participan en el desarrollo de una respuesta exitosa frente a este microorganismo. Experimentalmente, ratones deficientes en β_2 -microglobulina, el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP), CD8 α y perforina son todos más susceptibles, aunque en diferente grado, a la infección con MTB respecto de los controles normales. Dentro de estos grupos, los más susceptibles fueron los ratones deficientes en β_2 -microglobulina y TAP, sugiriendo que el procesamiento a través de moléculas codificadas por MHC de clase I y consecuentemente la activación de linfocitos T CD8⁺ son requeridos para el control de la infección por MTB (24). Una de las explicaciones que se hallan a la presentación de este tipo de antígenos a través de moléculas codificadas por MHC clase I, es que la inducción de apoptosis de las células parasitadas genera cuerpos apoptóticos que serían fagocitados por macrófagos o células dendríticas y presentadas por la vía dependiente de TAP a linfocitos T CD8⁺. La apoptosis es un evento muy reciente tras la infección por MTB, pero no resulta en una disminución significativa de la viabilidad micobacteriana (24).

Las explicaciones posibles para la mayor susceptibilidad en ratones deficientes en β_2 -microglobulina son las siguientes: β_2 -microglobulina estabiliza la expresión en superficie de las moléculas de presentación antigénica no clásicas MHC - Ib y CD1, ambas no polimórficas. De este modo, células T restringidas por estos componentes podrían cumplir una función protectora contra MTB. Dentro de los antígenos micobacterianos presentados por estas moléculas no clásicas se han reportado: ácido micólico, lipoarabinomano, fosfatidil inositol manósido, glucosa monomicolato y glicolípidos isoprenoides (195).

Hoy en día se conoce que lípidos componentes de la pared micobacteriana, pueden ser transferidos de macrófagos infectados hacia células de la vecindad, produciéndose entonces un traspaso de antígenos micobacterianos entre células. Posiblemente esto se produzca entre macrófagos y células dendríticas, células presentadoras de antígenos con la principal expresión de CD1 (37,38).

La β_2 -microglobulina interactúa además con Hfe, una proteína que se vincula a la regulación de la absorción de hierro. Como consecuencia de ello, los ratones deficientes en β_2 -microglobulina muestran una sobrecarga tisular de hierro (24).

El mecanismo efector de las células T CD8⁺ es fundamentalmente la producción de citocinas y la citólisis. Tras el reconocimiento antigénico, estas células producen IFN- γ y TNF- α , que como se describiera con anterioridad, son citocinas claves en la activación macrofágica. Existe asimismo evidencia que estas células desempeñan un importante rol en la protección a largo plazo contra MTB en humanos (39).

Las células CD8⁺ también desempeñan funciones citolíticas dirigidas hacia macrófagos infectados por MTB. Hasta la fecha, la contribución de este último mecanismo en la tuberculosis ha sido muy controvertida. Sin embargo, estudios recientes demostraron mecanismos de citólisis específica en pulmones y ganglios linfáticos de ratones infectados con MTB, mediada por estas células a través de un mecanismo restringido por MHC clase I y dependiente de β_2 -microglobulina. Estas células fueron capaces de lisar los macrófagos infectados a través de perforinas. Más aún, el grupo de células CD8⁺ restringidas por el grupo I CD1, fueron capaces de cumplir su función citotóxica mediante la introducción de gránulos a través de poros efectuados vía perforina. Este mecanismo resultó en una notable disminución de la viabilidad de las micobacterias intracelulares, la cual fue atribuida a la acción de la granulicina, quien fue capaz de matar micobacterias extracelulares tras la alteración de la integridad de su membrana celular (24).

- **Células T $\gamma\delta$**

Tanto en ratones como en humanos, el número de células que expresan TCR $\gamma\delta$ comprende entre el 1-5% de los linfocitos de sangre periférica y órganos linfoides. En la adultez, el 50% de las células humanas T $\gamma\delta$ son V γ 2 δ 2. Esta subpoblación ha sido implicada en la respuesta frente a infecciones micobacterianas, principalmente tras la observación de su presencia temprana, tanto en lesiones de pacientes enfermos de Lepra (40) como en modelos de tuberculosis murina (41); siendo todas las células estimuladas del tipo V γ 2 δ 2.

Existe evidencia asimismo, que un subgrupo de células T V γ 2 δ 2 es capaz de lisar macrófagos infectados con MTB a través de una vía dependiente de gránulos que como resultado conlleva a una pérdida de la viabilidad micobacteriana, similar a la descrita para los linfocitos T CD8⁺ restringidos por CD1 (24).

El rol que se les ha atribuido a estas células T $\gamma\delta$ es el de dirigir la infiltración celular y la formación del granuloma, procesos que ocurren en etapas tempranas de la infección. Sin embargo, tras la interacción de su TCR con antígenos micobacterianos, estas células son capaces de activarse e incrementar la expresión de Fas ligando, lo cual explicaría el rol regulador de estos linfocitos T $\gamma\delta$ en el granuloma y la desaparición de estas células de la sangre periférica en pacientes tuberculosos (24).

Evasión de la Respuesta Inmune del huésped.

En apartados anteriores se ha detallado el ingreso del parásito a la célula huésped y las diversas formas que el mismo genera para sobrevivir en el medioambiente intracelular. Se ha desarrollado asimismo la respuesta inmune que es capaz de generar y los mecanismos por los cuales el huésped detiene la progresión de la infección.

A pesar de todo ello, MTB ha generado mecanismos por los cuales puede evadir la respuesta inmune y modular al macrófago en forma variada para prevenir una respuesta celular que termine por reconocer y eliminar los bacilos intracelulares.

Los macrófagos infectados por MTB son particularmente ineficaces para estimular tanto la proliferación como la producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ específicos (21). La infección de macrófagos puede resultar en una regulación en menos de moléculas codificadas por MHC de clase II y consecuentemente de la presentación antigénica (42,43). Como fuera mencionado, existe evidencia que indica que MTB induce al macrófago a producir citocinas inhibitorias de la respuesta inmune, como IL-10 y TGF- β , las cuales serían las responsables de la incapacidad del macrófago para estimular en forma efectiva a las células T (21). Más aún, las bases moleculares de la supresión T que se observa en la TB activa, han sido atribuidas a TGF- β . Los niveles de esta citocina en plasma se correlacionan con la extensión de la TB. Asimismo, se ha observado que ellos descienden a valores equivalentes a controles sanos tras la antibioticoterapia (45).

Recientemente se ha reportado que los macrófagos infectados por MTB son refractarios a los efectos de IFN- γ (44) y por lo tanto incapaces de lograr su activación.

Por lo expuesto, se puede afirmar que la TB deber ser considerada como un equilibrio entre el huésped y el bacilo. De esta interacción resultará el control de la infección o evolución de la enfermedad con una gama de cuadros clínicos y severidades sumamente variables.

1.e- Eje Hipotálamo - Hipófisario - Suprarrenal.

La hipófisis es un órgano endócrino que regula el crecimiento, metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas, así como el desarrollo y mantenimiento anatómico y funcional de las principales glándulas de secreción interna (sexuales, tiroides y corteza suprarrenal). Asimismo actúa controlando la diuresis y mantenimiento del equilibrio osmótico del organismo y en el de la expulsión de la leche. El Sistema Nervioso Central (SNC), a través del hipotálamo influye sobre la actividad hipofisaria y por tanto, sobre el resto de las funciones endócrinas.

Sustancias producidas por la hipófisis y el hipotálamo, actúan sobre diferentes funciones nerviosas y pueden comportarse como neurotransmisores en SNC. Así, las β -endorfinas, tienen importante participación en la respuesta al estrés. La hipófisis interviene así en la integración de las funciones del organismo.

La hipófisis se sitúa en la silla turca del esfenoides. Se encuentra separada del cráneo por la tienda de la hipófisis o diafragma hipofisario, el cual es atravesado por el tallo hipofisario que une la hipófisis con el hipotálamo.

Puede dividirse a la hipófisis en dos segmentos que a su vez tienen distinto origen embriológico: la Adenohipófisis, de origen epitelial, derivada de la bolsa de Rathke evaginación del ectodermo bucofaringeo y la Neurohipófisis, que proviene de la evaginación del piso del tercer ventrículo, es decir, del hipotálamo.

La relación de la adenohipófisis con el hipotálamo es vascular y se lleva a cabo por el sistema porta hipofisario. La neurohipófisis se contacta con el hipotálamo a través del tallo neural, en el cual los axones se proyectan desde los núcleos supraóptico y paraventricular hacia la neurohipófisis (46) (Figura 6).

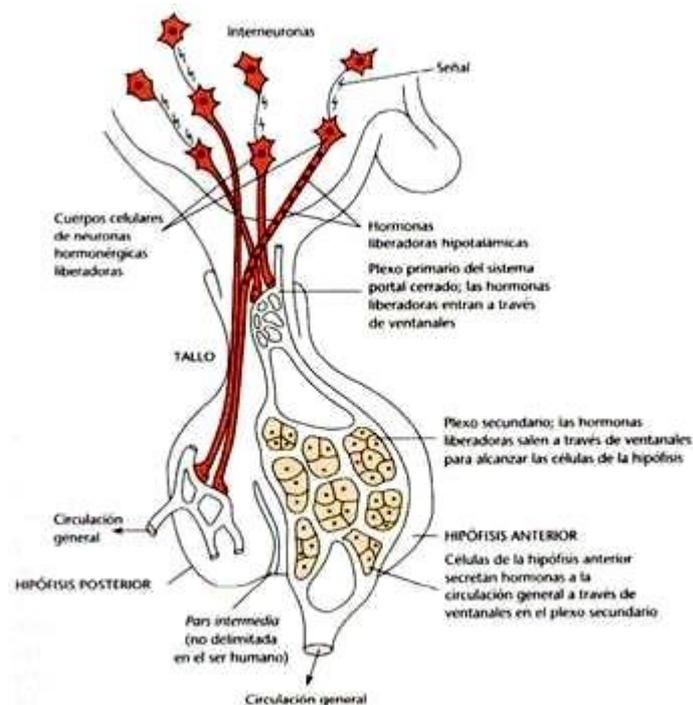


Figura 6

Funciones de la neurohipófisis.

El sistema hipotálamo - neurohipofisario está formado por dos núcleos del hipotálamo anterior: supraóptico y paraventricular, por los haces hipotálamo - hipofisarios y por el lóbulo posterior de la hipófisis.

Las hormonas neurohipofisarias son la vasopresina o antidiurética (ADH) y la oxitocina, las cuales provienen de hormonas llamadas neurofisinas: neurofisina I es la prohormona de la oxitocina y la neurofisina II, la de la ADH.

Las mismas fueron el primer ejemplo conocido de neurosecreción. Son neuronas peptidérgicas. Las mismas secretan las neurofisinas que atraviesan todo el tallo, se depositan y concentran en los terminales axónicos de la neurohipófisis. Estos precursores hormonales son clivados tras el estímulo y liberadas de esta manera al torrente circulatorio las hormonas activas. En líneas generales, ADH se vincula con el mantenimiento del equilibrio del medio interno a través de la resorción facultativa de agua a nivel de los tubos colectores renales. Por su parte, oxitocina tiene como función principal la expulsión de leche a través de la contracción de las células mioepiteliales de los acinos mamarios. Asimismo participa en la contracción uterina en el momento del parto.

Funciones de la adenohipófisis.

Las funciones de la misma pueden clasificarse en **1)** de crecimiento y morfogenéticas, **2)** de estimulación y regulación endócrina, **3)** sexuales y reproductivas, **4)** metabólicas.

La adenohipófisis es el órgano central de la constelación de las glándulas endócrinas del organismo, ya que contribuye a desarrollar y mantener la estructura y función de la tiroides, suprarrenales y gónadas. Por medio del hipotálamo, llegan a la hipófisis influencias provenientes del organismo que regulan y modifican sus funciones.

Los factores liberadores o inhibidores de la liberación de las hormonas hipofisarias son llamados hormonas hipofisotropas, polipéptidos producidos en el hipotálamo y vehiculizados a través del sistema porta hipofisario; los cuales, llegados a la hipófisis promueven la liberación o bien la inhibición de la misma, de las hormonas adenohipofisarias. El hipotálamo tiene una acción trófica estimulante sobre la secreción de muchas trofinas hipofisarias y una acción tónica inhibidora sobre la prolactina (PRL) (46).

Hormonas hipotalámicas hipofisotropas.

Controla la producción / liberación de:

CRH o CRF	Hormona liberadora de corticotrofina	ACTH y endorfinas
TRH	Hormona liberadora de tirotrófina	TSH y PROL
GH-RH	Hormona liberadora de somatotrofina	GH (somatotrofina)
Gn-RH	Hormona liberadora de gonadotrofinas	FSH y LH
Somatostatina	Hormona inhibidora de la liberación de	GH y TSH
PIH	Hormona inhibidora de prolactina (dopamina)	PRL
MSH-IH	Hormona inhibidora de melanocito estimulante	MSH

En la secreción de hormonas hipotálamicas intervienen estímulos colinérgicos y monoaminérgicos. Las principales monoaminas involucradas son la noradrenalina, serotonina y dopamina. Mecanismos adrenérgicos intervendrían en la secreción de somatotrofina (GH), adenocorticotrofina (ACTH) y gonadotrofinas, mientras que mecanismos dopaminérgicos favorecen la liberación de GH y gonadotrofinas e inhiben la secreción de PRL.

Las endorfinas aumentan la liberación de PRL, GH, ACTH y ADH, y disminuyen la liberación de gonadotrofinas.

Seguidamente se presentan las hormonas adenohipofisarias conocidas y sus principales funciones:

1. **GH**, promueve el anabolismo proteico y el crecimiento.
2. **Tirotrofina (TSH)**, regula y mantiene la estructura y función de la tiroides.
3. **ACTH**, regula y mantiene la estructura y la función de la corteza suprarrenal.
4. **FSH**, responsable del crecimiento de los folículos ováricos en la mujer conjuntamente con la LH, y regula los túbulos seminíferos en el hombre.
5. **LH**, estimula las células intersticiales, provoca la ovulación y formación del cuerpo amarillo en la mujer en conjunto con la FSH, y regula el tejido intersticial en el hombre.
6. **PRL**, hormona lactogénica, regula la formación de leche en la mama preparada y con acción luteotrófica en el ovario.
7. **MSH**, o melanotrofina, estimula la pigmentación de la piel.

TSH, FSH y LH son glucoproteínas conformadas por dos subunidades. La primera de ellas, la subunidad α (alfa), es estructuralmente casi idéntica o idéntica a la de la gonadotrofina coriónica humana (HCG). La diferencia entre las mismas reside en la subunidad β (beta), la cual les otorga especificidad biológica.

GH y PRL son proteínas de alto peso molecular.

ACTH, MSH y β -endorfinas son polipéptidos derivados de un mismo precursor, la Proopiomelanocortina (POMC).

La regulación de la secreción de las hormonas y factores liberadores hipotálamicos e hipofisarios se lleva a cabo a través de los llamados servomecanismos de retroalimentación, que pueden ser largos o cortos, inhibitorios o estimulatorios. Trátase del sistema hipotálamo→ adenohipófisis→ tejido periférico, o bien de un sistema hipotálamo→ adenohipófisis→ glándula endócrina periférica→ tejido periférico, son regulados por este tipo de mecanismos de retroalimentación:

- ✓ LARGOS: el nivel de hormona circulante de la glándula periférica, actúa directamente sobre el lóbulo anterior de la hipófisis (largo directo), o sobre el hipotálamo y así, indirectamente, sobre la hipófisis (largo indirecto), o bien al mismo tiempo sobre hipotálamo e hipófisis (largo

mixto). Actúa en la hipófisis sobre su trofina correspondiente estimulando su secreción (servomecanismo positivo) o inhibiendo su secreción (servomecanismo negativo).

- ✓ **CORTOS:** las trofinas adenohipofisarias circulantes actúan sobre el hipotálamo, ya sea aumentando (servomecanismo positivo) o disminuyendo (servomecanismo negativo) su propia liberación.
- ✓ **ULTRACORTOS:** forman parte de los anteriores. Las hormonas liberadoras también pueden regular su propia liberación en el hipotálamo, y en forma similar, las hormonas circulantes de las glándulas periféricas pueden actuar directamente sobre la misma glándula que las produce, generalmente de manera inhibitoria.

Glándulas Suprarrenales.

Las suprarrenales son glándulas endócrinas cuya función tiene importancia fundamental para mantener la vida. Están constituidas por dos partes de origen embriológico y función diferente: médula, de origen neuroectodérmico y productora de catecolaminas; y la corteza derivada del mesodermo que por medio de hormonas regula el metabolismo de los glúcidos, proteínas y lípidos (47).

Esta última se divide en tres zonas con producción diferencial: glomerulosa o externa, encargada de la producción del mineralocorticoide: aldosterona. La zona fascicular o media, que constituye la mayor parte de la corteza y con gran contenido lipídico y la zona reticular o interna, pobre en lípidos (Figura 7). Estas dos últimas actúan como una unidad funcional produciendo glucocorticoides (GC), mineralocorticoides (Mc) distintos de la aldosterona y esteroides sexuales. Dentro de los GC, el cortisol es el de mayor importancia en el hombre, siendo en la rata y el ratón la corticosterona (72).

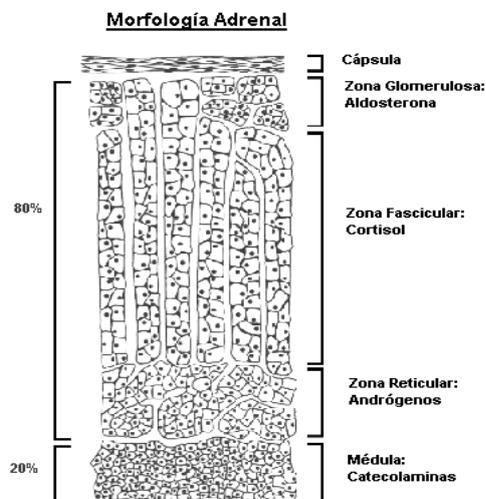


Figura 7

En la siguiente tabla se encuentran representados los principales esteroides adrenales y aproximadamente, la cantidad diaria producida de los mismos.

<u>Compuesto</u>	<u>Secreción en 24hs.</u>
Cortisol	15-30 mg
Corticosterona	2-5 mg
DOC	40-388 µg
18-hidroxi-DOC	94-121 µg
18-hidroxycorticosterona	145-460 µg
Aldosterona	70-210 µg
DHEA	15-30 mg
11 β- hidroxandrostenediona	3-5 mg
Androstenediona	0-10 mg
17 β- estradiol	vestigios
Progesterona	0.4-0.8 mg

Todas las hormonas corticales son esteroides y contienen el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Un punto que debe destacarse, es que los esteroides corticales no pueden ser almacenados en las células adrenales. Los mismos son secretados inmediatamente después de ser liberados del compartimiento mitocondrial, donde son sintetizados. De esta manera, la regulación de la secreción ocurre a través de la regulación de la biosíntesis adrenal (127). Los principales esteroides secretados son:

- ✓ **Mc:** ALDOSTERONA es el de mayor actividad. Se secretan 0.07-0.2 mg/día. También se secreta desoxicorticosterona (DOC), 100 veces menos potente y de acción similar, y 18-hidroxi-DOC, que retiene sodio pero no potasio.
- ✓ **Andrógenos:** el más importante es la Dehidorepiandrosterona (DHEA), como compuesto libre y como sulfato (DHEA-S) y alcanza una tasa de secreción similar a la del cortisol; le sigue en importancia la androstenediona. La circulación de DHEA es mayormente como compuesto sulfatado inactivo en una proporción entre 250 y 500 veces superior a la de DHEA en mujeres y hombres respectivamente. Esta diferencia entre ambas se debe a la velocidad de aclaramiento de las mismas: DHEA tiene una vida media de 1 a 3 hs mientras que DHEA-S entre 10 y 20 hs (198). Esta última prohormona es activada en tejidos periféricos que expresen DHEA sulfatasa, la cual se encuentra diferencialmente distribuida en tejidos linfoides. Los andrógenos adrenales poseen débil potencia androgénica pero sin embargo, DHEA es de gran importancia como

producto suprarrenal fetal. En el adulto se comportan como precursores de testosterona, en la cual se transforman en variados tejidos periféricos. En los hombres, la principal fuente de la misma se obtiene a partir de los testículos; de manera que la generación de testosterona y 5α -dihidrotestosterona a partir de andrógenos suprarrenales cobra mayor importancia en mujeres, ya que la producción de andrógenos gonadales es mínima en comparación con los testículos.

Se secretan asimismo pequeñas cantidades de progesterona (0.4-0.8 mg/día) y trazas de estrógenos. En las mujeres, la principal fuente de estrógenos son las gónadas, ya que la producción adrenal de los mismos es mínima.

La ACTH estimula la secreción de andrógenos adrenales y los GC sintéticos como la dexametasona son capaces de disminuirla. Bajo condiciones normales, DHEA es secretada sincrónicamente con cortisol tras el estímulo de CRH y ACTH, observándose variaciones diurnas en su concentración. La DHEA-S también es secretada por las adrenales en respuesta a ACTH aunque en proporción mucho menor. Ésta no presenta variaciones diurnas debido a su lenta tasa de aclaramiento (198). La dependencia de las adrenales en la secreción de andrógenos se confirma en la no detectabilidad de los mismos tanto en hombres como en mujeres con panhipopituitarismo e insuficiencia suprarrenal (198). A pesar que la secreción de andrógenos adrenales sigue el mismo ciclo circadiano que ACTH y cortisol, existen situaciones en que los niveles de los mismos parecen estar disociados. Ejemplo de ellas son la enfermedad de Cushing, la falla miocárdica crónica y enfermedades crónicas. En estos ejemplos, las concentraciones de GC son altas, mientras que las de DHEA se mantienen normales en la primera y bajas en las dos restantes (171,198, 199). Traumas fisiológicos agudos, así como enfermedades con importante compromiso sistémico se asocian con niveles descendidos de DHEA y DHEA-S. Asimismo, las concentraciones de testosterona y androstenediona también descienden, mientras que las concentraciones de GC se mantienen elevadas. Este hecho indica una disminución de la producción de andrógenos adrenales con una desviación de la producción hacia las vías que sintetizan cortisol en situaciones de enfermedades serias o con importante compromiso sistémico.

La DHEA ha sido denominada como el esteroide madre por ser precursora de muchos otros esteroides. Una característica particular de DHEA es que su secreción no sólo es sexo dependiente, sino que también disminuye a lo largo de la vida paralelamente al envejecimiento del Sistema Inmune (SI) (171), siendo mínima en la ancianidad (198). Esta disminución tanto fisiológica como la descrita en contextos patológicos, deriva en numerosos efectos inmunológicos que se expondrán más adelante.

✓ **GC:** CORTISOL y CORTICOSTERONA. Del primero se secretan en el hombre entre 15 y 30 mg/día y de la segunda de 2 a 5 mg/día. El cortisol y la corticosterona circulan en plasma unidos a una α_1 -globulina: la transcortina. En condiciones normales esta proteína liga el 77% de

estas hormonas, mientras que la albúmina une el 15%. El 8% restante es libre y por lo tanto activo.

Cuando los niveles de cortisol plasmático, que normalmente son de 10-20 $\mu\text{g}/\text{dl}$, superan los 30-40 $\mu\text{g}/\text{dl}$, el exceso es transportado por la albúmina (47). Este esteroide tiene una vida media plasmática de 90 minutos.

La transcortina es producida en hígado, proceso estimulado por estrógenos. El embarazo y los estrógenos aumentan los valores de cortisol ligado a la transcortina, sin síntomas de hipercortisolismo puesto que la cantidad de hormona libre se mantiene constante. Un evento similar ocurre en individuos con hábito etílico.

Recientemente se ha estudiado al eritrocito como transportador de cortisol comparando la tasa de fijación de este esteroide con las fracciones unidas a proteínas y libre, en concentraciones que oscilan entre 10^{-7} a 10^{-5} mol/l. Así se observó que el cortisol asociado a eritrocitos puede exceder la fracción unida a albúmina o libre en plasma. Asimismo, la tasa de disociación del cortisol del eritrocito es lo suficientemente alta como para concluir que el eritrocito es una importante fuente de transporte de cortisol desde las adrenales hacia los órganos blanco (127).

La ACTH regula la función y el metabolismo de la glándula suprarrenal; la adrenal posee cierto grado muy limitado de autonomía. La CRH hipotalámica, que a su vez estimula la generación de ACTH a partir de la POMC, su precursor, es estimulada por diversos factores generadores de estrés, que actúan sobre SNC, incluyendo agentes químicos (toxinas bacterianas, diversos metabolitos), factores nerviosos (traumatismos, reflejos), condiciones ambientales (calor, frío, sonido, luz), fenómenos psicológicos (miedo, dolor, ansiedad, frustración, fatiga), hemorragia, anoxia, hipoglucemia, etc. Estos factores inducen cambios en los neurotransmisores que a su vez modulan en forma estimulante (serotonina, acetilcolina) o inhibitoria (noradrenalina) a las neuronas hipotalámicas productoras de CRH. Por su parte, la ACTH aumenta la secreción de corticoides al actuar sobre la corteza suprarrenal.

En sujetos normales el cortisol plasmático presenta un ritmo circadiano, observándose un nivel máximo a las 6 - 8 hs de la mañana de hasta 20 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de plasma; luego los valores decaen hacia la noche alcanzando cifras inferiores a 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de plasma a las 22 - 24 hs. Los ascensos o descensos no son continuos, sino que el cortisol presenta breves pulsos secretorios de 20 - 100 minutos de duración. Estos picos están precedidos por pulsos secretorios de ACTH (secreción episódica) (47). La secreción de CRH y ACTH se encuentra asimismo, regulada por la concentración de cortisol en sangre.

La estimulación aguda con ACTH aumenta principalmente la secreción de GC. Esta acción puede ser muy rápida: 0,5 minuto. Por otro lado, el estímulo permanente o crónico con ACTH tiene efecto trófico sobre la glándula.

Interacciones inmunoendócrinas intraadrenales en la regulación de la esteroidogénesis adrenocortical.

Las células adrenales producen una considerable variedad de hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores y citocinas. En el transcurso de los últimos años, diversos grupos han demostrado que tanto estos productos adrenomedulares como productos inmunes son capaces de modular la función secretoria adrenocortical (201). Estas interacciones entre diversos sistemas son relevantes no sólo para la regulación de la función adrenal bajo condiciones fisiológicas, sino también durante el transcurso de diversas situaciones patológicas.

Las citocinas liberadas tras diversos estímulos del SI, son capaces de activar el eje HPA en sus tres niveles. A nivel adrenal regulan la liberación de hormonas, lo cual a su vez ejerce nuevamente efecto sobre el sistema inmune que las generó. Es ampliamente aceptado que el nivel de citocinas plasmáticas es demasiado bajo como para lograr un efecto apreciable sobre la función adrenal. De este modo, si los productos inmunes afectan el funcionamiento adrenal, ellos deben ser producidos dentro de la misma glándula. Es así que la mayor fuente de citocinas intraadrenales la constituyen las células inmunes que la infiltran y las células adrenales mismas. Macrófagos infiltrantes producen IL-1, IL-6, TNF, VIP y TGF- β entre las citocinas más relevantes que regulan la función adrenal. Estos macrófagos infiltrantes, en relación a las citocinas que producen, pueden actuar como estimulantes o inhibidores de la producción de GC. Sumado a las acciones sistémicas, parácrinas y/o autócrinas de las citocinas sobre las adrenales, la zona interna de la corteza adrenal, expresa moléculas codificadas por MHC clase II y contiene linfocitos en contacto directo con las células productoras de esteroides (201). Debe destacarse que los linfocitos son capaces de activar las células productoras de andrógenos adrenales en una forma independiente de la secreción de citocinas, sugiriendo mecanismos de interacción inmunoendócrinos mediados directamente por la interacción célula-célula (200). Del mismo modo, los linfocitos infiltrantes producen sustancias ACTH similares que también pueden tener efectos reguladores de la secreción adrenal. Por tal motivo se postula que estas células desempeñarían un rol regulador mayor en la función adrenal en estados patológicos y asociados al envejecimiento ya que el infiltrado linfocitario se incrementa en ambas situaciones (200).

Dentro de las citocinas producidas por las células adrenocorticales se encuentran IL-1 e IL-6, las cuales son generadas en la zona reticular adrenal humana. Hasta la fecha se conoce que IL-1 tanto α como β , inducen la secreción de GC independientemente de ACTH. IL-2 por su parte también incrementa la secreción de GC. La IL-6 es capaz de aumentar la secreción de aldosterona, GC y sobre todo DHEA, sólo o en sinergismo con ACTH (200, 201, 203). Es factible que IL-6 se comporte como un factor local en la producción de C₁₉-esteroides. Más aún, dado que IL-6 se expresa en la zona reticular adrenal y estimula la secreción de DHEA, es probable que esta citocina se encuentre involucrada en funciones inmunes locales adrenales. Por otro lado, se

conoce que los niveles de IL-6 séricos se incrementan proporcionalmente con la edad, correlacionándose negativamente con los niveles de DHEA y DHEA-S. El TNF- α por su parte inhibe la liberación de aldosterona inducida por angiotensina II y por ACTH, así como la producción de GC basal y estimulada por ACTH (200, 203). El TGF- β 1 a su vez es un potente modulador de las funciones adrenocorticales: recientemente se ha demostrado un marcado efecto inhibitorio autócrino en diferentes niveles celulares (202). El efecto más marcado de esta citocina sobre las adrenales humanas tanto fetales como adultas parece ser la reducción en la producción de DHEA y DHEA-S (200, 202, 203).

Efectos fisiológicos de los glucocorticoides.

La función más importante de los GC es la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono y la adaptación del organismo a agentes generadores de estrés de mediana a larga duración. Seguidamente se resumen la vasta gama de efectos que estas hormonas son capaces de generar.

- ***Acciones estimulantes:***

1. Gluconeogénesis a partir de aminoácidos en el hígado
2. Captación hepática de aminoácidos circulantes
3. Transaminasas hepáticas
4. Síntesis proteica hepática
5. Lipólisis
6. Formación de cuerpos cetónicos
7. Filtración glomerular
8. Eritropoyesis y leucopoyesis
9. Secreción de HCl (ácido clorhídrico) y pepsina por el estómago
10. Acción vasoconstrictora de la noradrenalina
11. Elevación de la tensión arterial
12. Propiedades cardiotónicas
13. Resistencia al estrés

- ***Acciones inhibitorias:***

1. Captación de glucosa por las células: hiperglucemia
2. Metabolismo proteico del músculo, hueso y tejido linfático
3. Lipogénesis en tejido adiposo
4. Resorción tubular renal de agua
5. Eosinófilos, basófilos y linfocitos circulantes (gran efecto estabilizador de membranas)

6. Crecimiento del tejido linfático normal (timo, ganglios, bazo) y patológico (linfomas)
7. Síntesis de matriz ósea: osteoporosis
8. Respuesta inmunitaria: disminución de la producción de anticuerpos, reducción de linfoquinas
9. Respuesta inflamatoria y alérgica
10. Síntesis y secreción de CRH y ACTH hipofisaria

La dehidroepiandrosterona como antagonista natural de glucocorticoides.

Numerosos estudios han presentado a la DHEA como poseedora de actividades antiglucocorticoideas (180). Dentro de los ejemplos documentados se han demostrado efectos anti GC en: la proliferación linfocitaria (174), la involución tímica en ratones luego de lesión térmica (175), la actividad macrofágica (176), en la inducción de enzimas hepáticas (177), los efectos neurotóxicos de la dexametasona (177), la hipertensión inducida por GC (178).

En la actualidad no es conocido exactamente el mecanismo de acción antiglucocorticoidea; sin embargo, se postula que la reducción de GR mediada por DHEA podría ser un posible mecanismo (179).

Mecanismos básicos de la interacción de los esteroides corticales con las células blanco.

La mayoría de los efectos fisiológicos de los esteroides son mediados vía control transcripcional. De acuerdo a los conceptos clásicos, los esteroides se unen a receptores citoplasmáticos específicos formando de esta manera un complejo esteroide-receptor que se activa y es translocado al compartimento nuclear. Allí, el complejo se une a sitios específicos en el genoma. De esta manera, el receptor se comportaría como un factor de transcripción operado por el ligando (127).

Los receptores para esteroides se agrupan en una misma familia, dentro de la cual se encuentra el receptor para GC. La composición básica del receptor para esteroides es la siguiente:

- Una región N-terminal variable con funciones de transactivación génica ligando independiente.
- Un dominio ampliamente conservado de unión al ADN rico en cisteínas, que conforman una estructura de dedo de zinc.
- Una región bisagra intermedia que contiene señales de localización nuclear.
- Un dominio C-terminal relativamente conservado destinado a la unión con el esteroide (128).

A pesar de que muchos de estos receptores son residentes nucleares, el receptor de GC (GR) se encuentra también en el citosol formando un complejo con proteínas del choque térmico (HSP) HSP₉₀, HSP₇₀ y las inmunofilinas HSP₅₆ y CyP-40. Se asume que en ausencia del

esteroide, el sitio de unión al mismo se encuentra bloqueado por alguna de estas proteínas. En presencia del mismo, esta unión se disocia fijándose la hormona al receptor y posteriormente este complejo es traslocado al núcleo (128). Ya en el núcleo, el GR como homodímero, se fija a secuencias específicas de ADN (elementos de respuesta a glucocorticoides, GREs) donde puede actuar incrementando o inhibiendo la transcripción de los genes correspondientes. El GRE clásico es un elemento típicamente estimulador; sin embargo, se han descrito GREs negativos que suprimen la transcripción (128). Asimismo, se han descrito algunos GRE a los que se llamó “compuestos”, que presentan sitios de unión para otros factores de transcripción dentro de la misma región de unión para GR, que pueden presentar actividad estimulante o represora.

El complejo nuclear hormona / receptor inicia ciclos de fosforilación / defosforilación. El proceso de fosforilación basal es dependiente del ciclo celular, siendo máximo en G2/M y mínimo en S. Las consecuencias biológicas de este proceso son aún controvertidas. Si bien el estado de fosforilación no parece tener mayor impacto en la función, el significado biológico podría radicar en variaciones de la expresión del receptor y la transactivación de algunos genes blanco (128).

En el hombre se presentan dos isoformas de GR: α (o clásica) y β . Ambos comparten los primeros 727 aminoácidos, pero debido a un mecanismo de “splicing” alternativo del ARNm, los GR contienen residuos C-terminales codificados por los exones 9α o 9β respectivamente. En la isoforma β , los últimos 15 aminoácidos conforman una secuencia que lo torna incapáz de fijar GC y consecuentemente es transcripcionalmente inactivo. GR β puede unirse a GREs y la sobreexpresión de esta isoforma puede inhibir la transactivación de genes mediada por la isoforma α . Ambas isoformas son ampliamente expresadas en los mismos tejidos, lo cual permite especular que ambas podrían interactuar, quizás a través de la heterodimerización, para regular los efectos transcripcionales de los GC (128). Más aún, la expresión de GR β puede ser regulada por citocinas, de modo que en determinadas situaciones, el resultado del interjuego entre ambas isoformas podría tener consecuencias biológicas significativas.

Existe amplia documentación que confirma la interacción entre GR y otros factores transcripcionales, producto de la cual son modificadas sus actividades biológicas (128, 129). La primera de ellas fue documentada para el factor AP-1, donde se comprobó la interacción directa entre GR y este factor transcripcional. Ello permitió explicar en parte el efecto de cross-talk que se observaba y no podía ser explicado simplemente por el secuestro de estos factores en complejos inactivos (128). Otro factor nuclear que puede unirse a GR y modificar su actividad es NF- κ B (129). Para este último, se observó que los GC incrementan la transcripción y síntesis de I κ B, explicando de esta manera la inhibición de NF- κ B promoviendo la retención de este factor en el citosol (129). Dado que NF- κ B es un factor de transcripción que induce la expresión de muchos genes que participan en la respuesta inmune e inflamatoria y los GC son potentes antiinflamatorios e inmunosupresores, la interacción de ambos, aunque no totalmente

comprendida, parece ser un importante mecanismo, posiblemente primario, para lograr la homeostasis inmune.

En lo atinente a DHEA, el conocimiento de los mecanismos de acción e interacción a nivel molecular en la célula blanco es muy inferior hasta la fecha. Existen dos mecanismos de acción propuestos, ambos con efectos resultantes antiinflamatorios. El primero de ellos sería mediado a través de la activación del receptor para la proliferación de peroxisomas- α (PPAR- α) (172). La activación de este receptor conlleva, entre otros efectos, a la inhibición de la transferencia al núcleo de NF- κ B, a la disminución de la actividad de este factor y consecuentemente, a la disminución de la expresión de los genes regulados por NF- κ B. Como fuera expresado anteriormente, debido a que éste es un factor común de señalización para la inducción de citocinas pro y antiinflamatorias, la inhibición de su actividad intracelular es un importante paso antiinflamatorio. El segundo mecanismo postulado, sería mediado a través de la inhibición efectuada por DHEA de la interacción nuclear del factor AP-1 con el ADN (173).

1.f- Interacción Neuroinmunoendócrina.

Thomas Addison, documentó que en los pacientes insuficientes suprarrenales se observaba un exceso de linfocitos circulantes (73). Asimismo, la adrenalectomía en ratas se acompañaba de hipertrofia tímica (74). Más aún, en los primeros estudios realizados sobre estrés en diversas especies animales, se halló un marcado incremento de las glándulas adrenales acompañado de la involución tímica (72).

Los textos clásicos de endocrinología, definen a las hormonas como biomoléculas las cuales son producidas por un tipo especializado de células, y secretadas por una glándula sin conducto excretor, directamente al torrente circulatorio, y que actúan en un blanco distante (célula / tejido), con el fin de regular actividades celulares preexistentes. Como puede observarse, tal definición puede utilizarse también para definir citocinas. La diferencia entre ambas radicaría en que estas últimas desempeñarían funciones regulatorias en procesos tisulares localizados, mientras que las hormonas tendrían un rol predominantemente sistémico o comprometiendo la homeostasis de todo el organismo (72).

Se postuló el rol de los GC como controladores de la respuesta inmune / inflamatoria, y de esta manera, limitando la defensa del huésped frente al agresor, para así evitar los efectos deletéreos de la hiperactividad del sistema inmune (75). La situación inversa también es real; es decir, que la actividad del SI también promueve la secreción de GC (76). Se sugiere entonces la existencia de mecanismos de “feed-back” o retroalimentación regulatorios inmuno - endócrinos en los cuales células del SI, limitan su propia actividad a través de la secreción de moléculas que estimulan la secreción de GC. En este contexto, son las citocinas los principales mensajeros del SI en el cerebro.

En comparación con otros sistemas fisiológicos, el SI se caracteriza por una privilegiada autonomía; sin embargo, toda respuesta inmune (RI) que se desarrolle, se encuentra bajo un fino control neuroendócrino. Tal dependencia se hace obvia en la necesidad de controlar el alto gasto metabólico que subyace en el funcionamiento de las células del SI (48).

Hasta el momento se han planteado mecanismos de control unidireccional sobre diferentes funciones biológicas. Como puede comprenderse, ello no puede ser lo suficientemente eficiente para el control de un sistema que es dinámico por naturaleza; un sistema que se encuentra en permanente confrontación con antígenos endógenos y exógenos. Besedovsky y col. han postulado en numerosas publicaciones que las respuestas neuroendócrinas desencadenadas a partir de productos derivados del SI, son generadas luego de la activación del SI (51-57). Ello implica que el SNC recibe información del SI y responde a esas señales provenientes de la activación del mismo.

Los linfocitos tienen la capacidad de secretar ACTH, endorfinas, TSH y GH (77-79) y a su vez, estas hormonas pueden influenciar procesos inmunes (80-83). Los mismos también producen PRL y factor de crecimiento insulino símil (84).

Asimismo, se han observado varias citocinas con efectos estimulatorios directos sobre el eje HPA. Como ejemplo, se ha demostrado que IL-1 posee un rol endógeno crucial en la regulación del HPA frente a las infecciones virales (48). Se postula en estos estudios que las citocinas pueden actuar como CRH extrahipotalámicas liberadas en el tejido dañado. IL-1 se comporta como estimulante de la secreción de la mayoría de las hormonas bajo control neuroendócrino. Este efecto estimulatorio de IL-1 sobre el eje HPA parece ser específico, ya que no se encuentra aparejado a cambios en otras hormonas de estrés tales como STH, PRL, α -MSH y además, los niveles sanguíneos de catecolaminas tras la inyección de IL-1 presentan un leve incremento (50).

La respuesta a la ACTH depende tanto de la edad como del sexo (72). En general se ha encontrado que IL-1 β es la citocina que estimula con mayor potencia la liberación de ACTH (85-87). Asimismo, la concentración relativa de cada citocina es el mayor determinante de su influencia (72). Algunas de ellas pueden actuar sinérgicamente en la liberación de ACTH, como lo hace TNF- α junto con IL-1 β (88). Otras citocinas estimuladoras del eje que elevan las concentraciones plasmáticas de ACTH y / o cortisol son: IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN- α , β y γ .

En contraposición, otros mediadores actúan inhibiendo el eje HPA como por ejemplo IL-4, la cual suprime la expresión del ARNm de POMC (48, 72).

Las citocinas pueden optar por una vía humoral o neural para incidir sobre el SNC; existe evidencia que avala ambas posibilidades. Aquellas circulantes accederían al SNC a través de áreas con pobre desarrollo de la barrera hematoencefálica (BBB), tales como los órganos circunventriculares (49); o bien, podrían ser transportadas activamente. Otra posibilidad es que

dichas citocinas induzcan la producción de mediadores que atraviesen la barrera, o bien, que induzcan su propia producción o la de otros factores en la interfase endotelial entre el cerebro y la sangre.

Evidencias que respaldan el hecho que vías nerviosas median el efecto de citocinas en el SNC, derivan de estudios en animales en los cuales la vagotomía subdiafragmática conllevó a cambios en el comportamiento, fiebre y algunas de las repuestas neuroendócrinas inducidas por lipopolisacárido bacteriano (LPS) (48, 58-61).

En líneas generales, la bibliografía actual sugiere que la vía humoral hacia el SNC podría ser empleada por citocinas circulantes, mientras que la vía neural, parecería predominar cuando estos mediadores son liberados localmente en tejidos con inervación vagal (48).

Más aún, existe evidencia de la producción local de citocinas por células cerebrales, así como de la expresión de receptores para las mismas en SNC. Se han identificado en cerebro receptores, o el correspondiente ARNm, de IL-1 α y β (62-64), IL-2 (65), IL-4 (66), IL-6 (67), TNF- α (68), INF- γ (69), M-SCF y SCF (70).

Numerosos estudios han reportado que tras el estímulo periférico de células del SI, se induce la expresión de citocinas en el cerebro. El patrón particular de expresión regional observado en el hipotálamo e hipocampo sugiere que durante la activación del SI, citocinas originadas en el SNC podrían afectar mecanismos neuroendócrinos controlados en estas áreas (48).

En condiciones basales, la liberación de bajas cantidades de citocinas por células cerebrales, podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales es controlada la actividad de las neuronas intervinientes en la regulación de funciones adaptativas integradas a nivel del hipotálamo y sistema límbico. En condiciones en las cuales se presentan cambios en la actividad del SI, citocinas periféricas, al igual que otros mediadores, actuarían como gatillos de una respuesta neuroendócrina inicial, producto de la estimulación de células del SI. La rápida respuesta neuroendócrina que se observa tras la administración periférica de ciertas citocinas, indica que esta respuesta inicial no involucra la síntesis de novo de citocinas en el cerebro. Sin embargo, mediadores inmunes periféricos y la activación de neuronas durante esta respuesta inicial, desencadenan un incremento en la expresión de citocinas en el cerebro. Esta confluencia de señales podría contribuir al establecimiento de un patrón definido de expresión central de citocinas durante el desarrollo de una respuesta inmune determinada (48). Besedovsky y colaboradores, han propuesto que el SI se comporta como un órgano sensorial periférico que informa al SNC acerca del tipo de respuesta inmune en operación (48).

Regulación Neuroendócrina de la función macrofágica.

Los fagocitos mononucleares derivan de células progenitoras de la serie mieloide. Ingresan al torrente circulatorio como monocitos, los cuales en su residencia tisular, maduran hacia macrófagos. El macrófago no sólo desempeña su tradicional rol como célula encargada de eliminar detritos celulares, partículas extrañas, bacterias; sino que desempeña una función imprescindible en el SI y en la resistencia a diversos patógenos.

Son importantes células fagocíticas que pueden controlar el crecimiento de diversos microorganismos. Como se mencionara anteriormente, tras la fagocitosis se produce el estallido respiratorio y la producción de metabolitos reactivos del oxígeno y peróxido de hidrógeno, armas esenciales para la actividad antimicrobiana de estas células (89,90). Los microorganismos destruidos son digeridos por enzimas contenidas en los fagolisosomas y determinados péptidos, asociados a antígenos de clase II, presentados en superficie. Este tipo de presentación es la base del reconocimiento antigénico por células T helper CD4⁺.

La interacción del macrófago con microorganismos y células T, induce a la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α por parte del macrófago (91); influyendo estas no sólo la actividad de este último sino también en la de linfocitos T. La producción de IFN- γ por linfocitos T estimulados por un antígeno y células NK, derivan en la activación del macrófago. De esta activación resulta una incrementada capacidad citotóxica, incluyendo la producción de metabolitos reactivos del oxígeno; lo cual permite controlar gran cantidad de patógenos intracelulares dentro de los que se encuentran las micobacterias (92).

La susceptibilidad del hombre a la infección micobacteriana es determinada en parte genéticamente (93-95); pero a su vez se encuentra estrechamente influenciada por factores socioeconómicos como pobreza, malnutrición y etilismo y, factores asociados al envejecimiento y estrés. Una de las primeras evidencias que mostraron a los eventos estresantes como influyentes en la patogénesis de la TB fue reportada por Ishigami en 1919 (96). En la actualidad es ampliamente aceptado que tanto el estrés físico como psicológico pueden modular la susceptibilidad de padecer TB (97,98), y del mismo modo, la función inmunológica en general (99-102).

Las respuestas fisiológicas a diversos agentes estresantes son mediadas por el sistema nervioso simpático (SNS) y el eje HPA (103-105). La activación del SNS resulta en la producción de adrenalina por la médula adrenal y la liberación de noradrenalina a partir de las neuronas simpáticas que inervan los órganos linfoides secundarios (106). Es así que el SNS puede afectar directamente la función inmune a través de receptores adrenérgicos, los cuales han sido localizados en macrófagos (107,108), células T (109), así como en otras células del SI (110).

Las catecolaminas alteran varias de las funciones macrofágicas, entre ellas la producción de citocinas (111), la actividad antiviral (112) y la motilidad citoplasmática a través de cambios en las concentraciones de AMPc (113).

Por su parte, el eje HPA, regula la función macrofágica a través de la producción de una cascada de hormonas en respuesta a estímulos que culminan en un incremento de la producción de glucocorticoides por parte de la corteza suprarrenal. Los efectos de los GC son producidos, como fuera mencionado previamente, cuando éstos se fijan a su receptor citoplasmático. Ello resulta en la internalización del complejo GC-receptor y la subsecuente translocación al núcleo. Este complejo se fija entonces a elementos reguladores asociados con determinados genes, los cuales son transcritos (114). Las células mononucleares son una de las primeras células blanco estudiadas, debido a que éstas poseen receptores de alta afinidad para GC (115-117). Diversos elementos de la respuesta inmune celular son modificados por la acción de GC. Como ejemplo, éstos inhiben tanto el procesamiento como la presentación de antígenos asociados a moléculas MHC clase II en macrófagos (118). Por otro lado, la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos activados, dentro de las que se encuentran IL-1, IL-6 y TNF- α , es del mismo modo inhibida por acción de GC (119-121).

No sólo los GC afectan funcionalmente al SI, sino que la mayoría de las hormonas que se encuentran bajo control hipotalámico son capaces de modular la RI frente a un determinado patógeno. Se ha postulado que estrógenos, progesterona, testosterona y otros andrógenos influyen profundamente la respuesta inmune del huésped a través de la regulación de la función macrofágica en la misma. Los efectos de los estrógenos sobre las células inmunes son muy heterogéneos: en general, dosis fisiológicas bajas se comportan como estimulantes mientras que dosis altas son inhibitoras de la respuesta celular y humoral. La diferenciación de linfocitos B (LB) es estimulada por dosis fisiológicas de estrógenos gracias a la inhibición de células T supresoras mientras que la proliferación B no es afectada. Respecto de su efecto sobre los macrófagos, se ha observado que esta hormona incrementa la capacidad fagocítica de las mismas. En modelos animales los estrógenos aumentan la producción de IgM de forma dosis dependiente; sobre linfocitos T humanos y estimulan la expresión génica de IL-3, IL-5 e IL-2. En contraposición, dosis farmacológicas de estrógenos inhiben la proliferación linfocitaria (204). La testosterona por su parte tiene de igual manera efectos estimulantes y supresores de la RI. En niveles fisiológicos puede tener efectos inmunosupresores debido al aumento de la actividad T supresora o bien inmunoestimuladores, debido al incremento en la producción de IL-2, IL-3 e IL-5 que promueven el desarrollo de LB, LT y eosinófilos (204).

Con respecto a los neutrófilos, la magnitud del efecto que los GC ejercen sobre la migración y activación no ha sido aún aclarada. En líneas generales, los GC promueven la sobrevida neutrofílica. Más aún, las catecolaminas parecen actuar conjuntamente con los GC; éstas generan neutrofilia y los últimos favorecen la sobrevida de estos leucocitos inhibiendo mecanismos apoptóticos (122,123). El efecto antiinflamatorio de los esteroides podría ser el resultado de la inhibición de la acumulación de neutrófilos en los sitios de inflamación (124). El mecanismo podría involucrar la regulación en menos de L-selectinas y CD18 (125).

Efecto bidireccional del estrés y los glucocorticoides en las funciones inmunes.

La palabra *estrés* se define como una constelación de eventos que comienzan con un estímulo (factor estresante), el cual precipita una respuesta cerebral (percepción de estrés), que genera la activación de sistemas fisiológicos destinados a controlar dicho factor (respuesta al estrés) (130). Asimismo, se define *estrés agudo* a aquél que genera un incremento en los parámetros que definen la respuesta de estrés en rangos fisiológicos por un período de minutos a horas. Mientras que *estrés crónico* es aquél que persiste varias horas, días o meses. La magnitud del estrés es resultado de la combinación de su intensidad, duración y frecuencia (130). Un marcador importante de los efectos deletéreos del estrés crónico puede ser la ruptura del ritmo circadiano del cortisol (131).

Los GC desarrollan diferentes efectos sobre distintas células del sistema inmune y pueden influir en el balance Th1-Th2. Una variación oscilante entre 10 y 15 veces los valores de GC séricos, conllevan a una variación de la misma magnitud en la cantidad de LB activados. Ello provee clara evidencia que los GC endógenos afectan la actividad del SI e indica que mecanismos endócrinos fisiológicos restringen la autonomía del SI. Existiría un control tónico del SI por parte del eje HPA. Sin embargo, la regulación de sistemas fisiológicos implica interrelaciones dinámicas entre variables fisiológicas y sistemas reguladores. Enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunes se acompañan de la activación del eje HPA. Este efecto puede ser causado directamente por el agente infeccioso, células neoplásicas y/o sus productos o bien, a través del daño tisular que ellos pueden mediar. La estimulación del eje durante una RI, se traduce en un incremento de los niveles de GC que son suficientes para inhibir la RI frente a un determinado antígeno. Asimismo, esta activación del eje es sobre todo relevante como mecanismo regulador de la RI. En particular, incrementos en los niveles de GC, contribuyen al control de la producción de citocinas y a la limitación de la expansión de clones no específicos o de baja afinidad para el antígeno que desencadenara la RI en marcha. La IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ estimulan el eje, siendo IL-1 la más potente. Asimismo la IL-2, IL-11 e IL-12 también tienen esta capacidad. Tal redundancia en el efecto estimulante del eje por parte de citocinas explica la relevancia biológica de las interacciones entre el eje HPA y el SI (205).

El incremento en los niveles de GC durante una RI es un fenómeno tardío. Por ello es esperable que no interfieran significativamente en la presentación del antígeno, expansión clonal de linfocitos activados o en la producción de citocinas inmunoregulatoras. Así, la función reguladora del eje HPA sobre el SI se ejercería tratando de prevenir respuestas inapropiadas, una excesiva expansión y actividad de células inmunes así como la producción en demasía de citocinas que resultarían en el perjuicio del huésped así como se produce en enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Cabe destacar que fisiológicamente el eje HPA se activa durante

cortos tiempos y en forma aguda para lograr un control rápido de la RI. Para procesos crónicos, la activación del mismo, resultaría en un detrimento de la respuesta inmune y en una facilitación de la cronicidad de la patología (205).

En líneas generales, se han atribuido a los GC acciones predominantemente inmunosupresoras. Se ha comprobado que tras un estímulo que genera una potente estimulación del eje HPA, la producción de cortisol endógeno puede ascender a 120-240 mg de cortisol / día, lo cual equivale a 30-60 mg de prednisolona diarios (179). Esta cantidad de cortisol adrenal normalmente conduce a una fuerte inhibición de la actividad inflamatoria ya que 60 mg de prednisolona es una dosis muy adecuada para el inicio del tratamiento de variadas enfermedades inflamatorias. Sin embargo, se han reportado asimismo efectos beneficiosos del estrés y de las hormonas de estrés en la preparación del SI para afrontar al agente estresante.

Así, el estrés y hormonas de estrés generan cambios en la distribución leucocitaria corporal. La explicación a este fenómeno se halla en la necesidad de localización de los mismos en el sitio y momento apropiados para responder al desafío inmune que podría representar el agente inductor de estrés (132-134).

Numerosos estudios han mostrado, como se mencionara anteriormente, cambios significativos en los valores absolutos y relativos de leucocitos sanguíneos: el incremento de GC plasmático inducido por estrés genera la disminución del número y porcentaje de linfocitos y un incremento en el número y porcentaje de neutrófilos sanguíneos (130). Más aún, estos cambios han sido reportados dentro de los 30 minutos de iniciado el estrés. Cesado el estrés, este efecto es rápidamente revertido, retornando los leucocitos a sus valores normales dentro de las 3 horas (132). En aparente contraste con los GC, las catecolaminas generan un incremento en el número de leucocitos sanguíneos en humanos (135). Es así que el número y constitución de las subpoblaciones sanguíneas puede estar significativamente afectado por las concentraciones plasmáticas de adrenalina, noradrenalina y GC (130).

Fleshner y col. (136) han demostrado que el estrés agudo genera un incremento en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y una disminución de linfocitos CD8⁺ en ganglios mesentéricos, y ello podría estar vinculado a cambios en la producción de anticuerpos en los ganglios linfáticos afectados. Los GC inducen la acumulación de linfocitos en sitios mucosos (137) y la piel (130).

En base a lo planteado, se ha propuesto que el estrés agudo induce un incremento inicial, seguido de una disminución del número de leucocitos sanguíneos. Las condiciones de estrés que generan una temprana liberación de catecolaminas, por activación del SNS, serían las responsables del incremento inicial. Éste sería entonces el patrón inicial de la respuesta de estrés, estrés de muy corta duración, estrés psicológico moderado o el ejercicio. En contraposición, condiciones estresantes que se prolonguen en el tiempo y resulten en la activación del eje HPA, inducen una disminución de los leucocitos sanguíneos mediado por GC (130).

Estos cambios en la distribución de los leucocitos corporales, pueden ser atribuidos a modificaciones en la expresión o afinidad de moléculas de adhesión tanto en la superficie leucocitaria como endotelial. Así, tras la exposición a GC inducidos por una respuesta de estrés, poblaciones leucocitarias específicas podrían ser selectivamente retenidas en determinados compartimientos que expresen moléculas de adhesión inducidas por GC (132).

En general, la respuesta aguda al estrés ha sido interpretada como inmunoestimulante, mientras que la respuesta crónica parece ser predominantemente inmunosupresora (131).

Dentro de los efectos inmunoestimulantes de GC, se ha reportado el incremento de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) cutánea tras el estrés agudo, tanto durante la sensibilización como durante el desafío antigénico (138). En lo que respecta a la inmunidad humoral, otros estudios han reportado asimismo un incremento en la respuesta de anticuerpos. Se ha propuesto que los GC favorecerían una respuesta predominantemente humoral (139-141).

Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, los GC no sólo favorecen la respuesta humoral sino que han mostrado actuar como facilitadores de la activación de LT. Durante etapas tempranas de la activación T, niveles bajos de GC aumentan intensamente la respuesta proliferativa (149). Asimismo, existe evidencia que indica que los GC pueden actuar en forma sinérgica con citocinas potenciando reacciones inmunes específicas (130). Recientemente se ha reportado que estos esteroides facilitan la acción del factor de transcripción Stat5, vía interacción directa proteína - proteína entre el GR activado y Stat5 (150).

En lo referente a acciones inmunosupresoras inducidas por estrés, se ha mostrado que el estrés crónico disminuye la inmunidad celular, reflejado ello en la disminución de la DTH cutánea (130). Se postula que el descenso en la movilización de leucocitos sanguíneos hacia otros compartimientos corporales podría ser uno de los factores responsables de este efecto (142). Asimismo, el estrés crónico genera una disminución en la producción de anticuerpos (143, 144), la actividad de las células NK (145,146), la proliferación leucocitaria (147) y la actividad antimicrobiana de macrófagos (148) entre otros.

En base a lo planteado se ha propuesto que los GC endógenos desplegarían un importante rol fisiológico en el control de una respuesta inmune en marcha, que podría eventualmente alcanzar niveles capaces de causar daño al huésped.

Tanto en procesos agudos como crónicos se producen tras la activación del eje HPA, alteraciones en la secreción de la mayoría de las hormonas hipofisarias mediadas en gran parte por citocinas proinflamatorias y consecuentemente alteraciones en los restantes ejes controlados por hipotálamo e hipófisis (206). Estas modificaciones producidas en el perfil neuroendócrino también son capaces de modular la RI frente a un determinado patógeno. Se postula que tal modulación de la respuesta inmune no sería efectuada directamente por estas hormonas hipofisarias o gonadales, sino indirectamente a través de la modulación de la respuesta al estrés (206, 207). Esta aseveración se basa en el hecho que sólo en casos puntuales ha sido posible

adjudicar un rol inmunomodulador a estas hormonas (206). PRL, GH y Factor de Crecimiento insulino símil - I (IGF-I) por ejemplo, se comportan como inmunoestimuladoras y modulan la RI contrarrestando los efectos inmunosupresores de GC (206, 207). Las hormonas tiroideas por su parte intervienen como factores obligados en la linfopoyesis B primaria (208). En cuanto a las hormonas sexuales, los estrógenos como estradiol (E_2) favorecen las respuestas del tipo humoral y actúan como reguladores negativos de la linfopoyesis (208, 198); testosterona por su parte, puede tener efectos tanto estimuladores como inhibidores de la respuesta inmune en función de la concentración e influye profundamente la respuesta inmune a través de la regulación de la función macrofágica (198).

En cuanto al eje gonadal, tras la respuesta aguda a un estímulo, se produce la inhibición del mismo (205, 206). De igual modo, se ha reportado para modelos de estrés agudo y en enfermedades de importante compromiso sistémico, que paralelamente a la disminución de andrógenos adrenales, también se produce un descenso en los niveles plasmáticos de testosterona (198). La testosterona, DHEA, androstenediol y dihidrotestosterona suprimen la actividad del gen promotor de IL-6 (199) y la primera suprime la respuesta del eje HPA a esta interleucocina (198).

En cuanto a estradiol, esta hormona es uno de los principales estimulantes junto con IL-6 de la secreción de PRL (209, 210). Asimismo, favorece la secreción de IL-6, IL-1, IL-5, IL-10, IFN- γ , estimula la sobrevivencia de linfocitos B y la producción de anticuerpos, suprime la proliferación y función de células T a través de la supresión de IL-2 y consecuentemente favorece un perfil de respuesta tipo Th2 (204, 209).

La activación del eje HPA conlleva a una inadecuada secreción de hormonas adrenales en enfermedades inflamatorias.

Como fuera detallado anteriormente, un estímulo adecuado es capaz de activar el eje HPA, derivando ello en la secreción de ACTH y cortisol. Además de la inducción de cortisol, es importante recordar que los niveles séricos de otras hormonas adrenales tales como la DHEA y androstenediona también se incrementan tras el estímulo con ACTH. De esta manera, no es sólo el cortisol sino también otros esteroides adrenales los que son secretados luego de un estímulo inflamatorio de corta duración.

Cuando la activación del eje se sostiene en el tiempo en presencia de un factor estresante crónico como es el caso de enfermedades inflamatorias crónicas, en contraposición a lo que ocurre con los niveles de cortisol, los niveles de andrógenos adrenales se ven marcadamente disminuidos (179). Más aún, esta reducción de los andrógenos adrenales, depende en parte del grado de inflamación (181, 182). De esta manera, si el estímulo proinflamatorio como por ejemplo, niveles elevados de TNF, se mantiene durante el curso de enfermedades crónicas inflamatorias

(179), la respuesta de “feed-back” inhibitoria se vuelve inadecuada: la reducción de la secreción hormonal es mucho más marcada para precursores de hormonas sexuales en comparación con la secreción esencial de cortisol. Al disminuir estos andrógenos tanto adrenales como gonadales se favorecería la permanencia de un estímulo crónico del eje HPA mediado por citocinas proinflamatorias como IL-6, conduciendo ello a un incremento sostenido en los niveles de cortisol (199).

Así, se observa un marcado incremento de la relación cortisol / DHEA plasmática (179). Este cambio en el dominio de la vía bioquímica hacia la síntesis de cortisol puede ser un factor necesario para la supervivencia durante una enfermedad severa. Desde la perspectiva de la supervivencia y homeostasis, no cabe duda de la relevancia del cortisol sobre los andrógenos adrenales. Frente a tal situación, todo el esfuerzo es derivado hacia el mantenimiento de la secreción de cortisol y la consecuente reducción de otros esteroides. Curiosamente, un sesgo similar hacia la producción de cortisol respecto de andrógenos adrenales, ocurre durante el envejecimiento (183). Se puede especular que la alteración de las vías neuroinmunoendócrinas durante el envejecimiento podría ser un estado de adaptación a la acumulación de estímulos inflamatorios crónicos.

Dentro de la vía de síntesis de esteroides adrenales, parece ser que durante procesos inflamatorios o envejecimiento, la primera reacción en la reacción enzimática de dos tiempos realizada por la P450c17 (de 17α -hidroxilación de pregnenolona / progesterona) no se encuentra alterada o bien, levemente aumentada. En contraposición, el segundo paso de esta reacción enzimática sí se encuentra modificado en ambas situaciones mencionadas. La actividad de la enzima P450c17 depende de la presencia de NADPH y de citocromo b5. La actividad de la 17,20-liasa de esta reacción enzimática de dos tiempos depende de la fosforilación de serina o treonina de la P450c17, lo cual probablemente conduce a una mayor afinidad de ésta por el complejo oxidoreductasa/citocromo b5 (179). Esta fosforilación depende de los niveles de AMPc intracelular, los cuales pueden ser modificados por procesos inflamatorios o el envejecimiento. Otro mecanismo que justifique este cambio en la síntesis de esteroides puede ser la disminución de NADPH y citocromo b5 en las células adrenales durante los procesos inflamatorios o el envejecimiento. Más aún, ha sido demostrado en repetidas oportunidades que citocinas proinflamatorias tales como IL- 1β , TNF e INF- γ inhiben la 17,20-liasa en células adrenocorticales (184,179). De este modo, frente a la baja actividad de la reductasa NADPH P450 y de citocromo b5, la 17α -hidroxilación es la reacción predominante y consecuentemente la producción de cortisol; mientras que frente a niveles más altos de actividad de estos cofactores, tanto la generación de cortisol como la de andrógenos adrenales es posible. De esta manera se puede explicar el marcado descenso de androstenediona y DHEA que se presentan en procesos inflamatorios, debido a la inhibición de la 17,20-liasa. Éste podría ser el paso crucial que justifica los niveles significativamente menores de hormonas sexuales en relación al cortisol (179).

Como se planteaba anteriormente en el apartado que explica los mecanismos de acción de DHEA, ésta interviene en la regulación de factores transcripcionales. El interrogante surge a partir del posible rol inmunomodulador de esta hormona. Así, los descensos en los niveles de DHEA pueden conducir a un estado más proinflamatorio en el huésped. DHEA se comporta como inhibidor en la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF (185, 186). Inhibe la generación de radicales derivados del oxígeno y consecuentemente el daño tisular (187,188). Los niveles séricos de DHEA se correlacionan negativamente con la IL-6 en humanos y además DHEA inhibe la producción de IL-6 por diferentes tipos celulares *in vivo* (189,190). Más aún, inhibe la producción por parte de linfocitos Th2 de las citocinas IL-4 (191,161) e IL-10 (179).

DHEA es transformada en testosterona y estrógenos en células periféricas tales como los macrófagos (192), de modo que estas hormonas pueden ser secretadas a nivel local e influir sobre el proceso inflamatorio. Al respecto, se conoce que los estrógenos pueden inhibir la producción de TNF, IL-2 e IL-6 y estimular la producción de inmunoglobulinas. Por otro lado, la testosterona generada a partir de DHEA en la periferia inhibe la producción de IL-6 y la síntesis de inmunoglobulinas (179).

Así, la conversión de DHEA en androstenediona, de androstenediona a testosterona y de testosterona a 17 β -estradiol es influenciada por citocinas a nivel local (193). De esta manera, la concentración de estas hormonas en el microambiente depende de la situación inflamatoria local.

En relación a lo planteado en este apartado, puede concluirse que la disminución de los andrógenos adrenales conlleva a una reducción en la periferia de hormonas sexuales. Esto es particularmente importante en mujeres posmenopáusicas y varones ancianos debido a la disminución fisiológica de los esteroides gonadales. Asimismo, la caída de los niveles de DHEA durante procesos inflamatorios crónicos sería un hecho perjudicial debido a que ello se acompaña de un importante descenso en el poder antiinflamatorio-antiglucoicorticoideo aportado por este andrógeno adrenal, así como de los niveles de hormonas sexuales en la periferia, que como se planteaba, también intervienen en la modulación de la RI.

Integración de las interacciones Inmunoneuroendócrinas en el contexto de la Tuberculosis pulmonar. Objetivos del estudio.

Se desprende de esta introducción la gran cantidad de interacciones existentes entre el sistema inmune y el neuroendócrino, y con ello la complejidad y dificultad para poder dilucidar mecanismos directos de causa-efecto. Por otro lado, resaltar el fino control que debe gobernar ambos sistemas.

En el desarrollo de la TB, se ha reportado reiteradamente la correlación existente entre el tipo de respuesta inmune que desarrolla el huésped y la severidad de la TB pulmonar (151, 152). Si bien los factores por los cuales se produce un cambio en el patrón de citocinas de acuerdo a la severidad de la TB pulmonar no están aún aclarados, es razonable pensar que ello sea el resultado de influencias intrínsecas del sistema inmune como así también de efectos regulatorios relacionados con el sistema neuroendócrino. Para la primera posibilidad, resultados previos de nuestro grupo de trabajo (151, 152) mostraron que enfermos con TB leve o moderada presentaban niveles séricos más altos de IFN- γ e IL-2, mientras que aquellos con enfermedad avanzada denotaban concentraciones significativamente superiores de IL-4 e IL-10. Asimismo, en los estudios *in vitro* los pacientes severos presentaron mayor producción de IL-4 y al mismo tiempo una síntesis elevada de TGF- β lo cual puede favorecer el desarrollo de respuestas Th2. Más allá de estos hechos, se debe tener en cuenta que las citocinas inmunorregulatorias, como por ejemplo IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ , no sólo ejercen un efecto directo sobre las células inmunológicas, sino que también pueden influenciar la actividad de células inmunocompetentes a través de su reconocida capacidad de estimular el eje HPA y otras funciones endócrinas. Es por esto que en un contexto más integrador se debe considerar que las citocinas liberadas durante la respuesta inmune también pueden inducir una respuesta endócrina inmunoregulatoria (1, 51). Como fuera mencionado anteriormente, se ha demostrado que ciertas hormonas son capaces afectar el tipo de respuesta inmune generada tras la exposición a un antígeno y por ende a los agentes patógenos. Dentro de éste marco, como se mencionara recientemente los GC pueden promover a las células T para la adquisición de un perfil de citocinas del tipo Th2 (153, 154), a la vez que pueden facilitar la actividad Th2 y actuar sinérgicamente con este tipo de citocinas (155, 156). En contraposición a estos hallazgos también se ha observado que el andrógeno suprarrenal DHEA, es capaz de promover la producción de citocinas Th1 (157, 158) e interferir en la síntesis de mediadores Th2 (158, 159).

A nivel experimental también se ha constatado que la DHEA puede revertir la susceptibilidad a las infecciones que provoca la administración de prednisona a ratones Balb/c (160).

Trabajos recientes en la misma cepa de ratones con TB experimental demuestran que la administración de DHEA y un derivado de dicho esteroide desempeñan efectos beneficiosos sobre el curso de la micobacteriosis (161).

En lo que respecta al campo de la patología humana existen algunos trabajos donde una caída en la relación entre DHEA y cortisol se asocia con una mayor severidad de la TB (162). Por su parte, el bacilo de la TB es capaz de producir un factor que incrementa la actividad del TNF- α e inhibe la acción adrenal de la ACTH (163), lo cual podría modificar la relación DHEA / cortisol producida por la suprarrenal y en consecuencia regular la maduración de las células T (164).

Otras hormonas que podrían influenciar la respuesta inmunológica al MTB son la PRL y GH. Diversas células inmunológicas presentan en su superficie receptores para estas hormonas. Los mismos pertenecen a la familia de citocinas-hormonas que incluyen los receptores para IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-6 e IL-7 (165). Estas citocinas junto con la PRL y la GH comparten mensajeros intracelulares y factores de transcripción, lo cual sugiere interacciones a este nivel (166). Es de destacar asimismo que la PRL y la GH restablecen las funciones inmunológicas en animales hipofisectomizados (167). La PRL induce la expresión del receptor para la IL-2 y estimula la síntesis de IFN- γ , lo que implica que puede favorecer una respuesta Th1 (168-170). La GH estimula la generación de linfocitos citotóxicos y la activación de monocitos humanos con MTB, y la inmunidad natural en términos generales (166, 167). A su vez, como se mencionó previamente, diversas citocinas afectarían la liberación de estas hormonas (51).

Este intrincado panorama de interrelaciones que plantean los estudios experimentales indica claramente la necesidad de explorar la eventual asociación que pueda existir entre la síntesis de citocinas esenciales en la inmunidad hacia patógenos intracelulares, con los desbalances que se suceden en la instalación de la enfermedad y el perfil de hormonas potencialmente inmunomoduladoras. La hipótesis que fundamenta dicha propuesta es que los mecanismos neuroendócrinos juegan un rol importante en el control y balance de citocinas producidas por las células Th1 y Th2 y por ende, del componente inflamatorio que caracteriza a la enfermedad. Dichos efectos endocrinológicos tendrían relevancia fisiopatológica, ya que influirían en el control del tipo y efectividad de la respuesta inmune al MTB. Como contraparte, además de afectar directamente a las células inmunológicas, las citocinas más arriba mencionadas son capaces de mediar respuestas neuroendócrinas en el huésped.

Con el fin de evaluar esta hipótesis **en primer lugar** se analizó el efecto de las hormonas cortisol y DHEA sobre la respuesta de células periféricas mononucleares (CPM) obtenidas de pacientes en distintos estadios de la enfermedad y re-estimuladas *in vitro* con el sonicado total de MTB. Con el fin de contribuir al conocimiento acerca del rol de estas hormonas sobre la modulación de la RI específica, fueron consideradas tanto los efectos sobre la producción de citocinas en los sobrenadantes de cultivos como sobre la proliferación celular.

En segundo lugar, se procedió a estudiar, el patrón de citocinas representativas de respuestas del tipo Th1, Th2 y proinflamatorias plasmáticas así como el perfil endócrino de individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad. Para caracterizar este último perfil,

se determinaron de los niveles plasmáticos de hormonas tanto hipotálamo-pituitarias como aquellas correspondientes a los ejes adrenal, tiroideo y gonadal.

En tercer lugar, y a efectos de estudiar la eventual influencia de mediadores de la RI sobre la regulación intraadrenal de la secreción esteroidea, se determinó la capacidad de sobrenadantes de cultivo provenientes de CPM de individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad, Basales y estimulados con MTB, para inducir o inhibir la biosíntesis de esteroides en la línea celular adrenal humana H295-R.

2- MATERIALES Y MÉTODOS.

2.a- Grupos de estudio.

Pacientes.

La muestra de pacientes, compuesta por 37 individuos, se seleccionó entre los enfermos que asistieron a la Sala II de Neumonología del Policlínico Carrasco de la ciudad de Rosario. En todos los casos, el diagnóstico de TB se realizó en base a criterios clínicos y radiológicos, acompañado ello de la identificación de BAAR en el esputo. Los individuos se encontraban, en función a la severidad de su enfermedad, internados o bien fueron citados oportunamente por el profesional médico tratante. El grado de compromiso pulmonar y consecuentemente la severidad de la enfermedad, se estableció según la extensión y tipo de lesión radiológica. Considerando estos parámetros radiológicos, los enfermos se agruparon de la siguiente forma:

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

Controles.

La muestra control se conformó de 22 voluntarios sanos similares en sexo, edad y grupo social sin contacto con pacientes TB.

Criterios de Exclusión.

Tales criterios fueron:

1. Co - infección con el virus de HIV.
2. Inicio de tratamiento quimioterápico antituberculoso.
3. Presencia de patologías con compromiso directo de la glándula suprarrenal por el bacilo tuberculoso (Enfermedad de Addison) u otras causas menos frecuentes.
4. Presencia de patologías que involucraran los ejes hipotálamo-hipófiso-tiroideo y gonadal.
5. Embarazo.
6. Edad menor a 18 años.
7. Padecimiento de patologías sistémicas o localizadas que requirieran el tratamiento con drogas corticosteroideas, inmunosupresoras o inmunomoduladoras.

Toma de Muestra.

Tanto los pacientes como los controles concedieron su consentimiento informado para participar del estudio, tras el cual se les practicó una punción venosa a nivel del pliegue del codo para la extracción de una muestra de sangre de 50 ml. La misma fue realizada antes de las 8:00 am para evitar el pico glucocorticoideo y en condiciones de reposo de al menos 15 minutos.

La sangre extraída en condiciones de esterilidad en tubos de 50 ml (Corning) fue anticoagulada con EDTA (hemograma GT Lab) en una proporción de 100 μ l cada 10 ml de sangre. La muestra así obtenida se conservó a temperatura ambiente para ser procesada en un tiempo no mayor al de una hora.

Dado que para los voluntarios sanos y para aquellos enfermos que en el momento de la extracción no estaban internados no se contaba con los resultados del laboratorio bioquímico, se separó parte de la sangre extraída para tal fin. Se consideraron valores de hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos totales y fórmula leucocitaria, glicemia, uremia, proteínas totales y velocidad de eritrosedimentación (VES).

Asimismo se interrogó a todos los individuos intervinientes en el estudio sobre antecedentes de alcoholismo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica vinculada al tabaquismo, consumo de anticonceptivos orales y padecimiento de otras patologías o consumo de medicamentos.

Se consideró el peso y altura de los individuos intervinientes, con los que se calculó el Índice de Masa Corporal ($BMI = \text{peso} / \text{altura en metros al cuadrado}$). Es necesario destacar que también se recabó información acerca de otros signos inherentes a la TB como son la presencia de síndrome de impregnación bacilar y los valores de la frecuencia respiratoria y cardíaca. Estos dos últimos parámetros también fueron considerados para la población control.

2.b- Estudios de linfoproliferación y efectos de GC y DHEA *in vitro*. Obtención de sobrenadantes para los estudios *in vitro* con la línea H295-R.

Separación de plasma y aislamiento de las células mononucleares.

Las muestras anticoaguladas se centrifugaron a 8°C (400 g) durante 15 minutos para proceder a la separación de plasma. De cada muestra se apartaron alrededor de 9 ml del mismo, los cuales fueron tratados con aprotinina (Trasylo[®], Bayer) en una proporción de 100 U/ml de plasma. La aprotinina es un inhibidor de las serina-proteasas utilizado para preservar la unión de hormonas a sus proteínas transportadoras. Las muestras de plasma así tratadas se fraccionaron y congelaron a -20°C hasta su utilización.

Posteriormente se recuperó la fracción de glóbulos blancos, la cual fue resuspendida en igual volumen de medio de cultivo (MC) RPMI 1640 (PAA) adicionado con concentraciones estándar de L-glutamina, penicilina-estreptomicina (PAA, 500 μ l / 100 ml de MC) y 10% de pool de sueros AB normales (PAA) inactivado por calor (medio de cultivo completo: MCC). A partir de esta suspensión celular se aislaron las CPM a través de un gradiente de Ficoll – Triyosom (densidad 1.070) centrifugando durante 30 minutos a 300 g. Las células mononucleares se retiraron de la interfase y resuspendieron en igual volumen de MCC. Luego de 3 lavados, se resuspendieron finalmente en 2 ml de MCC. La concentración y viabilidad celular fueron determinadas por el método de exclusión con azul Tripán.

Estudios de linfoproliferación.

Para los ensayos de linfoproliferación, las CPM aisladas se llevaron a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se sembraron 100 μ l de la suspensión celular en placas de 96 pozos (Costar) (2×10^5 células/pozo), las cuales se cultivaron por triplicado con los siguientes tratamientos:

1. Basal: MCC 100 μ l
2. Tso: sonicado total de *M. Tuberculosis* (10 μ g/ml) 50 μ l + 50 μ l MCC
3. Con A: Concanavalina A 50 μ l + 50 μ l MCC
4. Ol: Alcohol (0,04% en MCC) 50 μ l + 50 μ l Tso
5. DHEA 10^{-7} : DHEA 10^{-7} M 25 μ l + 50 μ l Tso + 25 μ l MCC
6. DHEA 10^{-8} : DHEA 10^{-8} M 25 μ l + 50 μ l Tso + 25 μ l MCC
7. DHEA 10^{-9} : DHEA 10^{-9} M 25 μ l + 50 μ l Tso + 25 μ l MCC
8. DHEA 10^{-10} : DHEA 10^{-10} M 25 μ l + 50 μ l Tso + 25 μ l MCC
9. GC 10^{-6} : GC 10^{-6} M 25 μ l + 50 μ l Tso + 25 μ l MCC
10. GC 10^{-6} + DHEA 10^{-7} : GC 10^{-6} M 25 μ l + DHEA 10^{-7} M 25 μ l + 50 μ l Tso
11. GC 10^{-6} + DHEA 10^{-8} : GC 10^{-6} M 25 μ l + DHEA 10^{-8} M 25 μ l + 50 μ l Tso
12. GC 10^{-6} + DHEA 10^{-9} : GC 10^{-6} M 25 μ l + DHEA 10^{-9} M 25 μ l + 50 μ l Tso
13. GC 10^{-6} + DHEA 10^{-10} : GC 10^{-6} M 25 μ l + DHEA 10^{-10} M 25 μ l + 50 μ l Tso
14. GC 10^{-7} : GC 10^{-7} M 25 μ l + 50 μ l Tso + 25 μ l MCC
15. – 18. idem 10-13 combinando con GC 10^{-7} M

Las dosis de hormonas utilizadas se seleccionaron tras efectuar un ensayo piloto donde se probaron dosis de GC (para nuestro estudio: cortisol) y DHEA desde 10^{-6} hasta 10^{-12} M en individuos normales respondedores al antígeno Tso. Las diferentes concentraciones utilizadas se lograron partiendo de una solución madre de hormona 10^{-2} M solubilizada en alcohol puro al 50%.

Para ambas hormonas, la gama de concentraciones ensayadas en la prueba piloto (a partir de la cual fueron seleccionadas aquellas utilizadas en los experimentos) corresponden a concentraciones factibles en el amplio espectro que abarca desde condiciones fisiológicas hasta las halladas en situaciones de estrés agudo. El tratamiento con OI (0,04%) se realizó como control debido a que las hormonas son solubilizadas en ese medio y para descartar posibles efectos tóxicos del mismo sobre las células mononucleares.

El volumen final por pozo fue de 200 μ l. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Dieciocho horas previas a la finalización del cultivo se realizó un pulso de ³H-timidina (1 μ Ci/ pozo). Tras la cosecha, los resultados se leyeron en un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Raskbeta). Los resultados de la proliferación linfocitaria se expresaron como el promedio de las cuentas por minuto de los pozos para cada tratamiento.

Estudios de los efectos hormonales sobre la síntesis de citocinas in vitro.

Paralelamente al ensayo de linfoproliferación, las CPM en igual concentración se cultivaron en placas de 24 pozos (Costar). Las mismas fueron tratadas de igual modo que fuera descrito en el punto anterior conservando las proporciones para un volumen final por pozo de 800 μ l. Se obtuvieron sobrenadantes de estos cultivos a las 36 hs y 4 días para la determinación de citocinas. El contenido de cada pozo fue recolectado en el tiempo correspondiente y centrifugado (300 g, 4°C durante 15 minutos). Los sobrenadantes fueron recuperados y tratados con Trasylol® (100U/ml), fraccionados y preservados a -20°C hasta su utilización.

Cultivos de CPM para la obtención de sobrenadantes destinados a los ensayos en la línea celular NCI- H295-R.

De cada paciente, se efectuó para tal fin una suspensión celular de 10 x 10⁶ células/ml, a partir de la cual se sembraron 500 μ l por pozo. Las CPM fueron tratadas con 500 μ l de MCC (Basal) o con 500 μ l de Tso (10 μ g/ml) y cultivadas durante 36 hs y 4 días a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Su recolección y procesamiento fue realizado del mismo modo que en el punto anterior para la obtención de sobrenadantes. Éstos, previo tratamiento con Trasylol®, se fraccionaron y se congelaron hasta su utilización en los estudios *in vitro* sobre la línea celular adrenal humana H295-R.

Mediciones de citocinas.

Los niveles de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α presentes en plasma y en sobrenadantes de cultivo se cuantificaron por enzimoimmunoensayos comerciales (ELISA, Pharmingen, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de citocinas fueron calculadas tomando como referencia curvas estándar y expresadas en pg/ml. Los límites de detección para cada kit comercial fueron 4.7 pg/ml, 2 pg/ml, 7.8 pg/ml y 7.8 pg/ml respectivamente.

Medición de las hormonas plasmáticas.

Las concentraciones plasmáticas de cortisol, DHEA, PRL, GH, testosterona, E₂, triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) fueron cuantificadas por enzimoimmunoensayos de competición comerciales (ELISA, DRG Systems, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración plasmática para cada hormona se calculó tomando como referencia curvas estándar. El límite de detección para cada kit comercial fue: cortisol 2,5 ng/ml; DHEA 0,1 ng/ml; PRL 2 ng/ml; GH 0,11 μ UI/ml; testosterona 0,069 ng/ml; estradiol 4,6 pg/ml; T3 0,2 ng/ml y T4 0,4 μ g/dl.

2.e- Estudios realizados en la línea celular adrenal NCI-H295-R.

Efecto de los sobrenadantes de cultivo de 36 hs y 4 días de CPM sobre la producción de cortisol y DHEA adrenales.

La línea celular NCI-H295-R es una adaptación adherente de la línea original NCI-H295 que crece en suspensión. Ambas líneas se originaron a partir de un adenocarcinoma adrenal proveniente de una mujer de edad media de raza negra. La característica más importante de ambas líneas es que conservan la capacidad de respuesta a estímulos fisiológicos produciendo todos los esteroides adrenales.

Esta línea adherente se cultivó en medio DMEM / F12 conteniendo concentraciones estándar de L-glutamina y Hepes 15 mM (Gibco), al cual se adicionaron los siguientes compuestos en las concentraciones indicadas para obtener el medio de cultivo completo óptimo para el crecimiento celular:

1. NaHCO₃ (1,2 g/l) (Sigma)
2. Insulina (379,47 ng/ml) (Sigma)
3. Hidrocortisona (3,625 ng/ml) (Sigma)

4. Estradiol (2,724 ng/ml) (Sigma)
5. Transferrina (10 µg/ml) (Sigma)
6. Selenito (5 ng/ml) (Sigma)
7. Penicilina (100 U/ml) Estreptomocina (100 µg/ml) (Peni-Strepto Biochrom)
8. SFB (2%) (Gibco Invitrogen) Inactivado por calor

Las células utilizadas para el experimento se subcultivaron hasta un 60-70 % de confluencia en placas de 24 pozos (BD Biosciences: Falcon, fondo plano, área de crecimiento 2 cm²) en una densidad inicial de siembra de 70.000 células/cm². Tal porcentaje de confluencia óptimo para el desafío de la línea se obtiene tras 5 días de cultivo a partir de la densidad de siembra inicial. Al 3^{er} día de cultivo se renovó el medio por medio de cultivo completo fresco. Al día 5 se retiró nuevamente el mismo y se procedió a enfrentar las células a los tratamientos que más abajo se detallan.

Debido a que esta línea celular crece en forma óptima en DMEM/F12 completo y que los sobrenadantes de cultivos de CPM se encontraban en RPMI completo, fue necesario probar el posible efecto de este último medio de cultivo sobre la secreción de hormonas adrenales. Del mismo modo fue necesario evaluar el efecto directo del antígeno Tso (10µg/ml) utilizado para estimular las CPM sobre la secreción esteroidea adrenal. Como control positivo de estimulación de la línea, se utilizó el activador directo de la enzima adenilato ciclasa Forskolin (Tocris Biotrend) en una concentración de 2×10^{-5} M. Tal dilución se obtuvo a partir de una solución madre 10^{-2} M disuelta en alcohol puro, conservada a -20°C hasta su uso.

Los pools de sobrenadantes provenientes de CPM tanto de pacientes como controles, de 36 hs y 4 días de cultivo, fueron realizados en el momento inmediato previo al desafío de la línea celular. Para probar un posible efecto de dosis, se usaron dos diluciones diferentes de los mismos. Los cultivos tratados con pools de sobrenadantes, también fueron coestimulados con Forskolin (F). Seguidamente se detallan los diferentes tratamientos:

Controles y Controles estimulados (cultivos controles tratados con F):

1. DMEM/F12 400 µl
2. Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 400 µl
3. RPMI 400 µl
4. Forskolin 2×10^{-5} M en RPMI 400 µl
5. DMEM/F12 200 µl + RPMI 200 µl
6. DMEM/F12 100 µl + Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 100 µl + RPMI 200 µl
7. DMEM/F12 100 µl + RPMI 300 µl
8. Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 100 µl + RPMI 300 µl

9. Tso en RPMI 300 μ l + DMEM/F12 100 μ l
10. Tso en RPMI 300 μ l + Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 100 μ l
11. Tso en RPMI 200 μ l + DMEM/F12 200 μ l
12. Tso en RPMI 200 μ l + Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 100 μ l + DMEM/F12 100 μ l

Cultivos tratados con Pooles de sobrenadantes de cultivo (36 hs y 4 días):

13. Pool Control (Normales) 300 μ l + DMEM/F12 100 μ l
14. Pool Control (Normales) 300 μ l + Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 100 μ l
15. Pool Control (Normales) 200 μ l + DMEM/F12 200 μ l
16. Pool Control (Normales) 200 μ l + Forskolin 2×10^{-5} M en DMEM/F12 100 μ l + DMEM/F12 100 μ l
17. – 20. Ídem para Pooles de pacientes Leves
21. – 24. Ídem para Pooles de pacientes Moderados
25. – 28. Ídem para Pooles de pacientes Severos

Todos los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado, siendo el volumen final por pozo de 400 μ l. Los cultivos se incubaron durante 48 hs, transcurrido ese tiempo, las placas se centrifugaron (10 minutos, 1100 rpm a 4°C) y los sobrenadantes se fraccionaron y congelaron a –20°C hasta su cuantificación.

En ellos se determinaron las concentraciones de cortisol y DHEA por medio de enzimoimmunoensayos comerciales (ELISA, DRG Systems, Alemania) siguiendo los protocolos provistos por el fabricante. Las concentraciones halladas en los sobrenadantes se expresaron en ng/ml tomando como referencia curvas estándar. Los límites de detección para cada hormona fueron de 2,5 y 0,1 ng/ml respectivamente.

2.h- Análisis Estadístico.

Las comparaciones entre los distintos grupos se efectuaron por medio de dos pruebas no paramétricas, el análisis de la variancia de Kruskall-Wallis y la U de Mann-Whitney. Las correlaciones entre las concentraciones de citocinas, o las de estos mediadores con los niveles de hormonas, se estudiaron por medio del coeficiente de correlación de rango de Spearman. Las muestras se consideraron distintas cuando presentaron un nivel de significación menor a 0,05. Las comparaciones dentro de grupo se realizaron por medio de la prueba de rangos de Wilcoxon. Debido a las características de las variables en estudio, las medidas de tendencia central y dispersión se presentan como mediana y percentilos 25 y 75 o bien, como media y error estándar (SE). Estos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statview 5.1, 2000.

3- RESULTADOS.

3.a- Descripción poblacional.

La población estudiada se compuso de 59 individuos (22 normales; de los cuales 3 correspondieron al sexo femenino y 37 enfermos de TB; de los cuales 6 fueron mujeres. Las mismas se distribuyeron a su vez de a 2 en cada grupo de severidad). La distribución porcentual de cada grupo se representa en la Figura 8. El promedio de edad fue de 45 años \pm 5 (desvío estándar), no existiendo diferencia entre los distintos grupos.

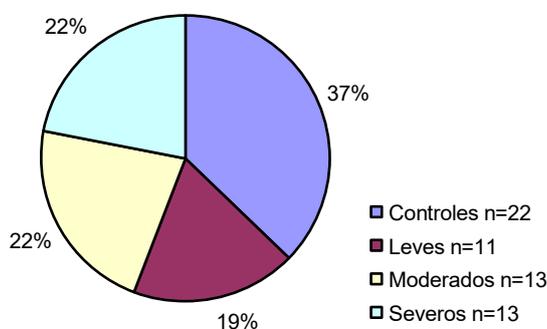


Figura 8: Distribución porcentual de la población estudiada.

En lo inherente a la forma de presentación clínica de la TB, el análisis de los restantes parámetros considerados en el interrogatorio mostró que la TB pulmonar se acompañó en un 57 % por el denominado Síndrome de Impregnación Bacilar no encontrándose este síndrome correlacionado con la severidad de la TB al momento del diagnóstico. Con respecto a los registros de frecuencia cardíaca (FC) y respiratoria (FR), la primera se observó significativamente elevada en el grupo de pacientes respecto del grupo control ($p < 0,001$). Sin embargo, no existió diferencia entre los subgrupos de enfermos. La FR se encontró asimismo significativamente elevada en los grupos Moderados y Severos respecto de los grupos Control y Leves ($p < 0,01$) (Tabla 1).

Cuando se interrogó acerca del tiempo de evolución de la enfermedad, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de enfermos. Siempre se sostuvo que librada a su evolución natural, la TB progresa espontáneamente de un estadio al otro de severidad. Sin embargo, en base a los datos aportados por la población estudiada, el estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico no se vinculó necesariamente con el tiempo de evolución de la TB.

Todos los pacientes refirieron pérdida de peso desde el inicio de la sintomatología. El cálculo del BMI demostró que el mismo fue significativamente menor en el grupo de pacientes

respecto de los Controles, el cual se mostró más acentuado cuanto mayor fue la severidad de la TB (Tabla 1 y Figura 9). El valor medio del grupo Control se encontró dentro de los valores considerados de sobrepeso. En contraposición, en el grupo de pacientes, los valores medios oscilaron entre valores situados en el límite inferior considerado de normalidad hasta valores de bajo peso en el grupo Severos (National Institute of Health (1998) Obes. Res. 6 (Suppl2):51s-209s).

Tabla 1: Parámetros clínicos considerados en el momento del interrogatorio.

Grupo	FC (latidos/min)	FR (inspiraciones/min)	Tiempo de Evolución (meses)	BMI (kg/m²)
Control n=22	76,5 * (1,957)	15,4 ** (0,328)	(-)	27,365 ¶ (0,633)
Leves n=11	84 (1,885)	15,6 ** (0,527)	3 (0,944)	22,054 (0,864)
Moderados n=13	87 (2,083)	18,923 (1,332)	5 (2,005)	21,186 (1,085)
Severos n=13	88,538 (1,567)	18,846 (1,037)	9,923 (6,340)	19,559 (0,926)
p	<0,001	<0,01	NS	<0,0001

*, **, ¶ diferencia con los grupos restantes, para cada parámetro evaluado. Los datos se expresan como promedios ± SE.

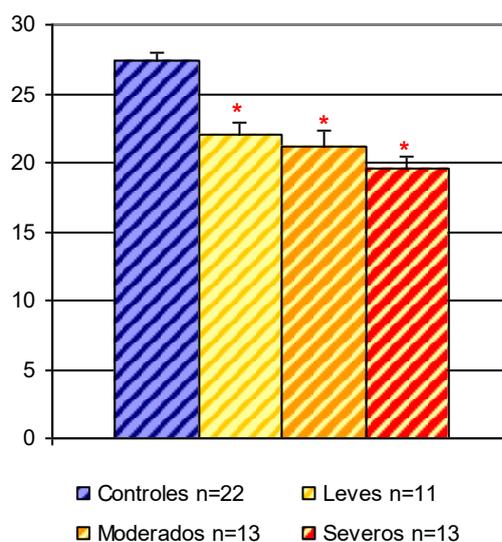


Figura 9: Valores de índice de Masa Corporal para los distintos grupos de estudio expresados en kg/m². * Difieren del grupo Control p<0,0001.

Respecto a los hábitos de etilismo y tabaquismo se observó que para el primero de ellos, no se presentaron individuos etilistas en el grupo Control. Dentro de los enfermos tuberculosos, el 27 % de los mismos presentó dicho hábito. Sin embargo, no se observó asociación entre el etilismo y la severidad de la TB. La prevalencia del hábito de fumar fue uniforme en todos los grupos de estudio. El 38 % de los individuos evaluados fumaban, porcentaje que se mantuvo cuando se analizaron Controles y pacientes TB por separado. Tampoco fue posible vincular la prevalencia del hábito de fumar con la severidad de la TB. Mientras ningún individuo del grupo Control presento Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), el 18,9 % de los fumadores TB la padecían. En todos los casos de enfermos TB con EPOC, la presencia de la TB agravó la sintomatología de la misma, haciéndola muchas veces resistente al tratamiento habitual de la EPOC.

También fue tomada en cuenta la vacunación con BCG. Se consideraron siempre como vacunados los individuos que recibieron dos dosis de BCG. En la tabla 2 y figuras 10 y 11 se representan la distribución por grupo de los individuos vacunados y no vacunados. El 95,45 % de los Controles recibieron el esquema completo de vacunación mientras que sólo el 54 % de los enfermos tuberculosos fueron debidamente vacunados. Asimismo, el porcentaje de vacunados dentro de este último grupo disminuyó conforme se incrementó la severidad de la enfermedad. En base a lo expuesto, los datos presentados corroborarían el propuesto rol protector de la vacuna sobre el desarrollo de la TB; no evitando la infección con MTB, sino previniendo un curso más tórpido de la enfermedad.

Tabla 2: Distribución por grupo de los individuos vacunados y no vacunados con BCG.

Grupo	BCG Si	BCG No
Control n=22	21 (95,455 %) *	1 (4,545 %)
TBC n=37	20 (54,054 %)	17 (45,946 %)
Leves n=11	9 (81,818 %)	2 (18,182 %)
Moderados n=13	9 (69,231 %)	4 (30,769 %)
Severos n=13	2 (15,385 %)	11 (84,615 %)

* Diferencia con los pacientes Severos, $p < 0.0001$ (prueba exacta de Fisher)

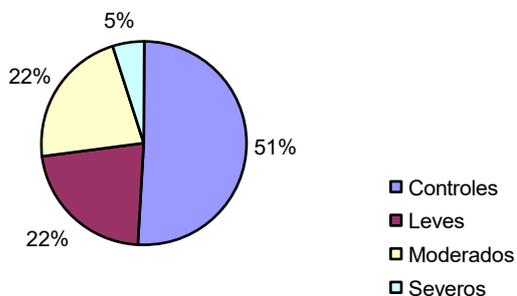


Figura 10. Distribución por grupo dentro de la población de individuos vacunados con BCG.

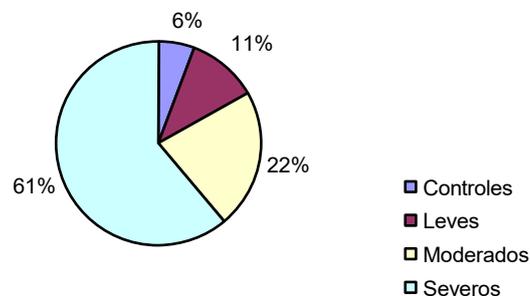


Figura 11. Distribución por grupo dentro de la población de individuos no vacunados con BCG.

Respecto a los parámetros considerados en el laboratorio, se detallan en la tabla 3 los resultados del hemograma. Los pacientes presentaron valores de hematocrito y hemoglobina significativamente menores que los individuos Controles. Es muy probable que se haya tratado en la mayoría de los casos de anemias normocíticas normocrómicas que frecuentemente suelen acompañar a enfermedades de evolución crónica.

Con respecto a la fórmula leucocitaria, si bien no existieron diferencias significativas entre los grupos en base al recuento de leucocitos, sí se encontraron diferencias en la distribución de la fórmula. Los pacientes se mostraron linfopénicos, difiriendo significativamente respecto de los Controles. Tal diferencia se mantuvo para todos los subgrupos de severidad. Entre los pacientes sin embargo, no existieron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de linfocitos respecto del total de blancos. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos respecto de los porcentajes de monocitos, polimorfonucleares, proteínas totales, uremia y glicemia. Respecto a este último parámetro, en el total de individuos estudiados se encontraron 6 personas diabéticas; ninguno de los cuales perteneció al grupo Controles. Dentro del grupo de pacientes, 4 pertenecieron al grupo Moderados, 1 al grupo Leves y el último al grupo Severos. En todos los casos, la preexistencia de esta enfermedad fue desconocida.

Respecto de la VES, a pesar de la importante variación dentro del grupo de pacientes, la diferencia entre los distintos subgrupos de severidad y los Controles fue siempre significativa, aunque entre los distintos grupos de enfermos no se hallaron diferencias.

Tabla 3: Parámetros de laboratorio.

Grupo	Hematocrito (%)	Hemoglobina (gr/dl)	Blancos Totales (miles)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Glicemia (mg/dl)	VES (mm/hr)
Control n=22	45,50 * (1,5)	15,10 ** (0,70)	6050 (1550)	40,00 ¶ (0,70)	3,50 (0,50)	62,50 (4,50)	3,50 § (1,50)
Leves n=11	32,25 (7,25)	11,50 (1,40)	9350 (2850)	11,00 (2,00)	2,50 (0,50)	99,50 (15,50)	75,00 (57,00)
Moderados n=13	35,02 (2,83)	11,16 (0,69)	11320 (2125,65)	14,16 (4,21)	4,25 (1,436)	144,750 (51,869)	89,750 (26,884)
Severos n=13	29,60 * (2,38)	9,54 (0,58)	10444 (1883,64)	13,03 (3,03)	3,66 (0,759)	101,80 (19,314)	66,20 (15,756)
p	<0,01	<0,01	NS	<0,004	NS	NS	0,05

*, **, ¶, § diferente de los restantes grupos según los parámetros evaluados.

Nota: los valores de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, uremia y proteínas totales no se detallan junto a la fórmula leucocitaria ya que no existieron diferencias entre los grupos.

3.b- Efectos de GC y DHEA sobre la linfoproliferación.

En una primera aproximación fue de interés determinar si existían diferencias en cuanto a la respuesta linfoproliferativa que mostraban los pacientes TB con distinta severidad respecto de los resultados obtenidos en los Controles.

Como puede apreciarse en la figura 12, donde se representan las proliferaciones basales y estimuladas con Tso, la respuesta que mostraron los pacientes frente al Tso (expresada en cuentas por minuto (cpm)) fue significativamente menor a la que se evidenció en los Controles (Controles: $15949,23 \pm 4263,56$ vs TB: $6893,13 \pm 1450,27$; $p=0,0216$). Al considerar el grado de afectación pulmonar fue evidente que la menor capacidad de respuesta al antígeno se presentó con mayor intensidad en las formas severas ($5345,12 \pm 1867,43$; $p=0,049$). Más aún, tal capacidad de respuesta antígeno específica, tendió a disminuir conforme se incrementó la severidad de la TB (misma figura).

El agregado de alcohol (OI 0,04%) en la forma que se utiliza para disolver las hormonas no causó modificaciones en la capacidad linfoproliferativa de CPM y arrojó cpm similares a las halladas para los cultivos sólo estimulados con Tso, por lo que los resultados correspondientes no se grafican (Valores medios \pm SE: Controles: $14657,72 \pm 3463,23$; Leves: $9192,69 \pm 3284,76$; Moderados: $7199,30 \pm 2255,40$; Severos: $5701,092 \pm 1938,16$. Controles vs Severos $p<0,05$).

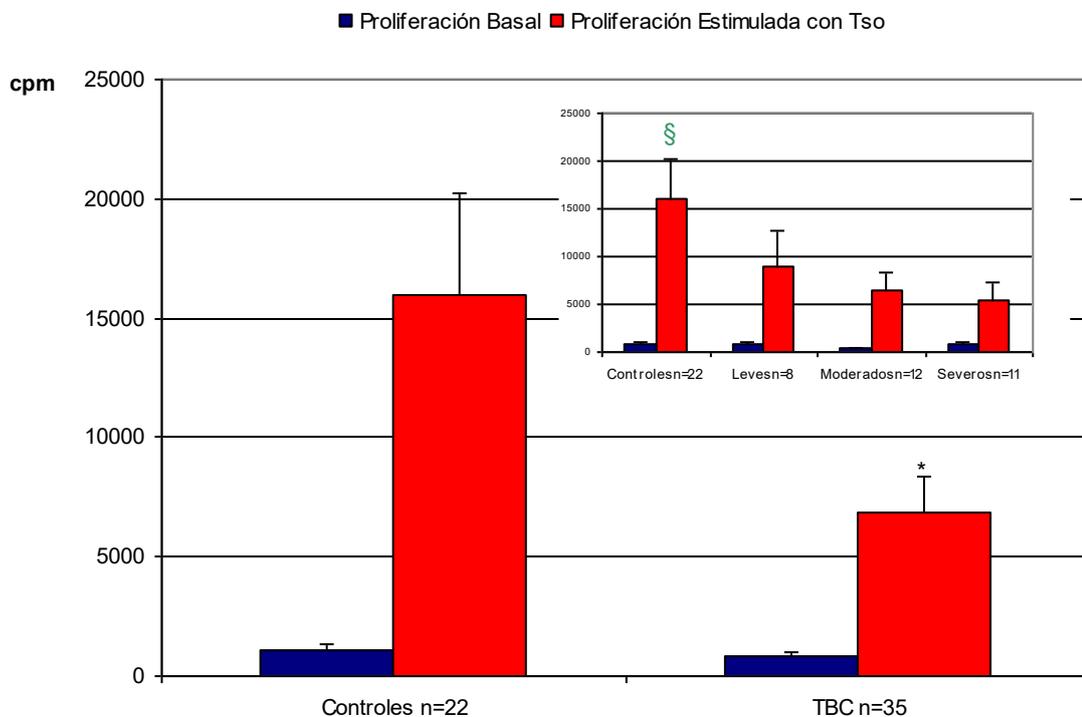


Figura 12 : Proliferación de CPM provenientes de individuos normales y enfermos de TB pulmonar, estimuladas o no con Tso (media de las cpm \pm SE).

Comparación entre grupos: § $p=0,049$ vs pacientes Severos y * $p=0,0216$ vs Controles

La respuesta inespecífica frente a ConA también se halló descendida en los tres grupos de pacientes, aunque en este caso tanto el grupo Leves como el Severos presentaron los valores más bajos: Controles: $41314,20 \pm 10307,45$; Leves: $17094,45 \pm 4311,53$, $p=0,001$; Moderados: $23253,04 \pm 4925,06$, $p=0,003$; Severos: $16696,75 \pm 6515,73$, $p=0,001$; TB: $19256,94 \pm 2844,56$, $p<0,0001$ (Figura 13).

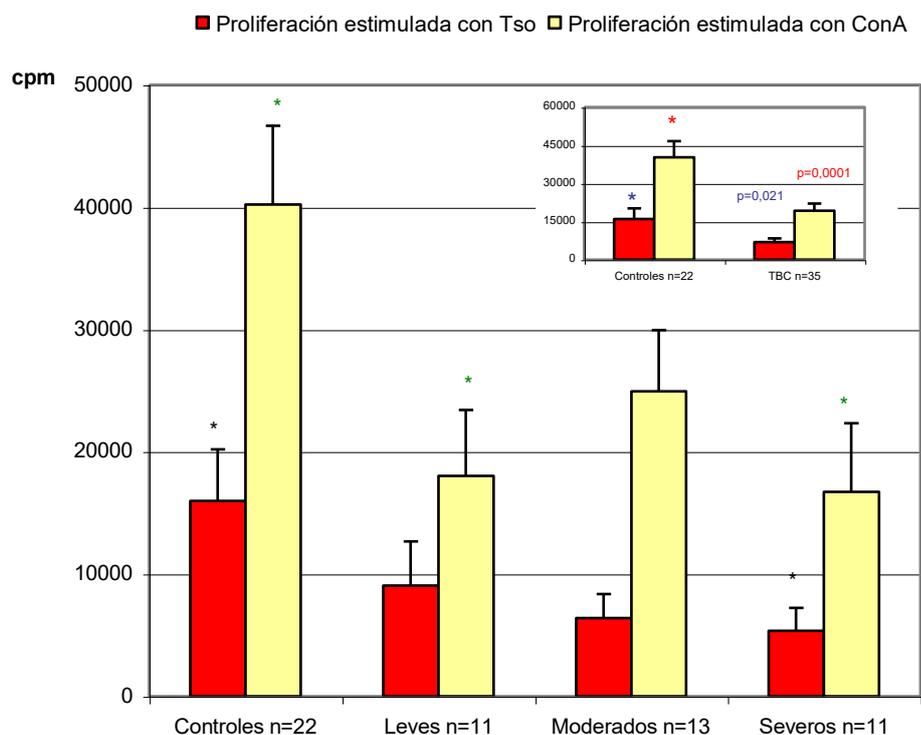


Figura 13: Proliferación de CPM provenientes de individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad, estimulada con Tso o Con A (media de las cpm \pm SE).
Difieren del grupo Controles: * $p=0,049$ pacientes Severos y * $p<0,003$ Leves, Moderados y Severos.

Cuando se procedió a estudiar el efecto de las hormonas esteroideas sobre la proliferación de las CPM ante el estímulo con Tso, se observó que el agregado de DHEA no ocasionó cambios significativos en la respuesta cuando se la comparó con los resultados de los mismos grupos sin tratamiento hormonal (Figura 14). Al igual que lo constatado en los cultivos sin hormonas, la respuesta de los pacientes fue inferior a la de los Controles con diferencias significativas para las distintas concentraciones utilizadas del andrógeno adrenal.

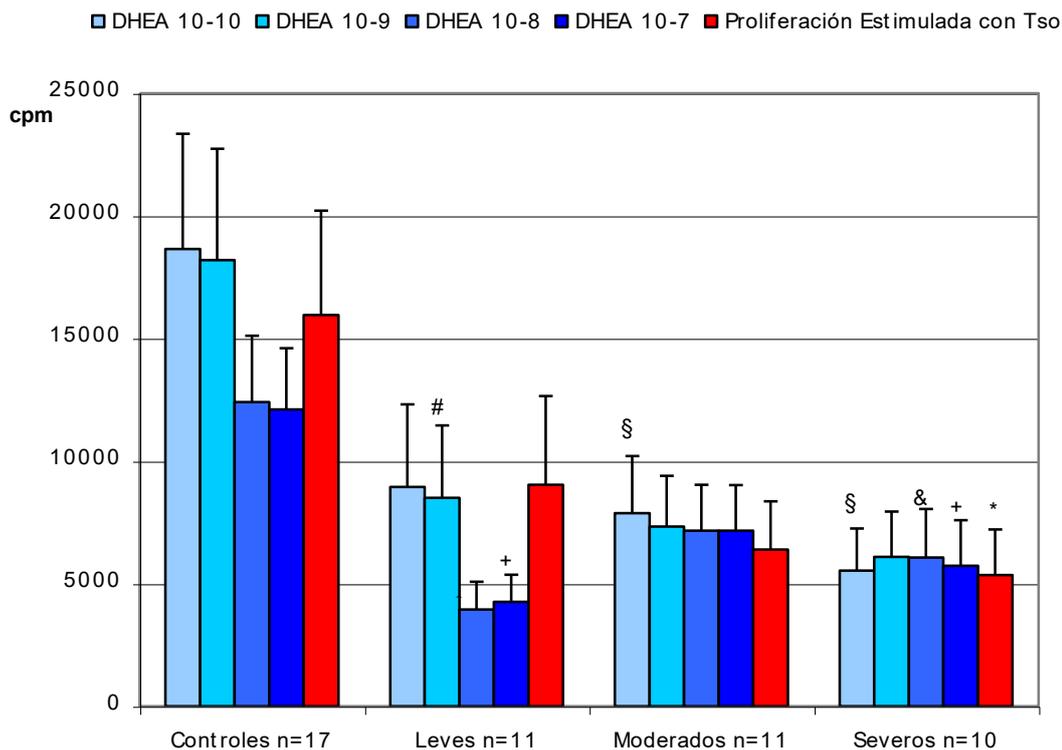


Figura 14: Efecto de DHEA en concentraciones crecientes sobre la proliferación estimulada con Tso de CPM provenientes de individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad (media de cpm \pm SE).

Difieren de los respectivos Controles: *p=0,049 ; §p<0,043 ; #p<0,05 ; &p<0,04 ; +p<0,03.

Los cultivos en los cuales se agregó cortisol presentaron una importante inhibición de la respuesta proliferativa, tanto en pacientes como en Controles, que en el caso de la dosis 10^{-6} M resultó ser significativamente inferior a la registrada en los cultivos controles sin hormonas (Tabla 4). Asimismo, fue notorio el efecto inhibitor dosis dependiente de cortisol sobre la proliferación celular. Mientras que con cortisol 10^{-6} M disminuyó la proliferación celular entre un 50 y 70 %, cortisol 10^{-7} M sólo lo hizo en un 10-40 % (Figura 15).

Tabla 4. Respuesta proliferativa de CPM frente a la estimulación específica con el antígeno Tso pertenecientes a individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad. Los cultivos fueron estimulados durante 5 días en presencia o ausencia de cortisol. Los datos corresponden a los valores de cpm crudos, expresados como mediana y percentilos 25 y 75.

Tratamiento	Grupos			
	Controles	Leves	Moderados	Severos
Tso	12748 (7839-20834)	2571 (1474-11049)	6487 (1593-16439)	4243 (600-7356)¶¶
Tso + Cortisol 10⁻⁶ M	2571 (1333-8376)*	881 (442-7857)	1135 (469-4620)*	1826 (359-3563)*
Tso + Cortisol 10⁻⁷ M	8794 (3256-13994)	1496 (1124-3611)	3509 (794-6380)	2791 (498-12907)

Difieren de Controles, ¶¶ p<0,04

*Comparaciones entre grupos: Cultivos estimulados con Tso vs cortisol (10⁻⁶M), Controles (p<0.01), Moderados (p<0.025), Severos (p<0.05).

Para tener una mejor idea del efecto de las hormonas esteroideas sobre la respuesta ante antígenos del MTB se procedió a calcular el índice de estimulación (ITso) que surge de dividir las cpm de los cultivos estimulados en presencia de DHEA o cortisol / cpm de los cultivos estimulados sin hormonas. Los resultados de la figura 15 señalan que en la concentración de 10⁻⁷ M, DHEA fue capaz de potenciar la respuesta al Tso de los pacientes Leves (1,205 ± 0,144) con diferencias significativas respecto de los Controles (0,935 ± 0,048 ; p=0,037). Por su parte, DHEA 10⁻⁹ M, lo hizo sobre los pacientes Severos (1,185 ± 0,095), difiriendo éstos significativamente de pacientes Moderados (0,936 ± 0,072 ; p=0,025) y Controles (0,992 ± 0,045 ; p<0,05).

El Cortisol por su parte mostró para ambas concentraciones estudiadas una capacidad de inhibición que tendió a ser más importante cuanto mayor fue la respuesta de determinado grupo frene al antígeno Tso. Para cortisol 10⁻⁷ M, la proliferación de CPM de pacientes Severos (0,851 ± 0,131) fue la menos afectada por esta hormona, difiriendo significativamente de pacientes Moderados (0,612 ± 0,052) y Controles (0,633 ± 0,035 ; p=0,037) (misma figura).

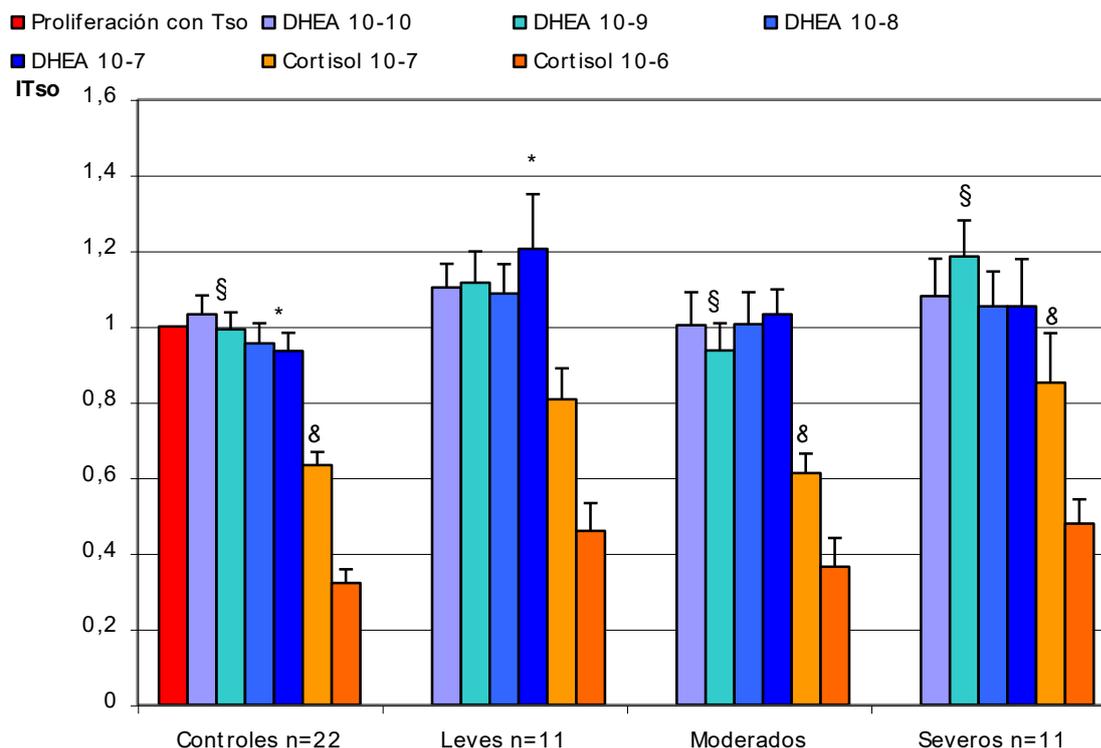


Figura 15: Efectos de DHEA o cortisol sobre la proliferación de CPM estimuladas con Tso en individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad. Los cultivos fueron estimulados durante 5 días en presencia y ausencia de hormonas esteroideas. Los valores son expresados como el valor medio \pm SE del ITso (cpm en cultivos estimulados con Tso adicionados de DHEA o cortisol / cpm en cultivos sólo estimulados con Tso).

* Difieren estadísticamente de los pacientes Leves $p < 0.04$

§ Difieren estadísticamente de los pacientes Severos $p < 0,05$; & $p < 0,037$

En una instancia siguiente se analizó el efecto del agregado de cortisol y DHEA (como antagonista natural de cortisol), sobre la linfoproliferación inducida por Tso. Como se observa en la siguiente tabla, el agregado en simultáneo de DHEA no logró revertir en ninguno de los casos la supresión mediada por cortisol.

Tabla 5. Respuesta proliferativa de CPM frente a la estimulación específica con el antígeno Tso pertenecientes a individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad. Los cultivos fueron estimulados durante 5 días en presencia o ausencia de hormonas esteroideas solas o en combinación. Los datos corresponden a los valores de cpm crudos expresados como mediana y percentilos 25 y 75.

Tratamiento	Grupos			
	Controles	Leves	Moderados	Severos
Tso	12748 (7839-20834)	2571 (1474-11048)	6486 (1592-16439)	4243 (600-7356) *
Tso + Cortisol 10⁻⁶ M	2570 (1333-8376) §	880 (441-7857)	1135 (469-4620) §	1826 (359-3563) §
+ DHEA 10⁻⁷ M	3219 (840-9486)	809 (554-4881)	1725 (488-5533)	1580 (449-4314)
+ DHEA 10⁻⁸ M	2675 (1034-8857)	906 (471-7925)	1122 (512-4785)	1669 (419-4742)
+DHEA 10⁻⁹ M	2793 (755-9084)	760 (490-5284)	890 (552-6847)	1831 (467-4496)
+ DHEA 10⁻¹⁰ M	2217 (822-8990)	809 (498-5812)	895 (713-5942)	2166 (464-3070)
Tso + Cortisol 10⁻⁷ M	8794 (3256-13994)	1496 (1124-13611)	3509 (794-6380) *	2791 (498-12907)
+DHEA 10⁻⁷ M	9526 (2832-15072)	1331 (1152-8393)	3630 (711-7286)	3067 (555-11401)
+DHEA 10⁻⁸ M	7092 (3254-15200)	1501 (1237-9785)	3107 (664-10355)	3382 (579-11326)
+DHEA 10⁻⁹ M	7807 (2838-13994)	1489 (870-9380)	3170 (926-9922)	2997 (568-10052)
+DHEA 10⁻¹⁰ M	7330 (3063-13965)	1543 (1133-10109)	4057 (443-7039)	2645 (483-9819)

Difieren de Controles, *p<0,049

§Comparaciones entre grupos: Cultivos estimulados con Tso vs cortisol (10⁻⁶M), Controles (p<0.01), Moderados (p<0.025), Severos (p<0.05).

Como se presenta en la figura 16, efectuando el análisis en base a los ITso, sí pudo observarse que la adición de DHEA (en todas las concentraciones estudiadas) a los cultivos con cortisol 10⁻⁶ M generó un incremento de estos índices en los pacientes Severos; los cuales

superaron al ITso para cortisol 10^{-6} M solo. Ello generó diferencias significativas respecto del grupo Controles para todos los tratamientos combinados, así como respecto de pacientes Leves y Moderados para la combinación con DHEA 10^{-9} M, y respecto a pacientes Moderados para la combinación con DHEA 10^{-8} M. Sin embargo, en ninguno de los casos fue posible revertir totalmente la inhibición mediada por cortisol sobre la proliferación de CPM. Tampoco fue posible hallar diferencias entre los tratamientos que combinaron DHEA entre sí para cada grupo.

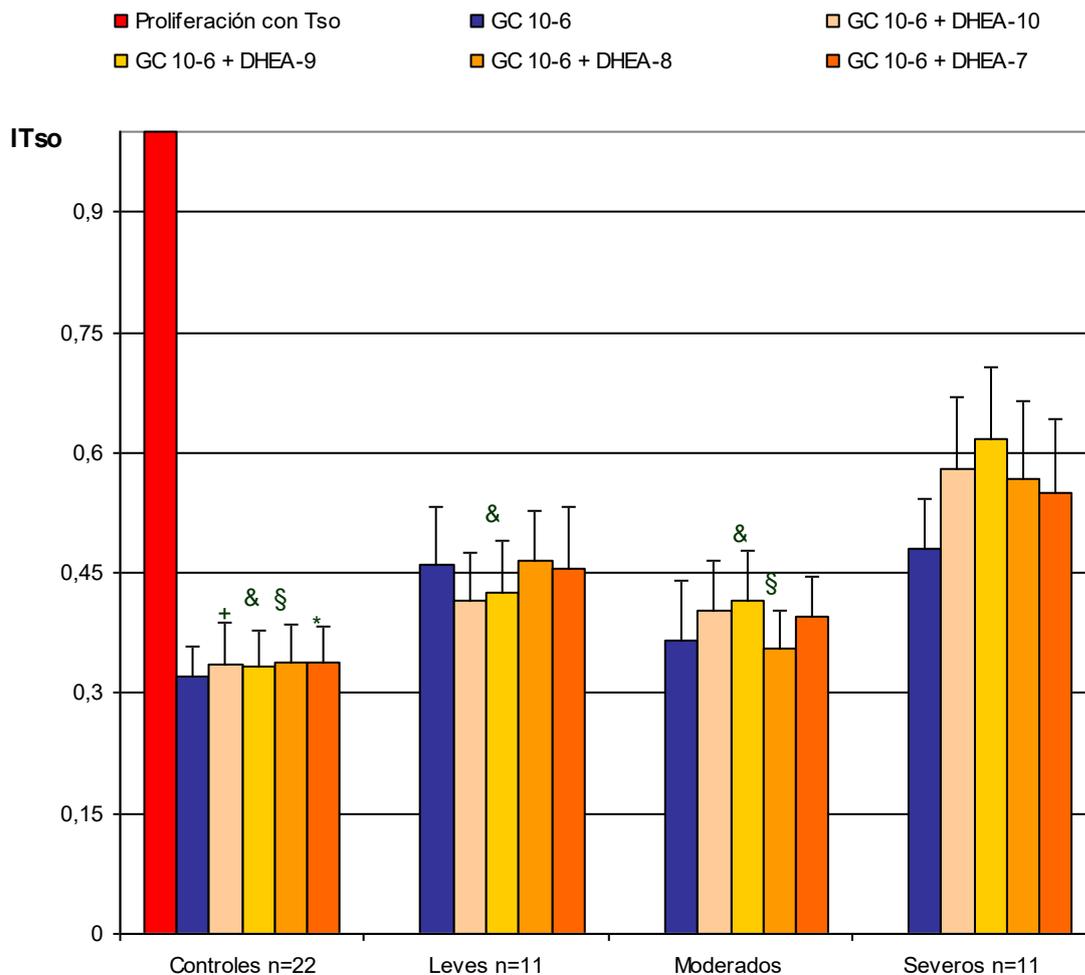


Figura 16: Efecto del tratamiento simultáneo con cortisol y DHEA sobre la proliferación de CPM estimulada con Tso de individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad. Las CPM se co-cultivaron con Tso durante 5 días en presencia y ausencia de hormonas esteroideas. Los resultados se expresan como el valor medio \pm SE del ITso (cpm en cultivos estimulados con Tso adicionados de DHEA en diferentes concentraciones y cortisol 10^{-6} M / cpm en cultivos sólo estimulados con Tso). Los ITso correspondientes a los cultivos sin tratamiento hormonal (ITso = 1) se grafican como única barra única en rojo. Aquéllos ITso provenientes de cultivos sólo tratados con cortisol 10^{-6} M se incluyeron en el gráfico para una mejor apreciación de los resultados. Difieren significativamente de los pacientes Severos: Controles *p=0,022, §p=0,011, &p=0,002 y +p=0,009 ; Leves y Moderados &p<0,050 y Moderados §p=0,030.

Como se muestra en la figura 17, la inhibición de la linfoproliferación específica mediada por cortisol 10^{-7} M, tanto de individuos normales como de enfermos de TB, fue mucho menor que la inducida por cortisol 10^{-6} M; siendo los pacientes Severos los más resistentes a la misma. Tampoco pudo revertirse en los tratamientos combinados con cortisol 10^{-7} M el efecto inhibitorio mediado por GC. Y al igual que en aquellos que combinaron las distintas dosis de DHEA con cortisol 10^{-6} M, no existieron diferencias entre los mismos dentro de cada grupo de estudio. Debido a la menor inhibición observada en pacientes Severos, se hallaron diferencias significativas entre los ITso de los mismos respecto de los de Controles y enfermos Moderados.

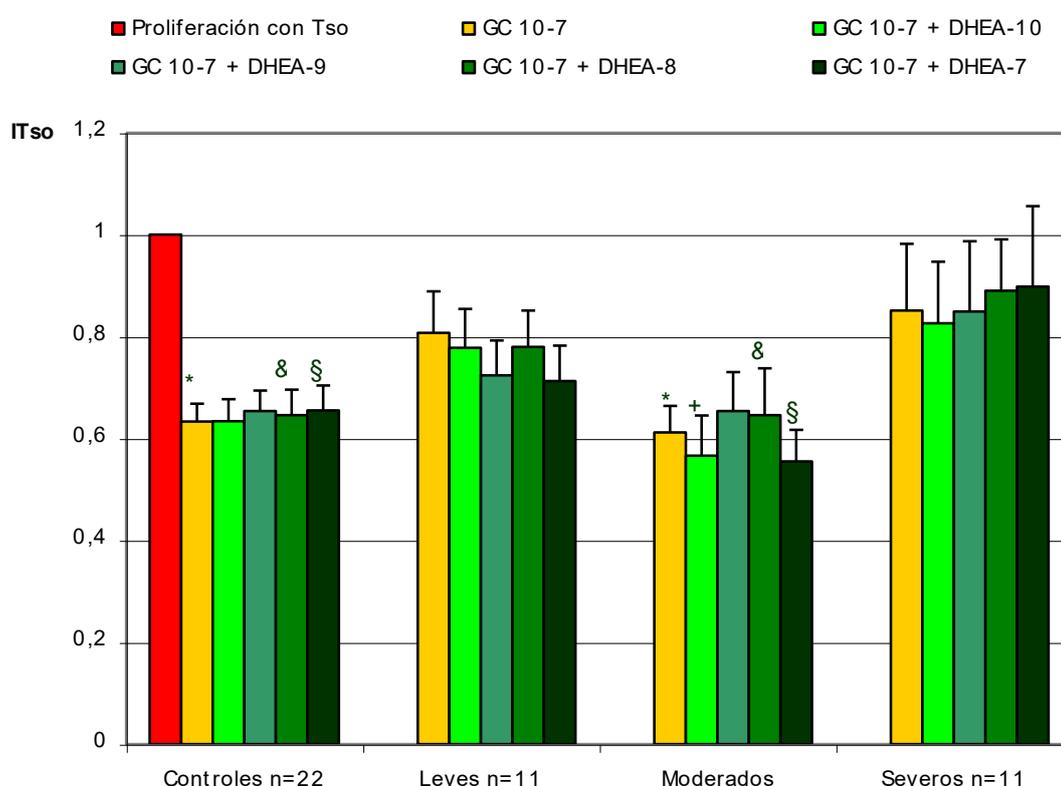


Figura 17: Efecto del tratamiento simultáneo con cortisol y DHEA sobre la proliferación de CPM estimulada con Tso de individuos normales y enfermos de TB de diferente severidad. Los cultivos fueron estimulados durante 5 días en presencia y ausencia de hormonas esteroideas. Los resultados se expresan como el valor medio \pm SE del ITso (cpm en cultivos estimulados con Tso adicionados de DHEA en diferentes concentraciones y cortisol 10^{-7} M / cpm en cultivos sólo estimulados con Tso). Los ITso correspondientes a los cultivos sin tratamiento hormonal (ITso = 1) se grafican como única barra única en rojo. Aquéllos ITso provenientes de cultivos sólo tratados con cortisol 10^{-7} M fueron incluidos en el gráfico para una mejor apreciación de los resultados. Difieren significativamente de los pacientes Severos: Controles y Moderados * $p < 0,037$, § $p < 0,04$, & $p < 0,03$ y sólo Moderados + $p = 0,030$.

3.c- Efectos hormonales sobre la síntesis de citocinas in vitro.

Tras el estudio de la blastogénesis, se efectuaron las evaluaciones de citocinas en SN de cultivos de CPM de 36 hs y 4 días. Las mediciones de IFN- γ en los SN de cultivo de 36 hs de las células estimuladas con Tso sin el agregado de hormonas se resumen en la tabla 6. Como puede observarse, la presencia de IFN- γ fue en todos los casos menor en los pacientes y más aún en las formas severas, en quienes la diferencia se hallaba muy cerca del nivel de significado estadístico. El estímulo con Tso, generó tanto en Controles como en pacientes un incremento en la producción de este mediador, el cual no fue modificado significativamente con el agregado de OI en la concentración utilizada para disolver las hormonas (0,04%).

Tabla 6: Concentraciones de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de CPM estimulados con Tso, provenientes de sujetos normales y enfermos de TB (cultivos de 36 horas). Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupos	Basal	Tso	Tso + OI 0,04%
Controles n=13	10,7 (4,7-12,5)	109 (33,4-263)	122 (16,4-532)
Leves n=9	4,7 (4,7-14)	48,6 (31-97,2)	27 (15,2-73,8)
Moderados n=11	8,4 (4,7-14,4)	33,9 (27,3-184,7)	40 (23,6-255)
Severos n=7	4,7 (4,7-11,5)	25,5 (23,6-48,6)	27,6 (12,8-42,6)

Los resultados correspondientes a cultivos en los cuales se agregaron cortisol o DHEA en diferentes concentraciones se hallan representados en la siguiente tabla. Las comparaciones dentro de cada grupo entre los cultivos realizados en presencia o ausencia de hormonas indicaron que cortisol, fundamentalmente en la concentración 10^{-6} M, tendió a reducir la producción de IFN- γ . Esta reducción fue significativa para el grupo de pacientes Severos respecto de los cultivos no tratados con este GC ($p < 0.05$). Por su parte, el agregado de DHEA en diferentes concentraciones a los cultivos, no ocasionó cambios significativos en los niveles de IFN- γ determinados en los SN, respecto de los cultivos no tratados con el andrógeno. Esta observación se repitió para todos los grupos estudiados. Las comparaciones entre grupos, mostraron que los individuos normales presentaron en los SN niveles de IFN- γ significativamente

superiores a los hallados en el grupo de pacientes Severos; observación que se repitió para todas las concentraciones de DHEA estudiadas.

Tabla 7: Concentraciones de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de 36 horas de CPM provenientes de sujetos normales y enfermos de TB, estimulados con Tso y adicionados de GC o DHEA en diferentes concentraciones. Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75) (pg/ml).

Grupo	Sin Hormona	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M
Controles n=13	109 (33.4-263)	Cortisol 31 (4.7-54.5)	Cortisol 54 (18-139)			
			DHEA 115 * (36.6-262)	DHEA 99.4 * (31.4-265)	DHEA 112 * (39.3-455)	DHEA 115 * (28.3-271)
Leves n=9	48.6 (31-97.2)	Cortisol 14 (4.7-26)	Cortisol 30.9 (11.6-41.7)			
Moderados n=11	33.9 (27.3-185)	Cortisol 26 (13.8-37)	Cortisol 24 (18-117)			
Severos n=7	25.5 (23.6-48.6)	Cortisol 10.4 ** (4.7-12)	Cortisol 12 (4.7-30.9)			
Leves n=9	48.6 (31-97.2)			DHEA 28 (11-126)	DHEA 39 (17-96)	DHEA 30.8 (17-67)
Moderados n=11	33.9 (27.3-185)			DHEA 45 (33-206)	DHEA 34 (29-171)	DHEA 46.8 (35-189)
Severos n=7	25.5 (23.6-48.6)			DHEA 14 (9.3-41)	DHEA 14.5 (4.7-61)	DHEA 21 (4.7-35)
				DHEA 18 (4.7-39)		

*diferencia con los pacientes Severos, p<0.05

**diferente de los cultivos sin tratamiento, p<0.05

Al analizar los resultados correspondientes a los cultivos tratados en forma simultánea con ambas hormonas, se constató que los niveles de IFN- γ (para cualquiera de las dosis de DHEA utilizadas en la combinación) se mantuvieron bajos como en los cultivos sólo tratados con cortisol (Tabla 8). Los Controles por su parte, siguieron mostrando niveles superiores de IFN- γ respecto de los casos Severos.

Tabla 8: Concentraciones de IFN- γ en SN de 36 hs de cultivo de CPM provenientes de sujetos normales y enfermos de TB, estimulados con Tso y adicionados con cortisol 10^{-6} M y DHEA en concentraciones decrecientes. Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Sin Hormona	Cortisol 10^{-6} M	DHEA D10^{-7} M	DHEA D10^{-8} M	DHEA D10^{-9} M	DHEA D10^{-10} M
Controles n=13	109 (33.4-263)	31 (4.7-54.5)	28.3 * (8.9-53.4)	25 (4.7-59)	19.5 (9.3-58)	20.4 (10-56)
Leves n=9	48.6 (31-97.2)	14 (4.7-26)	14 (4.7-29)	15 (4.7-24)	17.4 (4.7-28.7)	14 (4.7-19)
Moderados n=11	33.9 (27.3-185)	26 (13.8-37)	21.4 (14-28)	13 (5.5-28)	27 (9.8-41)	22 (4.7-35.7)
Severos n=7	25.5 (23.6-48.6)	10.4 (4.7-11.8)	5.5 (4.7-14)	10.7 (4.7-21)	10.7 (5.5-32)	12 (4.7-27)

Diferencia con las formas severas, *p<0.05

El análisis de las combinaciones realizadas con cortisol 10^{-7} M, permitieron arribar a las mismas conclusiones y dado que no aportan mayores datos, no son presentados.

A continuación se procedió a efectuar las determinaciones en los sobrenadantes recolectados tras 4 días de cultivo. Como se muestra en la tabla 9, las concentraciones de IFN- γ fueron superiores a las detectadas en los cultivos de 36 hs en todos los grupos, salvo en el grupo de pacientes Severos, quienes continuaron mostrando niveles descendidos de esta citocina, los cuales fueron estadísticamente diferentes del grupo Controles.

Tabla 9: Concentraciones de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de CPM provenientes de sujetos normales y enfermos de TB (cultivo de 4 días). Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Basal	Tso	Tso a las 36 hs
Controles n=8	32 (8-44.7)	448 (188-1433)	48.6 (31-97.2)
Leves n=6	40 (26.5-63)	255 (36-814)	48.6 (31-97.2)
Moderados n=7	28 (26.5-43.5)	188 (52-824)	33.9 (27.3-184.7)
Severos n=6	4.7 ¶ (4.7-4.7)	23 § (13.5-203)	25.5 (23.6-48.6)

¶ diferente del resto, $p < 0.05$ y § diferencia con Controles, $p < 0.04$

El análisis de los resultados obtenidos cuando se agregó cortisol o DHEA a los cultivos, se representa en la tabla 10. Al igual que lo observado en las mediciones de 36 hs, los SN de las CPM tratadas con cortisol 10^{-6} M presentaron menores concentraciones de IFN- γ , las cuales fueron estadísticamente significativas respecto de los cultivos sin tratar para el caso de los Controles y pacientes Severos. El tratamiento con DHEA no generó modificaciones significativas en los niveles de este mediador cuando cada grupo fue comparado con su contraparte sin hormona. Pudo observarse, sin embargo, que al igual que los Controles los pacientes Leves y Moderados también presentaron niveles significativamente aumentados de IFN- γ respecto de los casos Severos.

Tabla 10: Concentraciones de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de CPM de sujetos normales y enfermos de TB, estimulados con Tso y adicionados de GC o DHEA en diferentes concentraciones (cultivos de 4 días). Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Sin Hormona	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	
Controles n=8	448 (188-1433)	Cortisol 65 ** (30-75)	Cortisol 166 (77-253)				
			DHEA 497 * (290-776)				DHEA 433 * (171-709)
Leves n=6	255 (36-814)	Cortisol 163 (31-271)	Cortisol 227 (28-470)				
Moderados n=7	188 (52-824)	Cortisol 91 (34-406)	Cortisol 87 (31-726)				
Severos n=6	23 (13.5-203)	Cortisol 4.7 ** (4.7-4.7)	Cortisol 4.7 (4.7-4.7)				
Leves n=6	255 (36-814)						DHEA 300 ¶ (39-514)
Moderados n=6	188 (52-824)			DHEA 339 § (39-761)	DHEA 186 § (49-845)	DHEA 321§ (43-1713)	DHEA 235 § (47-1039)
Severos n=6	23 (13.5-203)			DHEA 8.8 (4.7-39)	DHEA 4.7 (4.7-44)	DHEA 4.7 (4.7-41)	DHEA 15.5 (4.7-47)

* Diferencia con los pacientes severos *p<0.01, ¶ p<0.02, § p<0.02

**Diferente del cultivo sin tratamiento, p<0.05

En la tabla 11 se presentan los resultados de los experimentos en los cuales los cultivos fueron tratados simultáneamente con cortisol 10⁻⁶ M y DHEA en distintas concentraciones. Como puede advertirse, el agregado de DHEA (en cualquiera de las concentraciones estudiadas) no modificó la reducción generada por cortisol en los niveles de IFN- γ . Dado que los cultivos combinados con cortisol 10⁻⁷ M arrojan las mismas conclusiones que para la dosis más concentrada de cortisol y tampoco a los 4 días de cultivo aportan mayores datos, los respectivos resultados no se presentan.

Tabla 11: Concentraciones de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de CPM de sujetos normales y enfermos de TB, estimulados con Tso y adicionados con cortisol 10^{-6} M y DHEA en concentraciones decrecientes (cultivos de 4 días). Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Sin Hormona	Cortisol 10^{-6} M	D 10^{-7} M	D 10^{-8} M	D 10^{-9} M	D 10^{-10} M
Controles n=8	448 (188-1433)	65 (30-75)	43 * (22-84)	60 * (35-101)	46 * (19.5-68.6)	39 * (34-74)
Leves n=6	255 (36-814)	163 (31-271)	177 ¶¶ (9-217)	58 (13-189)	122 ¶¶ (18-308)	94 ¶¶ (31-281)
Moderados n=6	188 (52-824)	91 (34-406)	37.6 (28-122)	52 (4.7-147)	44 § (28-137)	39 § (16-172)
Severos n=6	23 (13.5-203)	4.7 (4.7-4.7)	4.7 (4.7-19.6)	4.7 (4.7-4.7)	4.7 (4.7-4.7)	4.7 (4.7-4.7)

*, ¶¶ y § diferente de los pacientes Severos $p < 0.05$

En continuidad con los objetivos del estudio, también se efectuaron las mediciones de TNF- α . Como puede observarse en la tabla 12, los SN de CPM provenientes de los enfermos presentaron niveles menores de este mediador, fundamentalmente en las formas avanzadas; que para el caso de la producción Basal y la inducida por ConA resultó ser estadísticamente significativa respecto de los Controles. Las concentraciones halladas en este grupo también se situaron por encima de los enfermos Moderados.

Tabla 12: Concentraciones de TNF- α en SN de cultivo de CPM de sujetos normales y enfermos de TB (cultivos de 36 hs). Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupos	Basal	Tso	Tso + Oi 0.04%	Con A
Controles n=12	17 \blacklozenge (14.2-31.1)	60.8 (36.6-252.4)	31 (18.4-199.8)	26.2 * (21.1-313.8)
Leves N=10	10.7 (7.8-24.5)	23.2 (12.8-211)	20 (13.8-239.8)	24 (12.3-53.0)
Moderados N=11	17.7 (10.3-37.5)	26.7 (13.2-51.4)	27.5 (23.7-173.7)	18.5 * (9.8-23.8)
Severos n=9	7.8 \blacklozenge (7.8-8.2)	13.9 (9.2-138.4)	13.8 (10.0-93.4)	8.6 * (7.8-10.5)

\blacklozenge diferencia con los pacientes Severos, $p < 0.01$

* diferencia con los pacientes Severos $p < 0.003$ y Moderados $p < 0.05$

En coincidencia con lo observado en las mediciones de IFN- γ , el agregado de cortisol (sobre todo 10^{-6} M) logró descender los niveles de TNF- α , aunque la comparación estadística sólo fue significativa para el caso de los cultivos de los Controles sin hormona (Tabla 13). Los cultivos en los cuales se adicionó DHEA no presentaron mayores diferencias respecto de las contrapartes con cortisol o no tratadas (misma tabla). Al analizar los cultivos tratados con cortisol (10^{-6} M) y dosis crecientes de DHEA pudo observarse que en líneas generales esta última hormona no logró revertir el descenso en los niveles de TNF- α generado por cortisol, para ninguno de los grupos de estudio (Tabla 14).

Tabla 13: Concentraciones de TNF- α en SN de cultivo de 36 hs de CPM provenientes de sujetos normales y enfermos de TB, estimulados con Tso y adicionados de GC o DHEA en diferentes concentraciones. Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Sin Hormona	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	
Controles n=12	60.8 (36.6-252.4)	Cortisol 17.2 * (13.3-28.4)	Cortisol 27 (17.2-45.4)				
			DHEA 33.1 (16.8-272.4)	DHEA 67 (17.1-168.7)	DHEA 28.7 (20.1-53.9)	DHEA 62.1 (19.8-165.2)	
Leves n=10	23.2 (12.8-211)	Cortisol 12.8 (7.8-121.6)	Cortisol 19.6 (7.8-58.9)				
Moderados n=11	26.7 (13.2-51.4)	Cortisol 17.8 (9.4-46.5)	Cortisol 30.8 (17.4-164.4)				
Severos n=9	13.9 (9.2-138.4)	Cortisol 9.9 (9.7-26.5)	Cortisol 13.8 (8.7-48.9)				
Leves n=10	23.2 (12.8-211)			DHEA 36.7 (16.4-71.6)	DHEA 21.1 (7.8-238)	DHEA 19.3 (12.0-254.7)	DHEA 22.4 (9.8-61)
Moderados n=11	26.7 (13.2-51.4)			DHEA 42.4 (12.5-97.3)	DHEA 49.4 (15-69.2)	DHEA 20.0 (13.2-214.7)	DHEA 24.9 (11-73.7)
Severos n=9	13.9 (9.2-138.4)			DHEA 13.5 (12.1-100.7)	DHEA 13.6 (10.5-105.4)	DHEA 43.4 (9.1-166.3)	DHEA 31.9 (8.5-241.6)

*Diferente del cultivo sin tratar, p<0.05

Tabla 14: Concentraciones de TNF- α en sobrenadantes de cultivo de 36 hs de CPM provenientes de sujetos normales y enfermos de TB estimulados con Tso y adicionados con cortisol 10^{-6} M y DHEA en concentraciones decrecientes. Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Sin Hormona	Cortisol 10^{-6} M	DHEA $D10^{-7}$ M	DHEA $D10^{-8}$ M	DHEA $D10^{-9}$ M	DHEA $D10^{-10}$ M
Controles n=12	60.8 (36.6-252.4)	17.2 (13.3-28.4)	17.4 (10.6-39.2)	23.7 (12.9-53.9)	18.2 (16.6-26.3)	20.8 (15.7-30.7)
Leves n=10	23.2 (12.8-211)	12.8 (7.8-121.6)	13.8 (7.8-48.9)	10.6 (7.8-23.1)	9.1 (7.8-89.1)	16.6 (7.8-82.0)
Moderados n=11	26.7 (13.2-51.4)	17.8 (9.4-46.5)	22.0 (11.1-167.2)	20.6 (16.6-59.6)	22.1 (13.5-60.3)	20.6 (10.6-172.8)
Severos n=9	13.9 (9.2-138.4)	9.9 (9.7-26.5)	8.1 (7.8-11.9)	8.9 (7.8-25.3)	9.1 (7.8-12.7)	8.3 (7.8-11.3)

Del mismo modo que ocurriera para IFN- γ , los cultivos combinados con cortisol 10^{-7} M arrojaron las mismas conclusiones que para las combinaciones realizadas con la dosis más concentrada de esta hormona. Por tal motivo, los respectivos resultados no se presentan.

En lo que respecta a las mediciones en los cultivos de 4 días, los valores obtenidos de TNF- α se mostraron aún más descendidos. Excepción de esta observación fueron los cultivos Controles estimulados con ConA, donde se observaron concentraciones significativamente superiores respecto de todos los grupos de pacientes (Tabla 15). Las comparaciones en cuanto al efecto de las hormonas esteroideas sobre la producción de este mediador no arrojaron diferencias ya que los valores hallados se encontraron por debajo de la sensibilidad del método utilizado para su determinación.

Tabla 15: Concentraciones de TNF- α en SN de cultivo de CPM provenientes de sujetos normales y enfermos de TB (cultivos de 4 días). Los datos representan la mediana y percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Grupo	Basal	Tso	Tso a las 36 hs	Con A	Con A a las 36 hs
Controles n=12	7.8 ^a (7.8-7.8)	8.9 (7.8-113.5)	60.8 (36.6-252.4)	108.4 ¶¶ (27.1-442.4)	26.2* (21.1-313.8)
Leves n=10	7.8 ^a	14.3 (7.8-172.5)	23.2 (12.8-211.0)	16.0 (7.8-54.8)	24.0 (12.3-53)
Moderados n=8	7.8 ^a	10.9 (7.8-156.2)	26.7 (13.2-51.4)	7.8 (7.8-39.5)	18.5* (9.8-23.8)
Severos n=6	7.8 ^a	14.2 (7.8-35.5)	13.9 (9.2-138.4)	7.8 (7.8-7.8)	8.6* (7.8-10.5)

^a Los valores se ubicaron siempre en el límite inferior de detección

*diferencia con los pacientes Severos p<0.003 y Moderados p<0.05

¶¶ diferencia con los pacientes Severos p<0.005 y con los Moderados y Leves p<0.03

La tercer citocina evaluada fue IL-10. Seguidamente se presentan los resultados correspondientes. Al igual que para las citocinas anteriormente analizadas, el tratamiento con OI en iguales concentraciones a las empleadas para disolver las hormonas, no generó efecto alguno sobre la producción de IL-10 en ninguno de los grupos de estudio. Los resultados correspondientes a este tratamiento no se presentan ya que los niveles de esta citocina obtenidos fueron similares a los determinados cuando los cultivos fueron sólo tratados con Tso, los cuales se encuentran representados en la tabla 16.

El análisis correspondiente a las determinaciones de los niveles de IL-10 en SN de cultivo de 36 hs, mostró que en los cultivos estimulados con Tso, esta citocina fue en todos los casos superior en el grupo de enfermos TB respecto de los Controles. Sin embargo la tendencia observada no alcanzó el significado estadístico (misma tabla). Cuando se analizaron los cultivos estimulados inespecíficamente con Con A, se observó en contraposición a lo descrito anteriormente, que los enfermos TB mostraban una producción comparativamente menor de IL-10, siendo ello más pronunciado en los casos avanzados (misma tabla).

El tratamiento de cultivos estimulados con cortisol, generó sólo un leve descenso en la producción de IL-10 tanto en Controles como en pacientes Leves y Severos, mostrando a diferencia de lo observado para las otras citocinas estudiadas, cierta resistencia al efecto inhibitorio glucocorticoideo (misma tabla). En todos los casos no se hallaron diferencias respecto

de los cultivos no tratados con esta hormona. Incluso no existieron diferencias en la producción de IL-10 cuando se compararon las dos concentraciones estudiadas del esteroide, ambas fueron equipotentes en su efecto (los resultados correspondientes a cortisol 10^{-7} M no son presentados ya que no aportan nuevos datos).

El agregado de DHEA a los cultivos estimulados tampoco generó cambios en la producción de IL-10 respecto de los cultivos no tratados con hormonas. Todas las dosis de DHEA estudiadas fueron equipotentes en su efecto. En la tabla 16 se muestran los datos correspondientes al tratamiento con DHEA 10^{-7} M como representativos de los restantes tratamientos efectuados con esta hormona.

La misma conclusión se repitió cuando se analizaron los cultivos tratados con la combinación de cortisol (10^{-6} y 10^{-7} M) y DHEA. En ninguno de los casos DHEA pudo revertir el efecto, aunque leve, observado en los cultivos tratados sólo con cortisol. En la misma tabla se muestran como representativos sólo las combinaciones con cortisol 10^{-6} M.

Tabla 16: Niveles de IL-10 en SN de cultivos de 36 hs de CPM pertenecientes a individuos normales y enfermos de TB, estimulados con Con A o Tso en presencia o ausencia de cortisol y / o DHEA. Los valores representan las medianas y los percentilos 25 y 75) (pg/ml).

Tratamiento	Grupos			
	Controles n=13	Leves n=10	Moderados n=11	Severos n=9
Basal	11.3 (5.3-13.7)	8.6 (4.6-52)	13.6 (6.1-93.5)	14.8 (5-20.6)
Tso	63.8 (32.9-120)	98 (36.5-226.3)	111 (72.0-255.6)	104.2 (54-154)
Con A	70 (23.4-155.6) *	55.2 (12.9-126.5)	42.6 (23.9-162.6)	32.2 (21.5-37.7)
Tso + Cortisol 10 ⁻⁶ M	52 (21.4-97.1)	59.2 (27.7-219.8)	119.6 (42.4-211.4)	64.7 (41.3-145.4)
Tso + DHEA 10 ⁻⁷ M	71 (41.3-94.1)	94.7 (42.5-234.7)	107.6 (75.3-251.6)	97.3 (68.4-153.4)
Cortisol 10 ⁻⁶ M +DHEA 10 ⁻⁷ M	39.3 (21-106.9)	58 (26.5-237.4)	99.8 (54.3-168.8)	64 (47.5-131)
+DHEA 10 ⁻⁸ M	43.7 (24.7-85.5)	64.3 (27.4-250.3)	119.5 (44.1-152.8)	54.5 (45.3-137.8)
+DHEA 10 ⁻⁹ M	36.4 (18.6-81.6) ¶¶	60.3 (28.6-246)	135.5 (42.4-210)	63.4 (49.8-164.6)
+DHEA 10 ⁻¹⁰ M	40 (19.6-78.3) ¶¶	56.7 (27.6-238)	145 (43.7-212)	63.6 (47.8-102)

Significativamente diferente de pacientes Severos, * p<0.05

Significativamente diferente de pacientes Moderados, ¶¶ p=0,0346

Los resultados correspondientes a SN de 4 días de cultivo mostraron que los pacientes del grupo Severos presentaron niveles menores de IL-10 que el grupo Controles, aunque las diferencias no alcanzaron significado estadístico (Tabla 17). La misma observación pudo realizarse para los SN de cultivo que fueron estimulados con Con A. En este caso, ambos grupos difirieron significativamente (misma tabla). Como puede observarse, tampoco existieron modificaciones significativas en los niveles de IL-10 a los 4 días de cultivo respecto de los hallados en cultivos más tempranos, para todos los tratamientos efectuados y grupos de estudio. Las conclusiones respecto del efecto de cortisol y DHEA, solos o en combinación, repitieron

aquellas realizadas para cultivos de 36 hs. En la tabla 17 se muestran: como representativos de los tratamientos con DHEA, los resultados hallados para DHEA 10^{-7} M; como representativos de los tratamientos con cortisol, a los resultados hallados para cortisol 10^{-6} M y como representativos de los tratamientos combinados, a la combinación de esta última dosis con las diferentes dosis de DHEA estudiadas.

Tabla 17: Niveles de IL-10 en SN de cultivos de 4 días de CPM pertenecientes a individuos normales y enfermos de TB, estimulados con Con A o Tso en presencia o ausencia de cortisol y / o DHEA. Los valores representan las medianas y los percentilos 25 y 75 (pg/ml).

Tratamiento	Grupos			
	Controles n=13	Leves n=10	Moderados n=11	Severos n=9
Basal	9.7 (7.8-11.1)	12.1 (9.4-24.3)	12.3 (8.6-25.8)	7.8 (7.8-16)
Tso	64.6 (35.5-133)	63.8 (46.7-173.6)	87.1 (37.1-125.2)	40.9 (18.3-61)
Con A	140.2 (77-255) #	109 (28.3-112.3)	116.5 (60.8-149) §	14 (9.5-44.6)
Tso + Cortisol 10^{-6} M	56.7 (36.4-79.2)	38.8 (26-215.9)	84 (48.2-124.4)	29 (25.6-48)
Tso + DHEA 10^{-7} M	50.3 (40-119.2)	55.5 (54.1-209.9)	80.6 (34.2-124.3)	24 (12.8-60.3)
Cortisol 10^{-6} M +DHEA 10^{-7} M	52.3 (36.3-104.3)	41 (25.1-235.4)	83.9 (39-114.2)	40.6 (29-56.8)
+DHEA 10^{-8} M	46.5 (33.9-77.7)	35 (26.4-200.5)	84.9 (55.4-115.7)	36.6 (23-46.2)
+DHEA 10^{-9} M	50.8 (26.5-89.4)	38.5 (26.3-194.4)	72.7 (53.7-111)	50 (24.3-67.2)
+DHEA 10^{-10} M	54.8 (29.7-81.2)	40.7 (31.4-240)	70.6 (54.4-109.9)	30 (19.5-46.7)

Comparaciones entre grupos: Diferentes de pacientes Severos, #p<0.02, §p<0.03

3.e- Determinación de citocinas y hormonas circulantes.

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de IFN- γ , como citocina representativa de un patrón de respuesta inmune Th1, IL-10 como representativas de un patrón Th2; así como de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) con conocido efecto activador del eje HPA.

En lo que respecta a IFN- γ , en la figura 18 se representan las concentraciones plasmáticas halladas. Los enfermos TB mostraron concentraciones plasmáticas superiores de esta citocina respecto del grupo Controles, las cuales se incrementaron proporcionalmente a la severidad de la TB (Medias en pg/ml \pm SE: Leves 38,8 \pm 4,665 ; Moderados 51,7 \pm 8,724 ; Severos 62,9 \pm 13,522). Se hallaron diferencias significativas entre los grupos Controles (25,8 \pm 4,549) vs Moderados ($p=0,03$) y Severos ($p=0,002$).

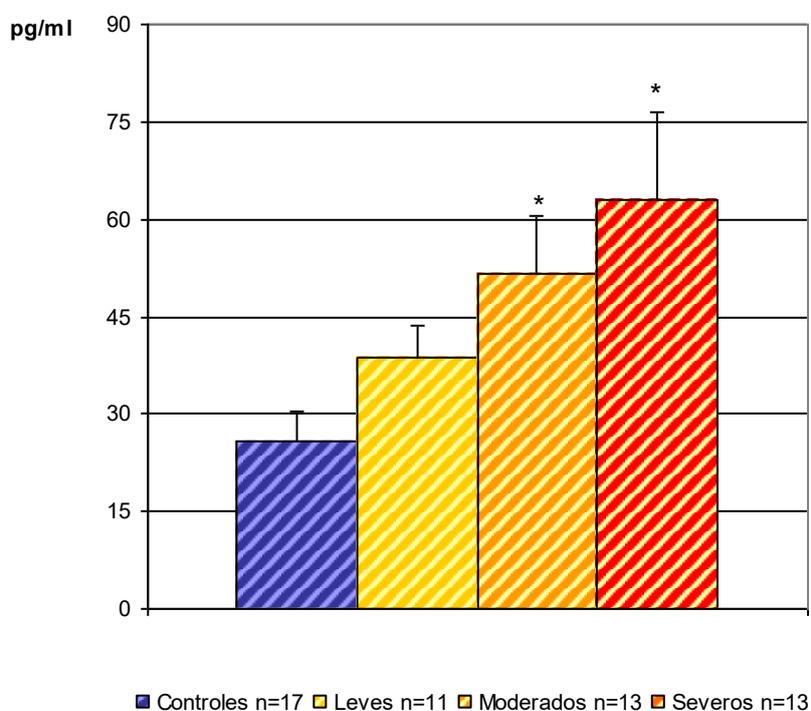


Figura 18 : Concentración plasmática de IFN- γ (pg/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difieren Controles de Moderados $p=0,03$ y Severos $p=0,002$.

Las concentraciones de IL-10, como se observa en la figura 19, mostraron un comportamiento similar al del IFN- γ . En el grupo de pacientes Severos se registraron las mayores concentraciones plasmáticas de IL-10 (Media en pg/ml \pm ES : 12,9 \pm 2,116), las cuales difirieron significativamente de los restantes grupos de estudio (Leves: 6,9 \pm 0,983 , $p=0,006$; Moderados : 7,8 \pm 1,098 , $p=0,02$; Controles : 6,3 \pm 1,241, $p=0,001$).

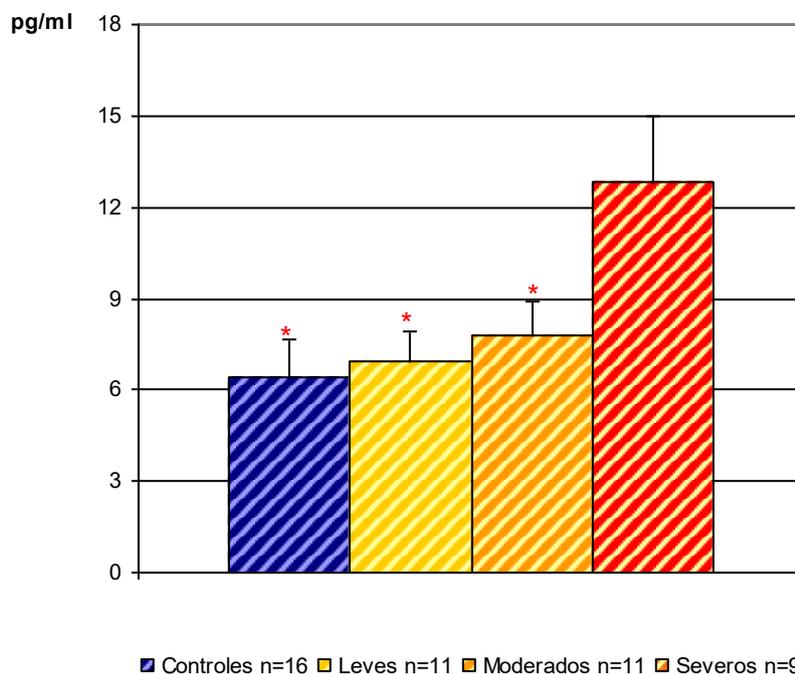


Figura 19 : Concentración plasmática de IL-10 (pg/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difieren los pacientes Severos de Leves $p=0,006$; Moderados $p=0,002$ y Controles $p=0,001$.

Dentro de las citocinas proinflamatorias estudiadas, el TNF- α se observó tanto en el grupo de enfermos como en el grupo Controles vecino al límite de detección del kit utilizado para su determinación. Dado que no se hallaron diferencias significativas entre los grupos no se muestran los correspondientes resultados. IL-6 por su parte, incrementó sus concentraciones plasmáticas proporcionalmente con la severidad de la TB (Medias en pg/ml \pm SE: Leves: $86,98 \pm 19,46$, Moderados: $131,5 \pm 25,495$, Severos $244,4 \pm 42,831$) generando ello diferencias significativas cuando los dos últimos grupos se compararon con el grupo Controles ($27,1 \pm 1,84$); siendo los valores de $p=0,0016$ y $p<0,0001$, respectivamente. Asimismo, dentro del grupo de pacientes TB, el grupo Severos difirió significativamente de los grupos Leves y Moderados ($p<0,0001$ y $p=0,0022$, respectivamente) (Figura 20).

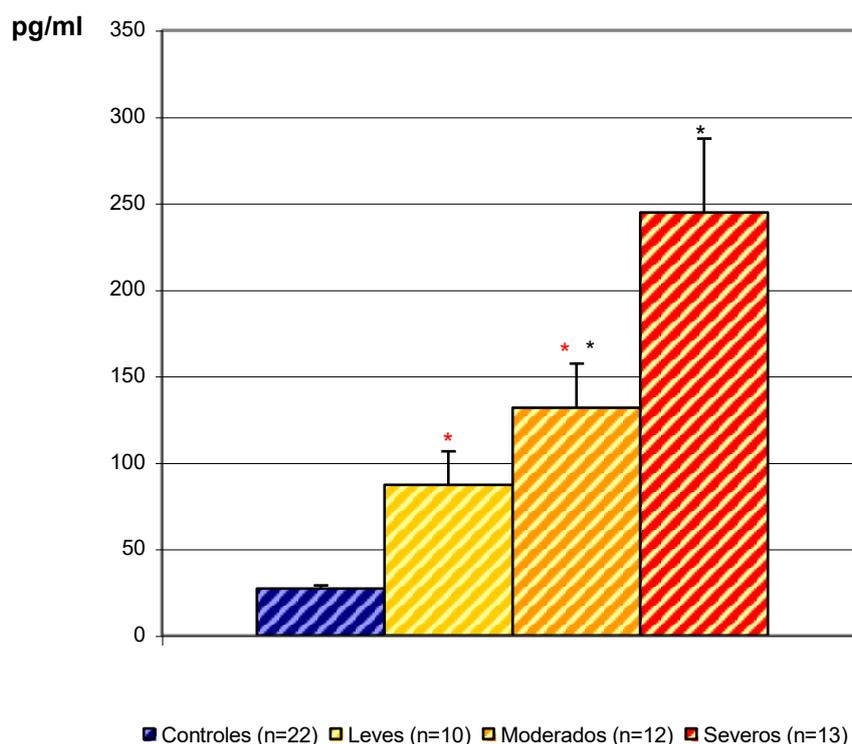


Figura 20 : Concentración plasmática de IL-6 (pg/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difieren Controles de pacientes Moderados $p=0,0016$ y Severos $p=0,0001$; * Difieren pacientes Severos de Leves $p<0,0001$ y Moderados $p=0,0022$.

Con el objetivo de realizar un perfil endócrino del grupo de pacientes y Controles y de esa manera no sólo evaluar el grado de activación del eje HPA sino también el de los restantes ejes que permanecen bajo control hipotálamo-pituitario, fueron determinados en plasma los niveles de cortisol, DHEA, PRL, GH, testosterona, E_2 , T3 y T4.

En lo referente a los niveles de cortisol hallados en plasma, en la figura 21 se representan las concentraciones medias en ng/ml \pm ES. La concentración plasmática para el grupo TB fue de $232,57 \pm 11,962$ ng/ml, la cual se manifestó significativamente superior al valor correspondiente al grupo Controles ($182,62 \pm 15,022$; $p=0,012$). Cuando el grupo TB fue analizado en función de la severidad de la enfermedad, se observó que cada subgrupo difirió significativamente del grupo Controles pero no entre sí (Leves: $235,85 \pm 24,198$; $p=0,015$, Moderados: $239,87 \pm 23,089$; $p=0,007$, Severos: $222,48 \pm 16,188$; $p=0,042$) (Figura 23). Comparado con el grupo Controles, los pacientes TB mostraron un incremento en las concentraciones plasmáticas de esta hormona que osciló entre un 30-40 %.

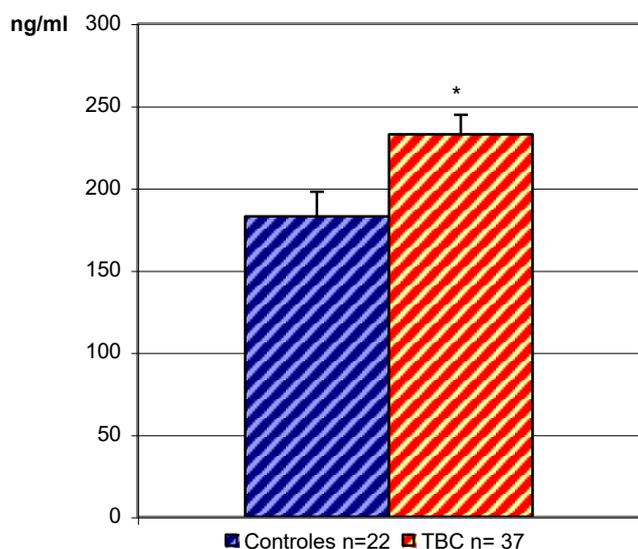


Figura 21 : Concentración plasmática de cortisol (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar. * Difieren de Controles p=0,012.

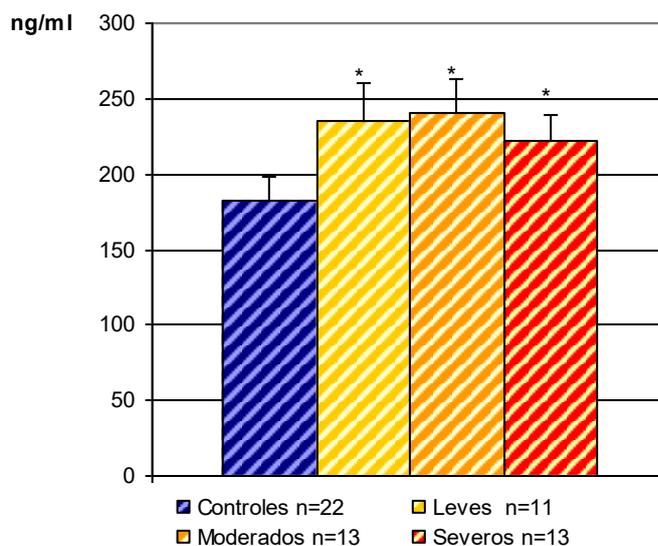


Figura 22 : Concentración plasmática de cortisol (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difieren Controles de pacientes Leves p=0,015, Moderados p=0,007 y Severos p=0,042.

Se efectuaron asimismo correlaciones entre las citocinas determinadas y cortisol. En el grupo de enfermos TB, IL-6 se correlacionó significativamente con los niveles de cortisol plasmático, lo cual se mantuvo para los grupos Moderados y Severos. Este hecho corroboró el rol activador del eje HPA de esta citocina (Figuras 23, 24 y 25).

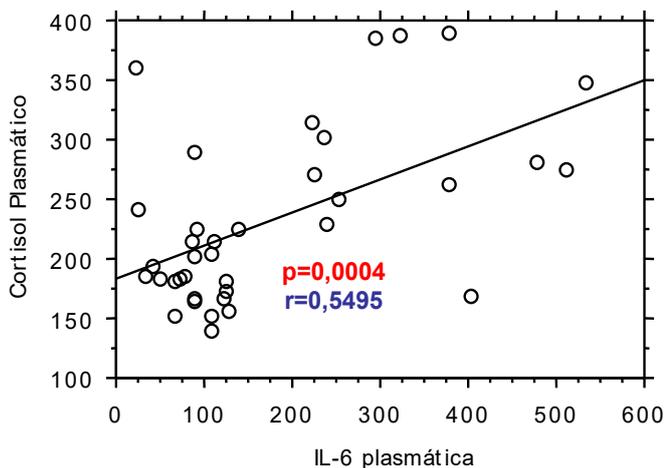


Figura 23 : Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y cortisol en el grupo de enfermos TB sin discriminar la severidad de la enfermedad.

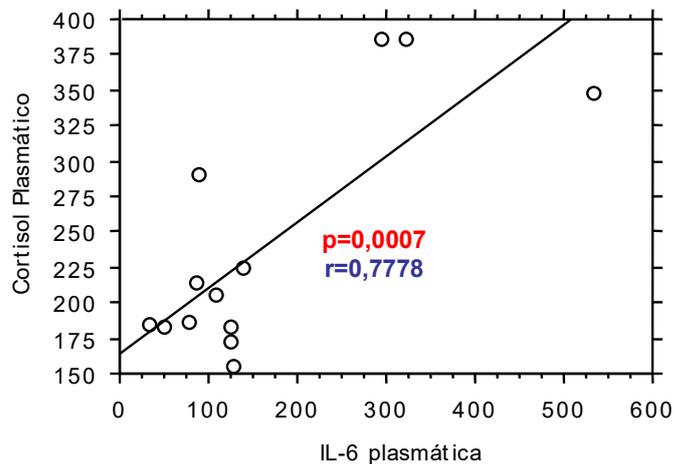


Figura 24 : Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y cortisol en el grupo de enfermos TB Moderados.

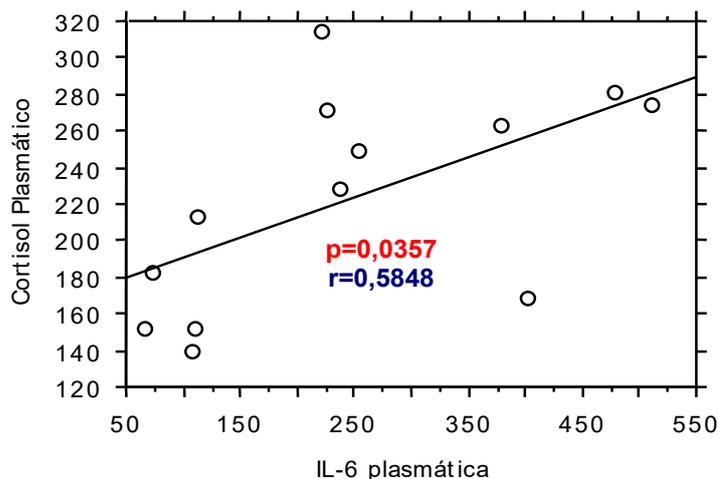


Figura 25 : Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y cortisol en el grupo de enfermos TB Severos.

En contraposición a lo observado respecto de cortisol, la concentración plasmática media de DHEA (ng/ml \pm ES) en el grupo de enfermos TB ($3,85 \pm 0,371$) fue significativamente menor a la hallada en el grupo Controles ($12,13 \pm 1,131$; $p < 0,0001$) (Figura 26). Más aún, las concentraciones plasmáticas de esta hormona disminuyeron proporcionalmente a la severidad de la TB (Leves: $5,3 \pm 0,945$, Moderados: $4,2 \pm 0,508$, Severos: $2,4 \pm 0,166$), lo cual condujo en todos los casos a diferencias altamente significativas cuando se compararon con el grupo Controles ($p < 0,0001$) (Figura 27). El porcentaje de disminución de este andrógeno adrenal osciló entre un 70 a 80 % dependiendo ello del grado de severidad de la enfermedad tuberculosa.

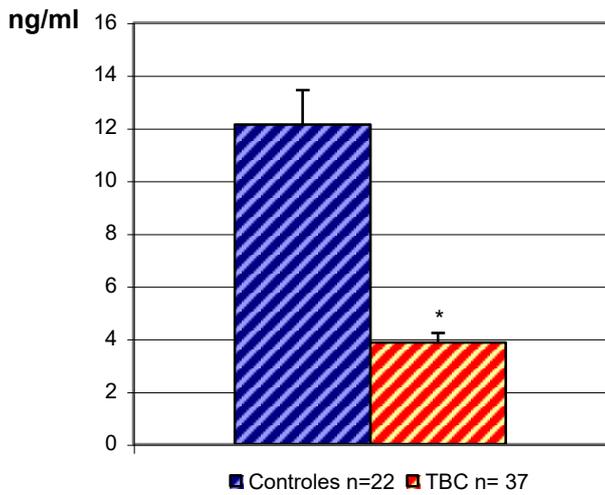


Figura 26 : Concentración plasmática de DHEA (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar.
* Difieren de Controles p<0,0001.

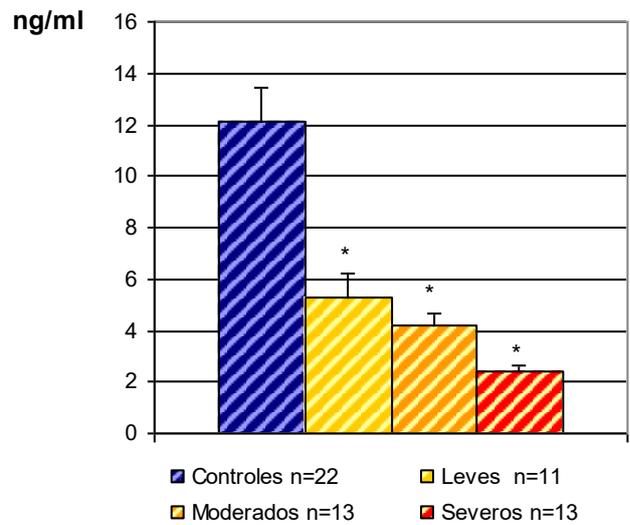


Figura 27: Concentración plasmática de DHEA (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difieren de Conroles p<0,0001.

Del mismo modo que fuera realizado para cortisol, se efectuó la correlación de esta hormona con las citocinas plasmáticas determinadas, tras lo cual pudo observarse que en el grupo Controles, los niveles plasmáticos de DHEA se correlacionaron negativamente con los de IL-6 (Figura 28).

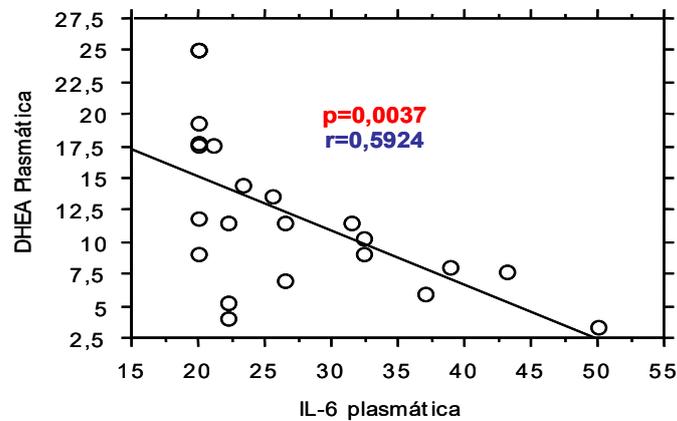


Figura 28 : Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y DHEA en el grupo Controles.

Posteriormente se procedió al cálculo del índice cortisol/DHEA, el cual reveló que el mismo no sólo era significativamente superior en el grupo de pacientes (Controles: $19,24 \pm 2,89$ vs TB: $67,56 \pm 5,11$; $p < 0,0001$), sino que al considerar la severidad de la TB, éste se incrementaba de forma significativa proporcionalmente a la misma (Leves: $43,20 \pm 6,83$, Moderados: $59,94 \pm 6,30$, Severos: $93,35 \pm 6,38$). De este modo, se hallaron diferencias significativas no sólo respecto del grupo Controles sino entre los diferentes subgrupos de severidades entre sí (Figuras 29 y 30).

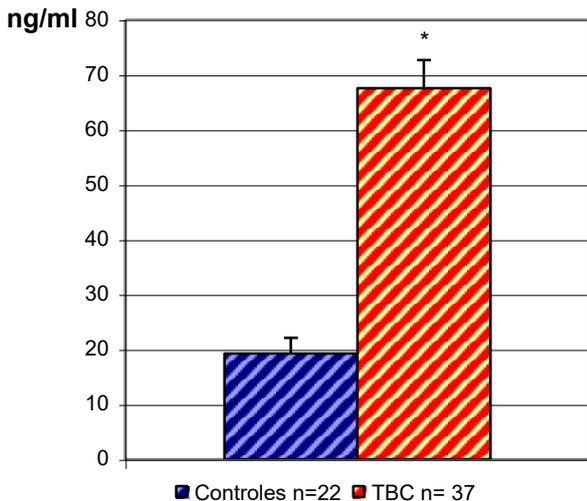


Figura 29 : Índice cortisol / DHEA (media \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar. * Difiere de Controles $p < 0,0001$.

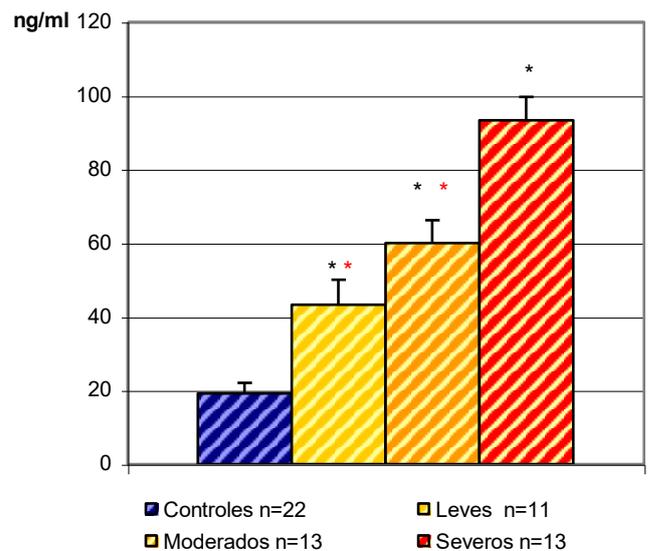


Figura 30 : Índice cortisol / DHEA (media \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difiere de Controles $p < 0,001$, * Difiere de Severos $p < 0,0075$.

Los resultados correspondientes a las mediciones de PRL (medias \pm ES, ng/ml) se representan en la figura 31. Como puede observarse, los pacientes TB presentaron concentraciones plasmáticas de esta hormona significativamente superiores ($12,01 \pm 0,092$) a las halladas en el grupo Controles ($9,63 \pm 0,808$; $p = 0,034$). Al considerar en el grupo de pacientes la severidad de la TB, se observó que los niveles de PRL se elevaron entre un 13-15 % proporcionalmente a la severidad. Al realizar esta consideración, sólo difirió significativamente del grupo Controles el grupo de pacientes Severos ($13,06 \pm 1,148$; $p = 0,01$) (Figura 32). En lo que respecta a GH, los niveles plasmáticos (μ IU/ml) hallados se observaron sorprendentemente elevados en el grupo de pacientes ($5,89 \pm 1,059$; Controles $0,53 \pm 0,035$) conduciendo ello a una diferencia altamente significativa entre ambos grupos ($p = 0,0004$) (Figura 33). Si bien al considerar los distintos subgrupos de pacientes, cada uno continuó difiriendo del grupo Controles,

no se hallaron diferencias singificativas entre los distintos subgrupos de severidad (Leves: $5,06 \pm 1,935$, Moderados: $5,91 \pm 2,114$, Severos: $6,56 \pm 1,634$ (Figura 34).

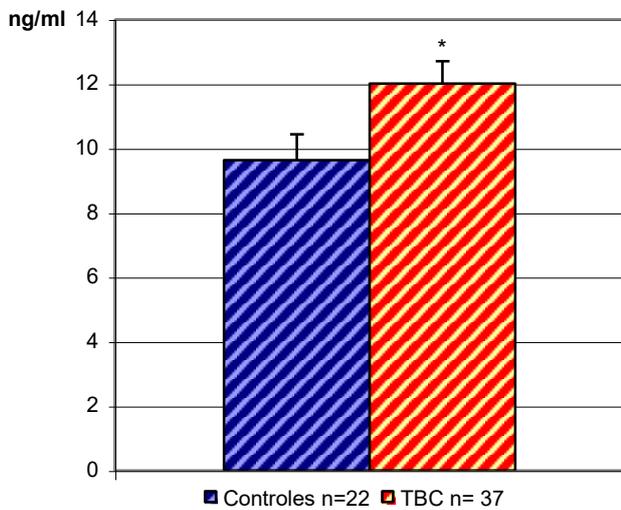


Figura 31 : Concentración plasmática de PRL (ng/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar. * Diferente de Controles p=0,034.

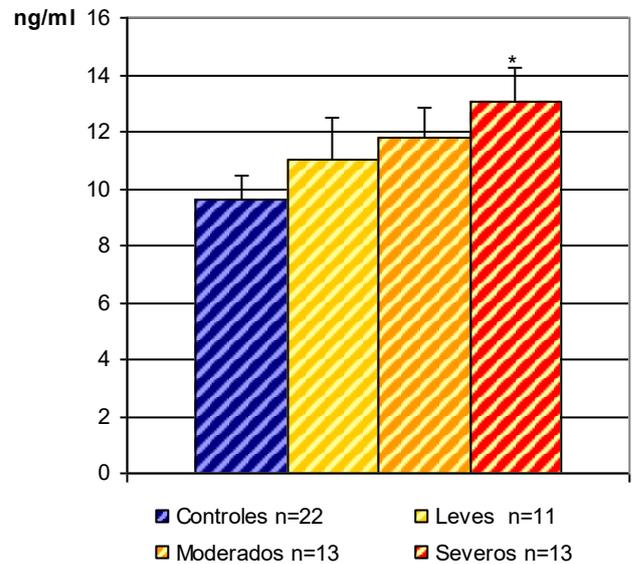


Figura 32 : Concentración plasmática de PRL (ng/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Diferente de Controles p=0,01.

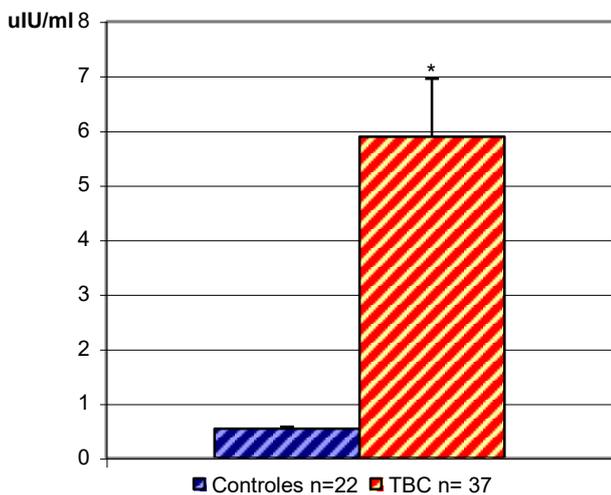


Figura 33 : Concentración plasmática de GH (media \pm ES, μ U/ml) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar. * Diferente del grupo Controles p= 0,0004.

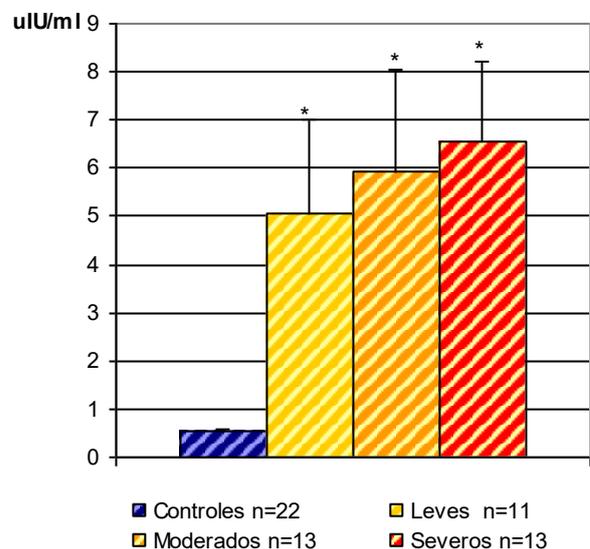


Figura 34 : Concentración plasmática de GH (μ U/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Diferente del grupo Controles p<0,02.

El análisis de las hormonas sexuales testosterona y E₂, fue realizado tanto agrupando ambos sexos como efectuando la discriminación de los mismos. Como se detalla seguidamente, en el caso de la testosterona la tendencia en los grupos de pacientes hombres y mujeres es opuesta.

En primera instancia se analizaron los resultados sin discriminar el sexo de Controles y pacientes. Los enfermos TB presentaron concentraciones plasmáticas de testosterona significativamente menores con respecto al grupo Controles (Controles: 3,50 ± 0,41 , TB: 2,103 ± 0,241 ; p=0,0027) (Figura 35); las cuales tendieron a decrecer conforme la enfermedad incrementó su severidad (Leves: 3,03 ± 0,40 , Moderados: 2,71 ± 0,39 , Severos: 1,85 ± 0,45) diferenciando significativamente al grupo Controles de Moderados y Severos (p= 0,02 y p= 0,0003, respectivamente) (Figura 36).

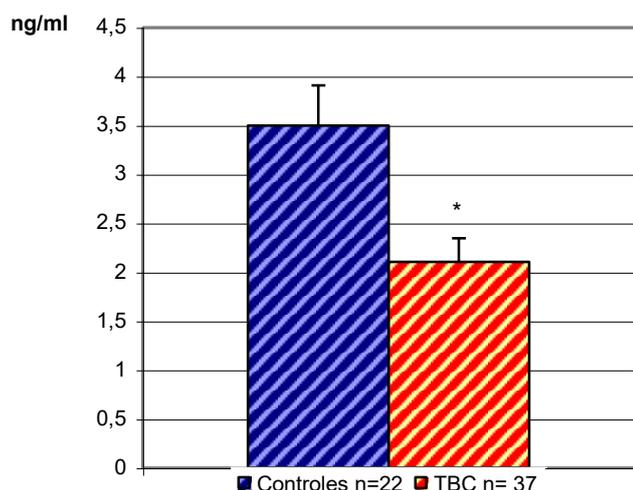


Figura 35 : Concentración plasmática de Testosterona (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar sin discriminar sexo. * Diferente del grupo Controles p<0,002.

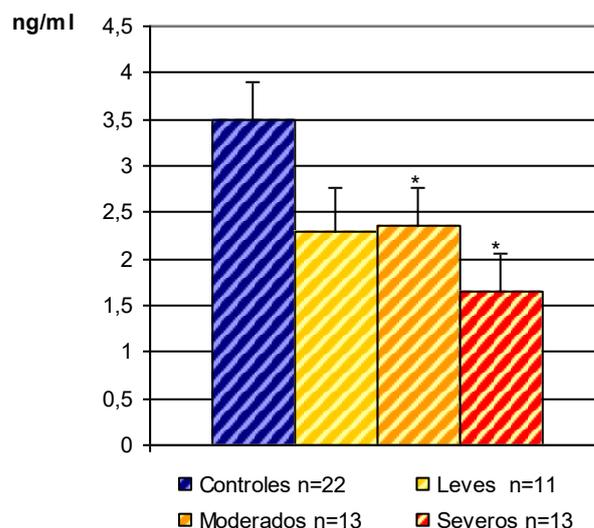


Figura 36 : Concentración plasmática de Testosterona (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad sin discriminar sexo. * Difieren de Controles p<0,05.

Al considerar sólo los individuos del sexo masculino, la tendencia descrita no sólo se mantuvo, sino que disminuyeron las variancias intra grupo y se incrementaron los significados hallados (Figuras 37 y 38). Se observó asimismo mejor el descenso progresivo de las

concentraciones plasmáticas de testosterona conforme se incrementó la severidad de la enfermedad (Controles: $3,99 \pm 0,35$, TB: $2,49 \pm 0,253$, Leves: $3,03 \pm 0,40$, Moderados: $2,71 \pm 0,39$, Severos: $1,85 \pm 0,45$). Ello se debió en primer lugar a que las mujeres presentan habitualmente concentraciones plasmáticas de esta hormona mucho menores y en segundo lugar, a que dentro del grupo de las pacientes el comportamiento de esta hormona en función de la severidad de la enfermedad fue, como se detalla seguidamente, opuesto al descrito para los hombres.

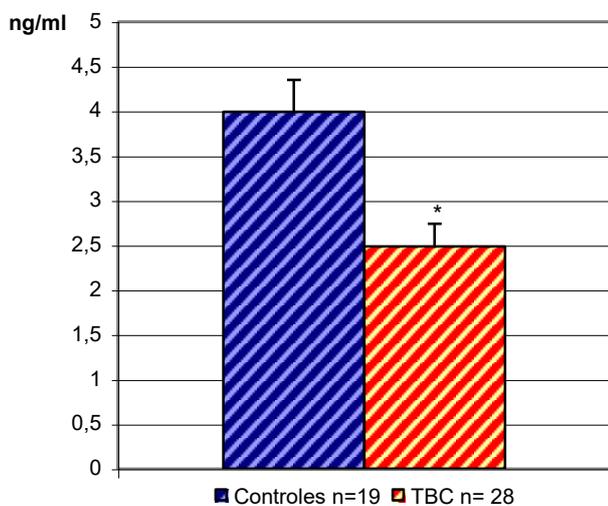


Figura 37 : Concentración plasmática de Testosterona (ng/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de sexo masculino. * Diferente de Controles $p < 0,0009$.

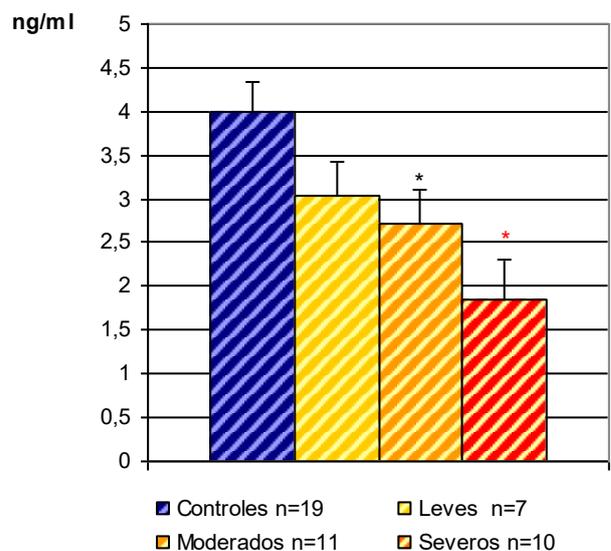


Figura 38 : Concentración plasmática de Testosterona (ng/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad de sexo masculino. *, * Diferente de Controles $p < 0,02$ y $p < 0,0003$, respectivamente.

Las pacientes TB en contraposición, presentaron niveles de testosterona plasmática significativamente superiores a los de las correspondientes Controles (Controles: $0,35 \pm 0,053$, TB: $0,57 \pm 0,04$; $p < 0,023$) (Figura 39). A pesar de tratarse de muestras pequeñas, la separación de las mismas por grupos de severidad, mostró que la testosterona plasmática tendió a incrementarse conforme a la severidad de la TB arrojando diferencias significativas entre los grupos Leves ($0,58 \pm 0,03$) y Severos ($0,65 \pm 0,06$) respecto del grupo Controles ($p < 0,028$ y $p < 0,015$, respectivamente) (Figura 40).

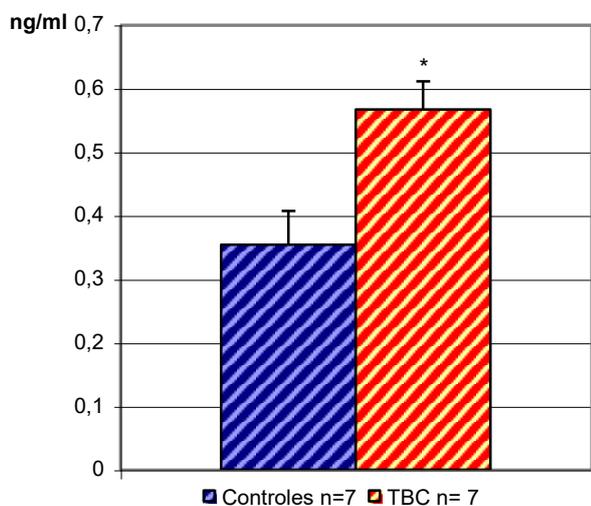


Figura 39 : Concentración plasmática de Testosterona (ng/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de sexo femenino. * Diferente de Controles $p < 0,023$.

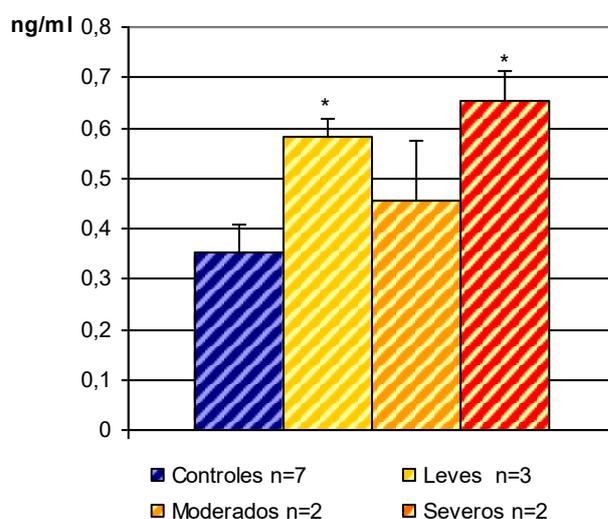


Figura 40 : Concentración plasmática de Testosterona (ng/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad de sexo femenino. * Diferente del grupo Controles $p < 0,028$.

Cuando se compararon las concentraciones de E₂ (pg/ml) sin discriminar sexo ni severidad de la enfermedad, se vio que los enfermos presentaron concentraciones significativamente superiores a las de los Controles (TB: 44,52 \pm 4,53 , Controles: 28,69 \pm 1,55 ; $p = 0,01$) (Figura 41). Cuando se observó el comportamiento de cada grupo de severidad, los niveles de E₂ se incrementaron proporcionalmente a la misma. El grupo Severos registró las mayores concentraciones de esta hormona (57,73 \pm 10,86) difiriendo significativamente de los restantes grupos (Moderados: 38,27 \pm 3,39 ; $p = 0,023$, Leves: 35,72 \pm 4,60 ; $p = 0,012$, Controles $p = 0,0002$) (Figura 42).

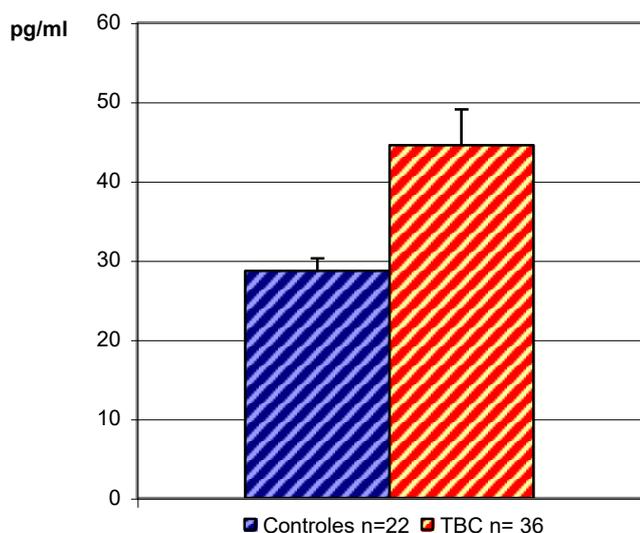


Figura 41: Concentración plasmática de Estradiol (pg/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar sin discriminar sexo. * Difieren del grupo Controles p=0,010.

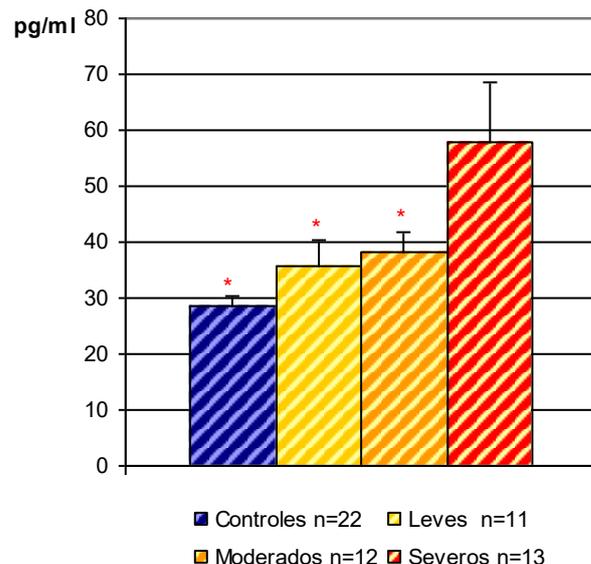


Figura 42: Concentración plasmática de Estradiol (pg/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad sin discriminar sexo. * Difieren del grupo Severos p<0,02.

Al analizar los Controles y pacientes hombres, se observaron las mismas tendencias que las recientemente descritas. El grupo de pacientes TB difirió significativamente del grupo Controles (TB: 36,44 ± 1,89 , Controles: 28,077 ± 1,45 ; p=0,002); y a su vez, los niveles de E₂ se incrementaron conforme a la severidad de la enfermedad, difiriendo significativamente el grupo Moderados y Severos del grupo Controles (Moderados: 38,18 ± 3,56 ; p=0,005 , Severos: 37,16 ± 3,27 ; p=0,012). Como puede verse, al eliminar a las mujeres, las variaciones intra grupo disminuyeron y los significados se incrementaron (Figura 43) dado que las mujeres presentan normalmente valores plasmáticos mayores que los hombres de esta hormona. Más aún, el sexo femenino mostró en nuestro estudio mayor variación intra grupo como puede observarse en los resultados que seguidamente se presentan.

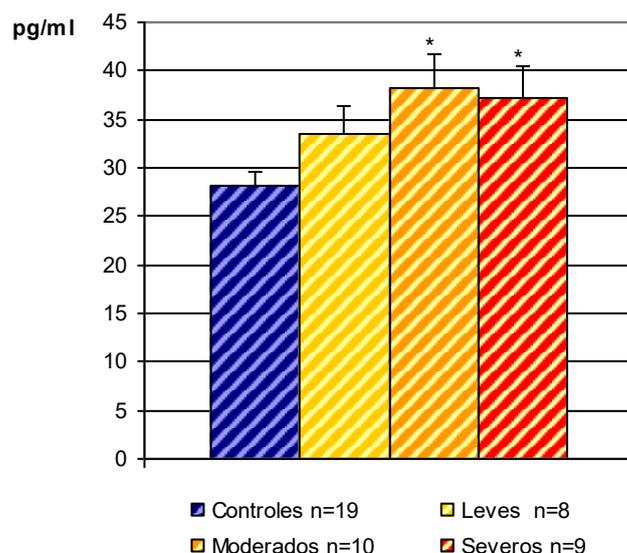


Figura 43 : Concentración plasmática de Estradiol (pg/ml \pm ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad de sexo masculino. * Difieren del grupo Controles $p < 0,012$.

Considerando sólo las mujeres, las tendencias se mantuvieron; sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los grupos aún cuando se agruparon los pacientes sin considerar la severidad de la TB (Controles: $32,56 \pm 7,56$, TB: $51,36 \pm 10,91$, Leves: $41,75 \pm 16,75$, Moderados: $38,71 \pm 13,71$, Severos: $78,42 \pm 20,93$; NS).

Al correlacionar las citocinas plasmáticas determinadas con los niveles de E_2 , se vio que IL-6 en el grupo de enfermos TB, se encontró fuertemente correlacionada con los niveles de esta hormona. Al considerar la severidad de la TB, tal correlación positiva se mantuvo en los grupos Moderados y Severos (Figuras 44, 45 y 46).

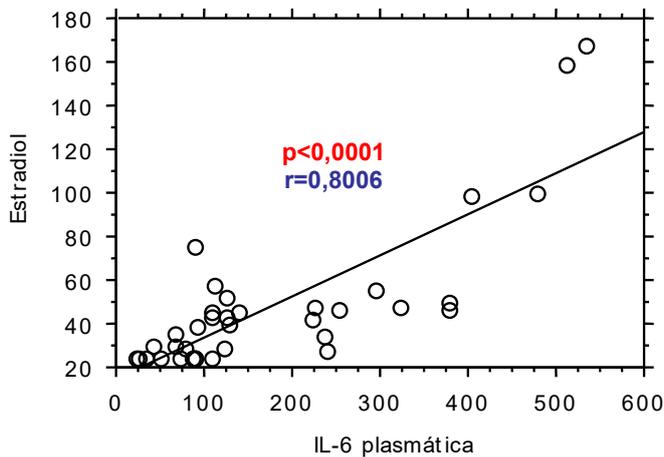


Figura 44: Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y Estradiol en el grupo de enfermos TB.

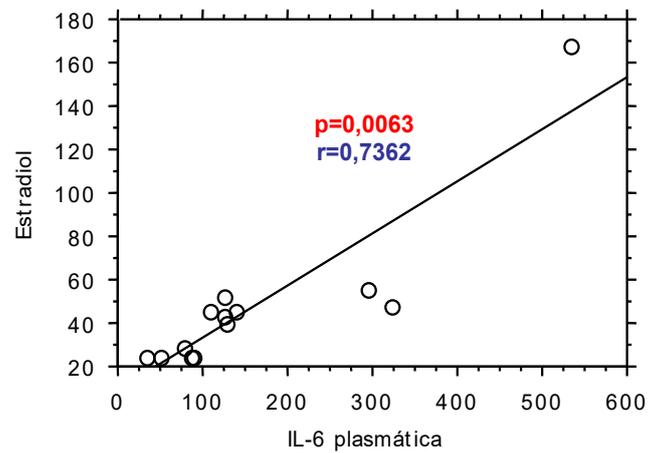


Figura 45: Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y Estradiol en el grupo de enfermos Moderados.

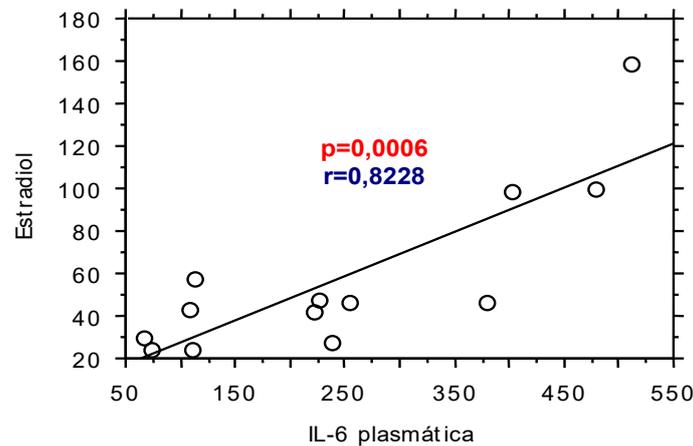


Figura 46: Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y Estradiol en el grupo de enfermos Severos.

Respecto a la determinación de las hormonas tiroideas plasmáticas, tanto para T4 ($\mu\text{g/dl}$) como para T3 (ng/dl) los pacientes presentaron concentraciones significativamente superiores cuando se compararon con el grupo Controles (T3: Controles: $1,24 \pm 0,09$, TB: $1,68 \pm 0,09$; $p=0,003$ y T4: Controles: $4,19 \pm 0,24$, TB: $5,09 \pm 0,21$; $p=0,008$) (Figuras 47 y 49). Asimismo, para ambas hormonas los niveles plasmáticos se incrementaron conforme lo hizo la severidad de la TB. Tal como se representa en la figura 48, los niveles plasmáticos de T3 fueron en los grupos Moderados ($1,79 \pm 0,10$) y Severos ($1,82 \pm 0,19$) significativamente superiores que los de los Controles ($p=0,003$ y $p=0,002$, respectivamente) y Leves ($1,38 \pm 1,16$; $p=0,05$ y $p=0,03$, respectivamente). En el caso de T4 (Figura 50) sólo difirieron significativamente los pacientes Moderados ($5,31 \pm 0,38$) del grupo Controles ($p=0,01$).

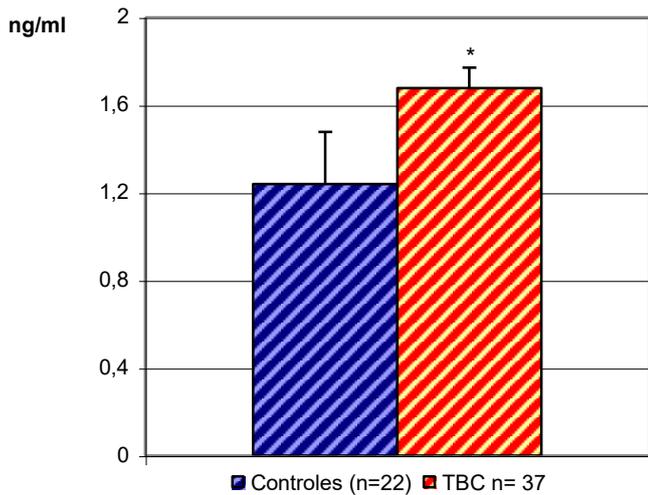


Figura 47 : Concentración plasmática de T3 (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar. * Diferentes de Controles p=0,003.

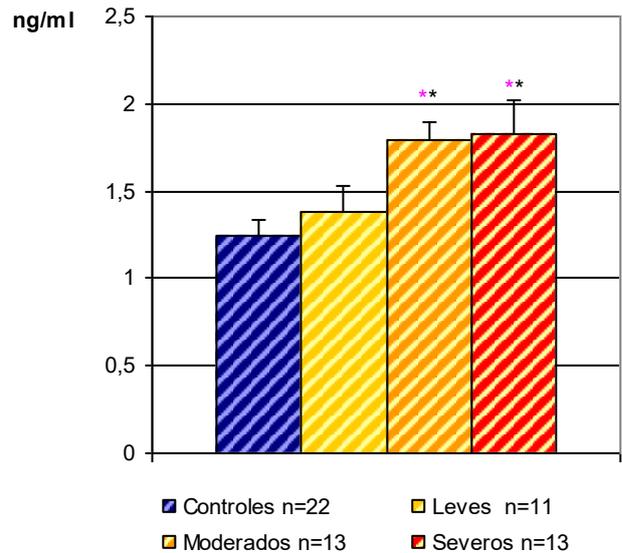


Figura 48 : Concentración plasmática de T3 (ng/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Diferentes de Controles p<0,003 y * diferentes de Leves p<0,05.

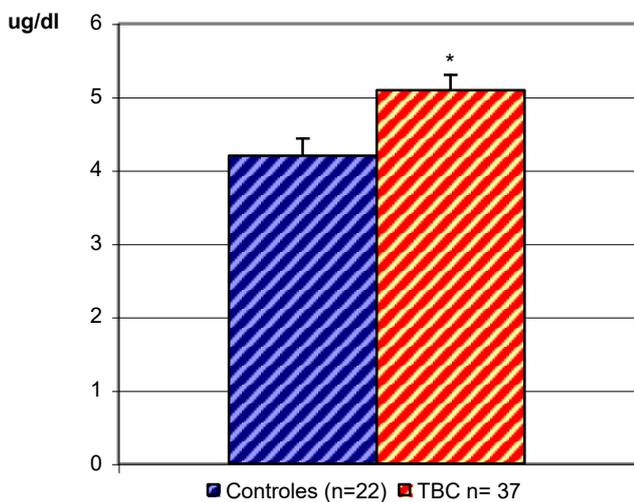


Figura 49 : Concentración plasmática de T4 (μg/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar. * Difiere del grupo Controles p=0,008.

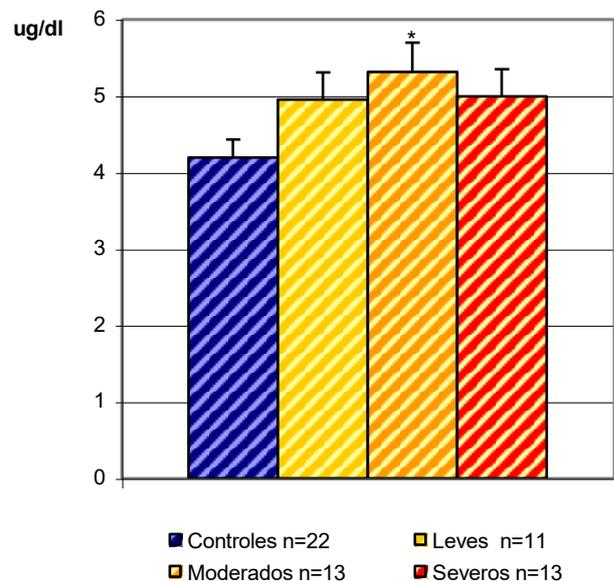


Figura 50 : Concentración plasmática de T4 (μg/ml ± ES) hallada en individuos normales y enfermos de TB pulmonar de diferente severidad. * Difiere del grupo Controles p=0,01.

3.g- Efecto de los sobrenadantes de cultivo sobre la secreción de esteroides.

De acuerdo con los objetivos del estudio, finalmente se determinaron los niveles de cortisol y DHEA en los sobrenadantes de cultivo de la línea humana adrenal H295-R. Para el caso de cortisol, los valores registrados en los sobrenadantes de la línea no expuesta o tratada con pools de sobrenadantes (SN) de CPM (sea de pacientes como de controles sanos, cultivadas durante 36 hs o 4 días), se encontraron en el límite inferior de la curva estándar sin presentar diferencias estadísticas. Por tal motivo, tales resultados no se presentan.

Para el caso de DHEA, en la línea celular tratada con pools de SN de 36 hs no se pudo observar un efecto marcado de dosis para las dos diluciones de SN de cultivos de CPM utilizadas. Ambas concentraciones mostraron las mismas tendencias, por lo cual se muestran seguidamente sólo los datos correspondientes a los cultivos tratados con 200 µl de pools de SN de 36 hs.

Para facilitar la comprensión de los resultados presentados, seguidamente se muestra una tabla donde se esquematizan los tratamientos realizados sobre la línea celular adrenal.

Tratamientos sobre la línea NCI-H295-R	Tipo de SN de CPM adicionado	Agregado de Forskolin (F)	Agregado de Tso (10 µg/ml)
Control	SIN el agregado de SN de CPM. Sólo 100 µl DMEM / F12 completo	Si (100 µl en DMEM / F12 completo)	Si (en RPMI completo 200 µl) ^a
			No (sólo RPMI completo 200 µl) ^b
		No Sólo 100 µl más DMEM / F12 completo	Si (en RPMI completo 200 µl) ^c
			No (sólo RPMI completo 200 µl) ^d
Pool de SN de CPM Normales de 36 hs	Basales (CPM sin estímulo antigénico)	Si	No se agrega Tso a los cultivos tratados con pools
		No	
	CPM estimuladas con Tso, 10 µg/ml	Si	
		No	
Pool de SN de CPM de enfermos Leves o Moderados o Severos de 36 hs	Basales (CPM sin estímulo antigénico)	Si	No se agrega Tso a los cultivos tratados con pools
		No	
	CPM estimuladas con Tso, 10 µg/ml	Si	
		No	

En primer lugar, se evaluó la producción de DHEA en cada grupo de estudio para la línea tratada con SN de cultivos Basales y estimulados con Tso. Los resultados se refirieron siempre a su correspondiente Control (^a, ^b, ^c y ^d de la Tabla de tratamientos) y se expresaron como producción porcentual media de DHEA para cada grupo respecto del Control \pm SE (DHEA en cultivo analizado \times 100 / DHEA en su respectivo Control). Se observó que tanto para cultivos tratados con SN Basales como para aquellos expuestos a sobrenadantes de CPM estimuladas con Tso (SN-Tso), la producción en todos los grupos de estudio fue significativamente menor respecto de su Control: SN Basales: Control: $99,812 \pm 2,256$; Normales: $72,09 \pm 10,391$, $p=0,02$; Leves: $78,258 \pm 1,783$, $p=0,049$; Moderados: $55,310 \pm 7,183$, $p=0,0031$; Severos: $55,582 \pm 2,439$, $p=0,0032$. Asimismo difirieron significativamente los cultivos tratados con pooles de SN de pacientes Leves vs Moderados y Severos ($p<0,041$) (Figura 51). SN-Tso: Control: $99,997 \pm 8,716$; Normales: $57,643 \pm 4,660$, $p=0,046$; Leves: $53,029 \pm 17,413$, $p=0,033$; Moderados: $57,154 \pm 12,231$, $p=0,044$; Severos: $25,160 \pm 9,784$, $p=0,005$. A diferencia de lo que se observó cuando la línea se enfrentó a pooles de SN Basales, el tratamiento con pooles de SN-Tso, no mostró diferencias en la producción de DHEA según los tipos de SN-Tso para grupos de pacientes (misma figura). Los datos de la Tabla 18 muestran las comparaciones en cuanto a la producción absoluta de DHEA teniendo en cuenta los diferentes tipos de pooles de SN respecto de los correspondientes controles (que no estaban enfrentados a los pooles de SN). Pudo observarse que el agregado de Tso “*per se*” no generó una disminución en la producción de DHEA (3.379 ± 0.076 vs 3.243 ± 0.283 sin F, 13.66 ± 0.182 vs 12.61 ± 0.431 con F) mientras que en las células tratadas con pooles de SN-Tso (tanto de pacientes como de individuos normales) sí se verificó una reducción en las concentraciones de DHEA, respecto de las células expuestas a SN basales. Esta tendencia logró significado estadístico para el caso en que se utilizaron SN-Tso de pacientes Leves y Severos (sin F) o los 3 grupos de pacientes (con F). En síntesis puede postularse que el Tso no ejercería un efecto directo inhibitor sobre la secreción de DHEA.

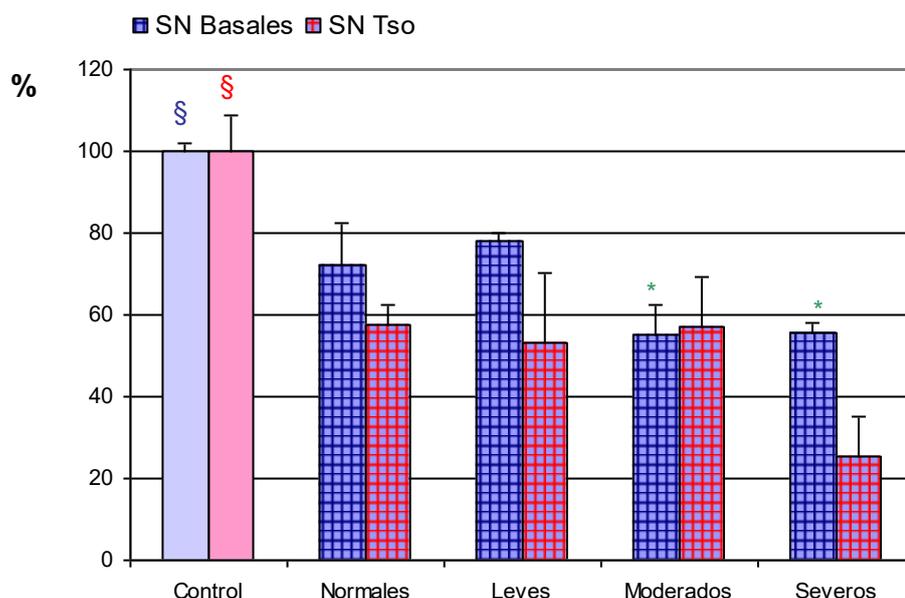


Figura 51 : Producción porcentual media de DHEA (% \pm SE) en cada grupo de estudio respecto de su Control[#] para sobrenadantes de 48 hs de cultivos de células H295-R (SN-In) tratadas con pools de SN de cultivo de CPM de 36 hs Basales y estimulados con Tso. [#]Los controles corresponden a las casillas **d** (control de SN Basales) y **c** (control de SN Tso) de la tabla de tratamientos (pág.92).

§ y § Difieren de los restantes grupos $p < 0,05$. * Difieren de pacientes Leves $p < 0,041$.

Tabla 18: Producción de DHEA (ng/ml) en cultivos de 48 hs de la línea celular H295-R tratados con pools de SN de cultivos de 36 hs de CPM Basales y estimulados con Tso con y sin co-estímulo con Forskolin (F).

	Cultivos tratados con SN Basales	Cultivos tratados con SN Tso	Cultivos tratados con SN Basales + F	Cultivos tratados con SN Tso + F
Control †	3,379 (0,076)	3,243 (0,283)	13,660 (0,182)	12,614 (0,431)
Normales	2,440 (0,352)	1,870 (0,151)	6,080 (1,028)	5,944 (0,097)
Leves	2,649 (0,06)	1,720 (0,565) *	6,162 (0,349)	4,189 (0,318) *
Moderados	1,872 (0,243)	1,854 (0,397)	6,349 (0,115)	4,982 (0,094) *
Severos	1,881 (0,083)	0,816 (0,317) *	5,511 (0,506)	3,793 (0,032) *

† Los controles representados corresponden a ubicados en las celdas ^{a-d} de la tabla de tratamientos. En estos casos la línea no fue expuesta a los pools de sobrenadantes. Los datos indican la concentración media de DHEA \pm SE. * Diferencia con los cultivos Basales $p < 0,04$ (prueba de comparación para datos apareados, Wilcoxon test).

A continuación se procedió a evaluar aquellos cultivos que fueron a su vez estimulados con F (un activador de la adenilato ciclasa). Como se observa en la figura 52, donde se representa la producción porcentual de DHEA por la línea expuesta a los mismos pooles de SN (Basales y SN-Tso) ahora co-estimulados con F, las diferencias en la producción de este andrógeno halladas entre los Controles (^a y ^b de la tabla de tratamientos) y los restantes grupos de estudio se incrementaron aún más: SN Basales + F: Control: $100,00 \pm 1,336$; Normales: $44,510 \pm 7,524$; Leves: $45,112 \pm 2,558$; Moderados: $46,478 \pm 0,842$; Severos: $40,346 \pm 3,703$; $p < 0,0002$. En contraste con lo descrito cuando la línea era tratada con pooles de SN Basales sin F (Figura 51), tras la coestimulación con dicho compuesto no se hallaron diferencias entre los distintos grupos de estudio (normales y tipo de pacientes). Al analizar la producción de DHEA cuando se emplearon los SN-Tso coestimulados con F los resultados fueron: Control (^a de la tabla de tratamientos): $99,997 \pm 3,421$; Normales: $47,121 \pm 0,768$; Leves: $33,211 \pm 2,520$; Moderados: $39,501 \pm 0,746$; Severos: $30,071 \pm 0,253$; $p < 0,0001$. En contraposición a lo que ocurrió para la línea tratada con pooles de SN-Tso no adicionados con F, en este caso también se constataron diferencias significativas en la producción de DHEA entre los grupos de estudio; Normales vs pacientes Leves, Moderados y Severos ($p=0,0041$, $p=0,040$ y $p=0,0017$, respectivamente) y pacientes Moderados vs Severos ($p=0,0193$). Se observó asimismo, que para las células expuestas a SN-Tso de pacientes, la producción de DHEA tendió a decrecer conforme se incrementaba la severidad de la enfermedad.

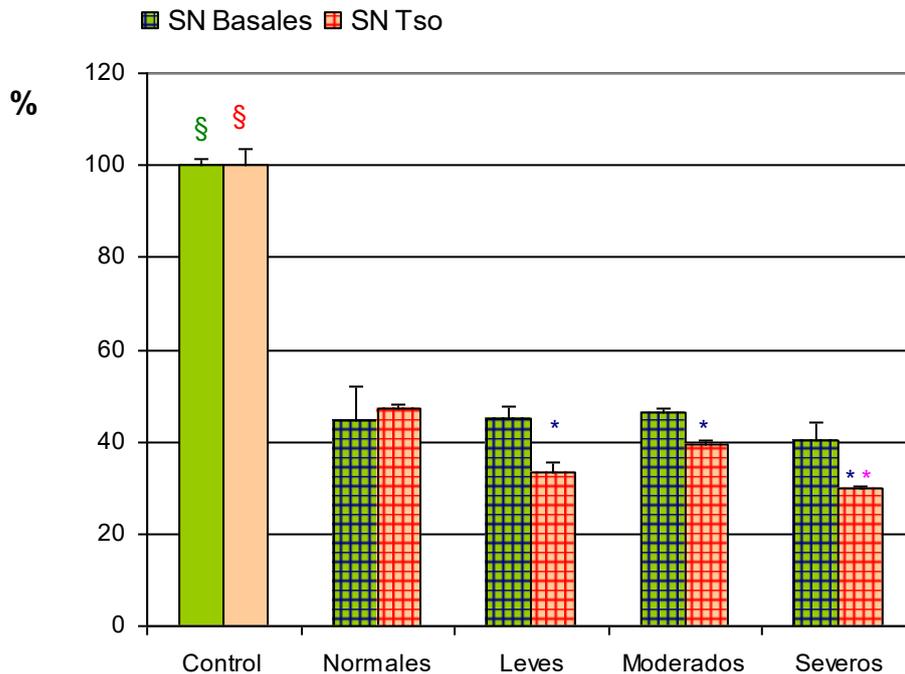


Figura 52 : Producción porcentual media de DHEA (% \pm SE) en cada grupo de estudio respecto de su Control[#] para SN-In de 48 hs de cultivos de células H295-R tratadas con pooles de SN de cultivo de CPM de 36 hs Basales y estimulados con Tso adicionados con Forskolin. [#]Los controles corresponden a las casillas **b** (control de SN Basales estimulados con F) y **a** (control de SN Tso estimulados con F) de la tabla de tratamientos (pág.92). § y § Difieren de los restantes grupos $p < 0,0002$. * Difieren de Normales $p < 0,04$ y * difiere de Moderados $p = 0,0193$.

El agregado de Forskolin a los cultivos, generó en todos los casos un incremento relativo en la producción de DHEA respecto del tratamiento equivalente no estimulado con F. Como se representa en la tabla 19 este aumento fue variable en los distintos grupos de estudio (entre 3 y 5 veces respecto del cultivo equivalente no co-estimulado). Para las células expuestas al Tso (sea por el agregado directo o tratamiento con pooles de SN-Tso), el incremento en la producción de DHEA que ocasionó el agregado de Forskolin fue similar en todos los grupos de estudio, no arrojando diferencias entre los mismos. Para el caso de cultivos Basales co-estimulados (primera columna de la Tabla 19), el tratamiento Control mostró un incremento mayor, que difirió del observado en las células tratadas con pooles de SN Basales provenientes de enfermos tuberculosos Leves.

Tabla 19: Incremento porcentual de la producción de DHEA (cultivos tratados con F/ cultivos no tratados con F x 100) en cultivos de 48 hs de la línea celular H295-R tratados con pooles de SN de cultivos de 36 hs de CPM Basales y estimulados con Tso, adicionados con Forskolin respecto de cultivos no estimulados con Forskolin.

	Cultivos tratados con SN Basales + Forskolin	Cultivos tratados con SN Tso + Forskolin
Control †	404,617 (14,545)	390,706 (20,751)
Normales	260,635 (79,686)	320,412 (31,086)
Leves	232,434 * (7,896)	279,789 (110,352)
Moderados	345,721 (51,044)	282,806 (65,592)
Severos	292,298 (14,061)	549,398 (217,556)

† Los controles representados corresponden a ubicados en las celdas ^c y ^d de la tabla de tratamientos. En estos casos la línea no fue expuesta a los pooles de sobrenadantes. Los datos expresados indican el valor porcentual medio \pm SE. * Diferencia con el Control $p < 0,0378$.

Como pudo observarse hasta ahora en todos los análisis realizados, la línea que fue tratada con pooles pertenecientes a enfermos tuberculosos, tendió a producir menor cantidad de DHEA respecto de las células que fueron enfrentadas a pooles provenientes de cultivos de individuos Normales. Por tal motivo se decidió considerar el efecto que ejerció el hecho de padecer TB sobre la producción de DHEA. Para ello se consideró como 100% de la producción de DHEA a las concentraciones registradas en las células tratadas con SN provenientes de individuos Normales. De este modo, la producción porcentual de DHEA para los restantes grupos fue calculada de la siguiente manera: concentración de DHEA en el cultivo a analizar para un determinado SN de pacientes / concentración de DHEA determinada para las células tratadas con pooles Normales para el mismo tipo de tratamiento x 100. En los gráficos 53 y 54 se expresan los correspondientes resultados:

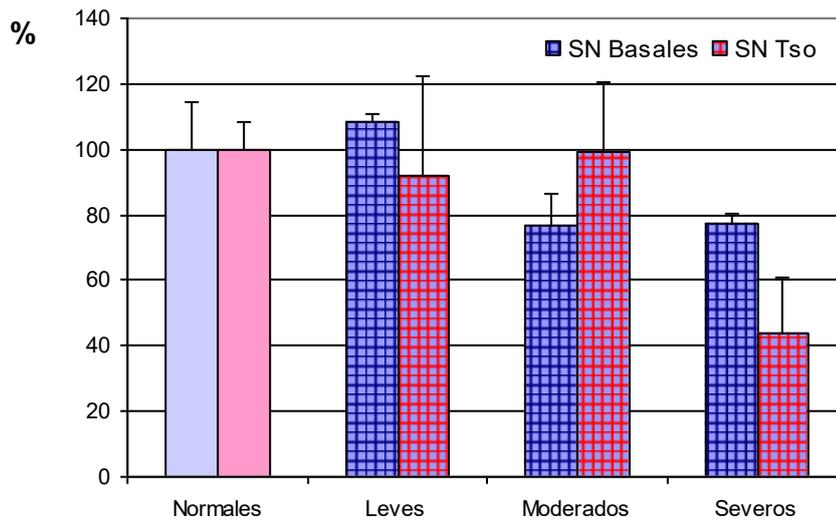


Figura 53 : Efecto de la enfermedad TB sobre la producción porcentual media de DHEA (% \pm SE) para SN-In de 48 hs de cultivos de células H295-R tratadas con pools de SN de cultivo de CPM de 36 hs Basales y estimulados con Tso. Nota: Las barras correspondientes a Normales se encuentran en otro color para mejorar la visualización de los resultados.

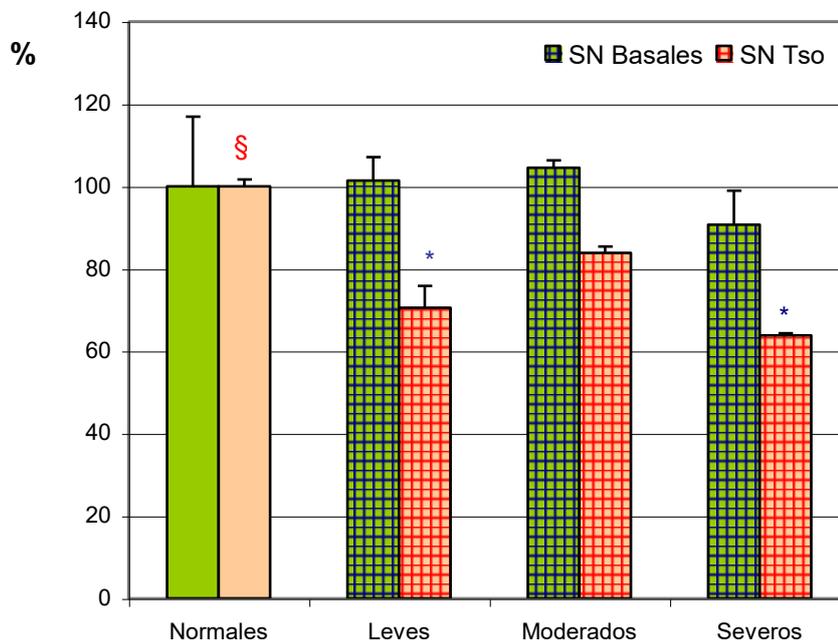


Figura 54 : Efecto de la enfermedad TB sobre la producción porcentual media de DHEA (% \pm SE) para SN-In de 48 hs de cultivos de células H295-R tratadas con pools de SN de cultivo de CPM de 36 hs Basales y estimulados con Tso adicionados con Forskolín. Nota: Las barras correspondientes a Normales se encuentran en otro color para mejorar la visualización de los resultados. § Difiere de los restantes grupos $p < 0,02$. * Difieren de pacientes Moderados $p < 0,03$.

En lo que respecta a la figura 53, se observó que tanto para las células tratadas con pooles de pacientes Basales y SN-Tso, el padecer TB no parece ser un factor condicionante para la menor producción de DHEA, ya que no existieron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, pudo observarse que en ambos casos, a medida que la severidad de la TB se incrementaba, la producción de DHEA descendía. En la gráfica siguiente (figura 54) se comprueba que al co-estimular las células con F, aquellas tratadas con SN de cultivos Basales tampoco revelaron diferencias entre los grupos (normales vs pacientes y éstos entre sí). Por el contrario, cuando se agregó F a los SN-Tso, se observó que las células tratadas con pooles de SN de pacientes produjeron entre un 30 y un 40 % menos de andrógeno respecto de las tratadas con pooles de Normales. Esto se tradujo en diferencias significativas entre los grupos: Normales: $100,002 \pm 1,630$; Leves: $70,482 \pm 5,347$, $p=0,0020$; Moderados: $83,830 \pm 1,582$, $p= 0,0172$; Severos: $63,817 \pm 0,536$, $p=0,0009$. Asimismo difirieron en la capacidad de producir DHEA las células tratadas con SN-Tso de pacientes de diferente severidad. Las células tratadas con pooles de SN de pacientes Moderados fueron las que menos disminuyeron su capacidad para producir DHEA, difiriendo significativamente de las células tratadas con pooles de enfermos Severos ($p=0,0083$) y Leves ($p=0,0318$).

Los resultados correspondientes a los cultivos tratados con pooles de SN de 4 días, no arrojaron resultados concluyentes, por lo cual no se presentan. A pesar de ello, si bien se perdieron los significados entre los grupos, las tendencias observadas en cultivos tratados con SN más tempranos se mantuvieron. Dichos SN muy probablemente no hayan sido óptimos para el estudio de la respuesta adrenal ya que provenían de cultivos con una alta concentración de CPM, sin recambio de MCC. Por lo tanto, no reflejarían lo que acontece en una RI fisiológica.

Resumiendo sobre los resultados presentados se torna evidente que:

- El antígeno Tso utilizado para estimular a las CPM, así como el MCC empleado para cultivar dichas células mononucleares, no generaron modificaciones en la producción de DHEA respecto de aquella constatada en la línea celular cultivada en condiciones óptimas. Esto se mantuvo tanto en condiciones basales de cultivo como cuando se co-estimuló con Forskolin.
- Sólo se observaron disminuciones en la producción del andrógeno adrenal cuando la línea celular fue enfrentada a pooles de SN de cultivos de CPM no estimuladas y estimuladas con Tso.
- Tampoco las diferencias halladas entre los distintos tratamientos fueron debidas a una falla en la respuesta al estímulo de la línea celular en algún tratamiento en particular, ya que cuando se co-estimuló con Forskolin, no existieron diferencias en

la capacidad de respuesta a este agente activador entre los grupos tratados con pools de SN. Todos incrementaron la producción de DHEA en la misma magnitud.

- La línea que fue tratada con pools pertenecientes a enfermos tuberculosos, tendió a producir menor cantidad de DHEA respecto de las células que fueron enfrentadas a pools provenientes de cultivos de individuos Normales. Es así que el padecer TB se mostró como un factor determinante en la inhibición de la secreción del andrógeno adrenal. Ello se debería al efecto de productos celulares generados tras la RI específica frente a antígenos provenientes de MTB.

4- DISCUSIÓN.

4.a- Efectos de cortisol y DHEA sobre la linfoproliferación y la producción de citocinas in vitro.

Dada la relevancia de la respuesta inmune celular en la evolución de la enfermedad tuberculosa, se efectuaron una serie de estudios *in vitro* para evaluar la respuesta linfoproliferativa como así también la producción antígeno-dependiente de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en pacientes con distinto grado de severidad y la eventual influencia de dos hormonas esteroideas de conocida acción inmunoreguladora sobre la RI. En todos los ensayos de proliferación pudo constatar que los pacientes con TB presentaron una blastogénesis reducida con relación a la desarrollada por los Controles sanos, que para el caso de los cultivos estimulados con Tso fue más deprimida aún en las formas avanzadas de la enfermedad. Los tratamientos hormonales permitieron constatar un efecto estimulante de la DHEA (dada en forma aislada) sobre la linfoproliferación de los pacientes Leves, lo que podría estar señalando la participación de esta hormona en la regulación extrínseca de la RI específica hacia la micobacteria. Los estudios combinando cortisol y DHEA mostraron, por su parte, que la inhibición provocada por cortisol sobre la proliferación no se revirtió completamente con ninguna dosis de DHEA, ya sea en los Controles como en los enfermos (independientemente del grado de severidad). El hecho que al analizar el ITso, en los tratamientos combinados se detectara una recomposición de la linfoproliferación de los pacientes Severos, refuerza la presunción sobre los efectos inmunoreguladores de estas hormonas sobre el tipo de respuesta que se desarrolla frente a un antígeno.

Los estudios sobre las mediciones de IFN- γ sugieren que la producción de esta citocina se halla deprimida sobre todo en las formas avanzadas de la enfermedad. Dichos resultados están en relación con los de otras investigaciones, en donde la síntesis de IFN- γ por parte de los individuos sanos respondedores a la tuberculina se ubicó por encima de la observada en los pacientes TB (217). El tratamiento con cortisol ocasionó una posterior reducción en las concentraciones de este mediador, que en los Controles y los casos Severos llegó a ser estadísticamente diferente de la contraparte sin hormona. El agregado de DHEA en forma simultánea con cortisol no consiguió modificar dicho efecto supresor. Es sabido que la actividad de tipo Th1 es esencial en el desarrollo de un estado de mayor resistencia hacia el MTB (216). Una serie de estudios clínicos y experimentales destacan la importancia del IFN- γ en el control de la infección tuberculosa. Así los experimentos de transferencia adoptiva y los efectuados en ratones con alteraciones en el gen para esta citocina han demostrado que el IFN- γ es un mediador esencial en la activación de los macrófagos para la posterior destrucción de las micobacterias intracelulares (218-220). En

combinación con otras citocinas o productos de los monocitos, el IFN- γ puede inhibir la replicación de las micobacterias en monocitos humanos o macrófagos derivados de dichas células (221,222). En tercer lugar, la administración en aerosol de IFN- γ a pacientes con TB multiresistente da lugar a una mejoría clínica, bacteriológica y radiológica de la enfermedad (223). El hecho de que los pacientes Severos tuviesen un mayor descenso de IFN- γ ante el tratamiento con cortisol indica que los mismos son más sensibles al efecto inhibitorio de la hormona sobre la producción de este mediador. Ello podría tener una profunda implicancia fisiopatológica dado que los enfermos avanzados sobrellevan una mayor situación de estrés por la misma dificultad respiratoria que de alguna manera podría condicionar una producción más elevada de corticosteroides. En relación con este enunciado vale la pena recordar que las investigaciones en pacientes con TB pulmonar activa sugieren una activación del eje HPA (224), lo cual podría concordar con los hallazgos que señalan un agrandamiento de las glándulas suprarrenales, que a su vez retrocede con el tratamiento específico antituberculoso (225). Algunos investigadores han hallado una mayor concentración basal de cortisol en los pacientes TB que no sobrevivieron a la enfermedad; mientras que la estimulación con ACTH provocaba una respuesta subóptima que podría reflejar un estado de hiperestimulación basal secundaria al estrés (226). Nuestros propios datos sobre las mediciones en plasma indican que en los pacientes con TB los niveles de Cortisol son superiores a la población no enferma. El hecho de que los Controles mostraran una fuerte inhibición en la producción de esta citocina indica que los GC también podrían operar en la situación de alto respondedor; aunque probablemente esto no tenga demasiada trascendencia *in vivo* por tratarse de sujetos sanos sin el estrés que genera la enfermedad.

Los cambios en el perfil de secreción de IFN- γ en las distintas fases de la enfermedad tuberculosa no se hallan totalmente identificados. Entre los factores involucrados podría pensarse que ciertos antígenos micobacterianos reconocidos por el SI durante el curso de la enfermedad, fueran capaces de ocasionar un sesgo de diferenciación hacia un tipo particular de células secretoras de citocinas. Otra variable capaz de influenciar un tipo preferencial de RI puede ser la carga antigénica. En este sentido es necesario tener en cuenta los estudios de Bretscher y col., quienes demostraron que ratones identificados como susceptibles a *Leishmania major* podían volverse resistentes a dicha infección cuando eran desafiados con una dosis más baja de parásitos (232). Sumado a ello nuestros resultados sugieren que parte de los cambios que se suceden a lo largo de la evolución de la enfermedad tuberculosa pueden guardar relación con la influencia de los esteroides adrenales.

El efecto inhibitorio de los GC pudo visualizarse sobre la presencia de otro mediador crucial en la inmunopatogénesis de la TB como el TNF- α , aunque con menos notoriedad

probablemente porque en las condiciones experimentales ensayadas la producción de este mediador fue mucho menor. Esta citocina es secretada fundamentalmente por los macrófagos activados, y la misma es capaz de potenciar la actividad microbicida de estas células hacia la micobacteria (227-229). Además, puede ser responsable del cuadro tóxico que acompaña a la enfermedad dado los importantes efectos proinflamatorios del TNF (230,231). Una exploración con procedimientos de mayor sensibilidad podría llegar a determinar en forma más precisa el grado de inhibición que pueden ejercer los GC sobre la producción de TNF- α en la TB.

En lo que respecta a IL-10, si bien se la considera como una citocina representativa de respuestas del tipo Th2, es asimismo capaz de mediar, al mismo tiempo, efectos antiinflamatorios. Es producida por monocitos, macrófagos y células B (236) y el incremento en su secreción genera la inhibición de la secreción de citocinas Th1, la estimulación de células B para la producción de Ac, la regulación en menos de la expresión de moléculas del MHC de clase II (y consecuentemente una disminución en la capacidad de presentación antigénica); y tras la inhibición que genera sobre la producción de citocinas proinflamatorias, determina una potente actividad antiinflamatoria (236, 195). Consecuentemente, en el contexto de la TB pulmonar, la mayor producción de esta citocina sería capaz de favorecer el desarrollo micobacteriano y la progresión de la enfermedad (195).

Diferentes grupos han propuesto asimismo que la estimulación de la secreción de IL-10 podría contribuir, por lo descripto, a incrementar las propiedades antiinflamatorias de los GC (235). El cortisol se encuentra elevado normalmente en respuesta al estrés y ha sido reportado como capaz de alterar la producción de citocinas tanto de CPM humanas como pertenecientes a ratones (233,234). Del mismo modo que ocurriera en nuestro estudio, otros grupos han demostrado que los GC suprimen la secreción de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-12) e incrementan o mantienen la secreción de las citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) de CPM humanas estimuladas con PHA, LPS o toxoide tetánico, en concentraciones suprafisiológicas y de estrés. Más aún, en estos estudios se demostró que tras el bloqueo glucocorticoideo con Mifepristone, el balance de citocinas se inclinó nuevamente hacia un perfil Th1 (233,234). La IL-10 es capaz asimismo de estimular la secreción de GC. No sólo se ha demostrado su producción a nivel central, sino que se comprobó que incrementa tanto la secreción de POMC como de ACTH, traduciéndose ello a nivel periférico, en el incremento de la secreción adrenal de GC (236).

En el presente trabajo hemos comprobado nuevamente la existencia del vínculo entre el sistema neuroendócrino y el SI a través de los efectos que son capaces de mediar los GC tanto sobre la proliferación celular estimulada como sobre la producción de citocinas por parte de estas células. Muy probablemente, del fino balance entre ambos sistemas,

dependa el tipo de RI que el huésped desarrolle frente a la micobacteria y, de la regulación de la misma, la evolución de la enfermedad.

4.b- Citocinas y hormonas circulantes. Interacciones inmunoendócrinas.

Acerca de las interacciones entre el SI y el sistema Neuroendócrino, es conocida la participación de diversas citocinas como IL-1, IFN- γ , TNF- α e IL-6 entre otras, en la estimulación de la actividad secretoria del eje HPA (1, 48-58, 85-88, 205). Es de suponer que tales mecanismos no sólo tengan que ver con la regulación de la actividad de las células del sistema inmune y de otras respuestas biológicas, sino que también puedan afectar el curso de distintas entidades clínicas vinculadas al desarrollo de respuestas inmunes, como por ejemplo frente a infecciones.

La activación del eje HPA en una respuesta de estrés típica se caracteriza por la elevación de los niveles de CRH, ACTH y consecuentemente la liberación a nivel adrenal de cortisol en humanos y andrógenos adrenales (DHEA). Fisiológicamente, esta respuesta aguda a un determinado estímulo tiene por fin controlar la RI y conducir a un retorno rápido de la homeostasis tras la superación del evento. Por el contrario, la permanencia del estímulo y el pasaje a la cronicidad conllevan a un perjuicio del huésped y muchas veces al fallo de la RI (205).

En el caso puntual de la infección por MTB, alrededor del 90% de los infectados resuelven esta infección sin presentar sintomatología clínica alguna. El 10% restante sin embargo, desarrolla la enfermedad, la cual librada a su evolución natural tiende a progresar y evolucionar hacia la cronicidad (2-4). El estadio clínico de la misma en el momento de la consulta muchas veces no puede asociarse con el tiempo de evolución. El mismo es establecido fundamentalmente a través de estudios radiológicos donde se evalúa la extensión de la enfermedad pulmonar al igual que la consideración de otros parámetros clínicos que determinan la severidad de la enfermedad, no vinculándose ella en la mayoría de los casos con el tiempo de evolución de la tuberculosis pulmonar, sino con el tipo de respuesta inmune que desarrollara el paciente frente a la infección por el bacilo tuberculoso: Individuos que presentan un perfil de respuesta Th1 (IFN- γ , IL-2) desarrollan estadios clínicos de menor severidad que individuos que desarrollan un tipo de respuesta predominantemente humoral (IL-4, IL-5, IL-10, IL-6) (151,152). En nuestro estudio en particular, no existió diferencia significativa respecto del tiempo de evolución y la severidad de la enfermedad en el momento de la consulta; sin embargo, pudo observarse que tanto los niveles de IL-6 como de IL-10 plasmáticos se incrementaron en forma significativa con la severidad de la enfermedad. Asimismo aumentaron con la progresión de la enfermedad

los niveles de IFN- γ . Existe consenso en el hecho que muchas veces es imposible afirmar un perfil Th1 o Th2 para una determinada RI tras la determinación de citocinas plasmáticas, dado que en muchos casos, el patrón hallado en el sitio donde se lleva a cabo la RI efectora es totalmente opuesto. Este fenómeno sería asimismo un mecanismo contrarregulador del SI (211). Sin embargo, dos de las citocinas determinadas (IL-6 e IFN- γ) son potentes estimuladores del eje HPA. Al respecto, los resultados muestran una correlación significativa positiva entre los niveles de IL-6 plasmáticos y los de cortisol, la cual se mantiene en los grupos de mayor severidad de la enfermedad.

La activación crónica del eje no conduce simplemente a la elevación sostenida de cortisol, con conocido efecto inmunosupresor y favorecedor de respuestas del tipo Th2 (153-156), sino que se acompaña de una disminución de los niveles de DHEA que por el contrario es favorecedora de respuestas del tipo Th1 (198). La DHEA es fisiológicamente secretada en forma sincrónica con cortisol tras el estímulo de CRH y ACTH observándose variaciones diurnas en su concentración (198). Sin embargo, tras la permanencia del estímulo, como ocurre en enfermedades inflamatorias crónicas de origen reumático como lo son AR, LES y enfermedad de Sjögren (199); enfermedad de Cushing o la falla miocárdica crónica se hace manifiesta esta disociación en la secreción de estas hormonas (198). En el presente estudio también pudo observarse que los niveles de DHEA plasmáticos disminuyeron marcadamente en el grupo de pacientes y que esta disminución progresó con la severidad de la Tuberculosis. Paralelamente, los niveles de cortisol se hallaron incrementados en los pacientes, reflejándose en un aumento drástico del índice cortisol / DHEA con la progresión de la enfermedad. Demostrando nuevamente el vínculo entre el SI y la respuesta neuroendócrina, pudo observarse que en el grupo Controles, los niveles de DHEA plasmáticos se correlacionaron negativamente con los de IL-6 y que esta citocina, lo hizo en forma positiva en el grupo TB con la relación plasmática cortisol / DHEA. Respecto de esta disociación entre estas hormonas esteroideas se postula que probablemente se deba a mecanismos de regulación intraadrenal, en los cuales también intervienen tanto células inmunes como sus productos (200, 201). Los resultados obtenidos a la última sección avalan dicha presunción.

Tanto en procesos agudos como crónicos, tras la activación del eje HPA se producen alteraciones en la secreción de la mayoría de las hormonas hipofisarias mediadas en gran parte por citocinas proinflamatorias y consecuentemente alteraciones en los restantes ejes controlados por hipotálamo e hipófisis (206). Estas modificaciones producidas en el perfil neuroendócrino también son capaces de modular la RI frente a un determinado patógeno. Se postula que tal modulación de la respuesta inmune no sería efectuada directamente por estas hormonas hipofisarias o gonadales, sino a través de la modulación que ejercen las mismas sobre la respuesta al estrés (206). Esta aseveración se

basa en el hecho de que sólo en casos puntuales ha sido posible adjudicar un rol inmunomodulador a estas hormonas (206, 207). La PRL, GH y IGF-I por ejemplo, se comportan como inmuoestimuladoras y modulan la RI contrarrestando los efectos inmunosupresores de los GC (206). Las hormonas tiroideas por su parte intervienen como factores obligados en la linfopoyesis B primaria (207). En cuanto a las hormonas sexuales, los estrógenos como E₂ favorecen las respuestas del tipo humoral y actúan como reguladores negativos de la linfopoyesis (207, 204); la testosterona por su parte, puede tener efectos tanto estimuladores como inhibidores de la respuesta inmune en función de la concentración e influye profundamente la respuesta inmune a través de la regulación de la función macrofágica (204). Nuestros resultados muestran modificaciones en el perfil endócrino de los pacientes respecto del grupo Controles y a la vez, variaciones en el mismo en función de la severidad de la enfermedad, sosteniendo ello la hipótesis que la resolución o progresión de la enfermedad resultarían de la interacción entre el SI y el neuroendócrino. Se hallaron elevaciones significativas de PRL y GH, más marcados para la segunda, y en ambos casos incrementándose sus valores en forma proporcional a la severidad de la enfermedad. El aumento de los niveles de estas hormonas podría reflejar un intento de contrarrestar el efecto antiinflamatorio y la tendencia a desarrollar una patente Th2 producida por el aumento del índice cortisol / DHEA (206, 207). En cuanto a las hormonas tiroideas, en contraposición a lo reportado para otros modelos de estrés tanto agudos como crónicos (206, 207, 212, 213), se observó un incremento significativo tanto de T3 como T4 en el grupo TB y dentro del mismo, un incremento proporcional en ambas hormonas conforme a la severidad de la enfermedad. Ello podría favorecer un estado hipercatabólico en los pacientes capaz de facilitar la progresión de la enfermedad tras el deterioro del huésped. En este caso, la mayor elevación de las hormonas tiroideas se vincularía con un peor pronóstico.

En cuanto al eje gonadal, tras la respuesta aguda a un estímulo, se produce la inhibición del mismo (205, 206). Asimismo, se ha reportado para modelos de estrés agudo y en enfermedades de importante compromiso sistémico, que paralelamente a la disminución de andrógenos adrenales, también se produce un descenso en los niveles plasmáticos de testosterona (198). La testosterona es una hormona anabólica por excelencia. La disminución de la misma también fue observada también en nuestro estudio y más aún, correlacionada significativamente con la severidad de la TB. La disminución en los niveles de testosterona en el grupo de pacientes, mayor cuanto mayor es la severidad de la enfermedad, describiría un cuadro de mayor deterioro sistémico que comprometería del mismo modo las funciones del SI. Hormonas como Testosterona, DHEA, Androstenediol y Dihidrotestosterona suprimen la actividad del gen promotor de IL-6 (199) y la primera suprime la respuesta del eje HPA a esta interleucocina (214). Al disminuir estos andrógenos

tanto adrenales como gonadales se favorecería la permanencia de un estímulo crónico del eje HPA mediado por IL-6, conduciendo ello con un incremento sostenido en los niveles de cortisol.

En cuanto a E_2 , esta hormona es uno de los principales estimulantes junto con IL-6 de la secreción de PRL (206, 207). Asimismo, favorece la secreción de IL-6, IL-1, IL-5, IL-10, e IFN- γ ; estimula la supervivencia de linfocitos B y la producción de anticuerpos; mientras que suprime la proliferación y función de células T a través de la supresión de IL-2 y consecuentemente favorece un perfil de respuesta tipo Th2 (209). Se observaron concentraciones plasmáticas significativamente superiores en el grupo de pacientes, siendo éstas mayores, cuanto mayor fue la severidad de la TB. Se correlacionaron asimismo en forma positiva los niveles de IL-6 plasmáticos con los de E_2 en el grupo TB y en los subgrupos Moderados y Severos.

La elevación sostenida de cortisol, que podría ser el resultado de una estimulación crónica del eje HPA mediada por IL-6 e IFN- γ , así como la de E_2 acompañado de una disminución de DHEA y testosterona en el grupo de pacientes favorecerían al desarrollo de una respuesta tipo Th2 o humoral en el grupo de pacientes, más acentuada cuanto mayor es la severidad de la enfermedad. Esta inclinación de la RI hacia un tipo de respuesta humoral es totalmente inadecuada para resolver la infección producida por MTB, la cual requiere de un patrón predominantemente celular (151, 152). Aparejado a ello, la disminución de una hormona anabólica como lo es la testosterona y el incremento de las hormonas tiroideas que conducirían a un estado hipercatabólico, contribuiría aún más al deterioro de los pacientes. Por otro lado, el incremento observado de los niveles plasmáticos de PRL y GH sería insuficiente para contrarrestar esta tendencia.

Lo observado indicaría que en el grupo de individuos en los cuales la TB progresa, la interacción entre el SI y endócrino, conducirían en primera instancia a una alteración de la función de la glándula suprarrenal, donde los niveles de cortisol secretados se mantienen moderada y crónicamente elevados y disociados de la secreción de DHEA, y en segunda instancia a una desregulación en los ejes tiroideo y gonadal. Todas las modificaciones que se producen favorecerían el desarrollo de un patrón de respuesta inadecuado para eliminar el agente infeccioso y consecuentemente perpetuarían la enfermedad y conducirían al deterioro progresivo del huésped. Tal desregulación de la RI estaría mediada tanto por mecanismos centrales como locales adrenales.

4.c- Efecto de los sobrenadantes de Células Periféricas Mononucleares sobre la regulación de la esteroidogénesis intraadrenal.

En el transcurso de los últimos años, diversos grupos han profundizado el conocimiento acerca de la regulación intraadrenal de la secreción de esteroides, documentando que tanto productos adrenomedulares como citocinas son capaces de modular la actividad secretoria intraadrenal. Respecto a estas últimas, las citocinas liberadas tras diversos estímulos del SI, son capaces de activar el eje HPA en sus tres niveles; y a nivel adrenal, tras la modulación de la secreción de hormonas, ejercer nuevamente efectos sobre el SI que las generó. Esta interacción entre los sistemas inmune y neuroendócrino resulta entonces en un hecho relevante no sólo para la regulación adrenal en procesos fisiológicos, sino también durante el transcurso de fenómenos patológicos.

En cuanto a los fenómenos patológicos, se ha reportado en numerosos casos que la cronicidad ya sea en patologías inflamatorias, autoinmunes e infecciosas genera un incremento moderado y sostenido de la secreción de GC con un descenso selectivo de la secreción de andrógenos adrenales (179). Tal disociación observada en la secreción de hormonas esteroideas podría ser debida a mecanismos de regulación intraadrenal en los cuales intervendrían tanto células inmunes como sus productos (200, 201). Nuestro estudio señala además que ello se haría extensivo a enfermedades infecciosas de naturaleza crónica como la TB.

Con el objetivo de corroborar esta hipótesis, este estudio se concentró en el efecto de productos de CPM generados tras la replicación celular basal (sin estímulo antigénico) así como aquellos generados tras una respuesta antígeno específica, demostrando que efectivamente existen factores generados por estas células capaces de disminuir la producción de DHEA de la línea celular H295-R. Para el presente modelo en particular, ello se corrobora debido a que el antígeno Tso utilizado para estimular a las CPM, así como el MCC empleado para cultivar dichas células mononucleares, no generaron modificaciones en la producción de DHEA respecto de aquella constatada en la línea celular cultivada en condiciones óptimas. Esto se mantuvo tanto en condiciones basales de cultivo como cuando se co-estimuló con Forskolin. Sólo se observaron disminuciones en la producción del andrógeno adrenal cuando la línea celular fue enfrentada a pools de SN de cultivos de CPM no estimuladas y estimuladas con Tso. Tampoco las diferencias halladas entre los distintos tratamientos fueron debidas a una falla en la respuesta al estímulo de la línea celular en algún tratamiento en particular, ya que cuando se co-estimuló con Forskolin, no existieron diferencias en la capacidad de respuesta a este agente activador entre los grupos tratados con pools de SN. Todos incrementaron la producción de DHEA en la misma magnitud.

En lo que respecta a la producción de DHEA en las células tratadas con pools de SN Basales, si bien cuando la línea no fue co-estimulada con Forskolín se registraron diferencias entre la producción de DHEA según el grupo de pacientes de donde se recogían los pools de SN, el agregado de Forskolín hizo que los cultivos expuestos a los diferentes pools de SN produjeran la misma cantidad del andrógeno. En contraposición a ello, al tratar con SN-Tso, la línea celular adrenal reflejó una disminución en la producción de DHEA, más marcada al utilizar pools de pacientes; que además se vinculó con la severidad de la TB. Ello demuestra que el(los) factor(es) responsable(s) de tal inhibición en la producción de DHEA son generados fundamentalmente al producirse una respuesta antígeno específica, sea de los pacientes como de los controles ya que también se observó un efecto inhibitorio al tratar la línea con pools provenientes de individuos Normales. El hecho de que en los cultivos tratados con pools de SN de pacientes más la co-estimulación con Forskolín, el incremento en la producción de DHEA fuera significativamente menor respecto de los cultivos tratados con pools de individuos Normales, permite especular que en los individuos enfermos de TB, el (los) factor(es) inhibidor(es) de la producción de DHEA se encontrarían en mayor concentración. Y más aún, que se producirían en proporciones diversas en función de la severidad de la TB.

Lo expuesto se hizo igualmente notorio cuando se consideró el efecto que generó el estar enfermo de TB sobre la producción del andrógeno adrenal. Es así como se observó que el padecer TB es un factor determinante en la inhibición de la secreción del andrógeno adrenal, y que ello se debería al efecto de productos celulares generados tras la RI específica frente a un antígeno proveniente de MTB, como ya fuera adelantado.

Las citocinas IL-1, IL-6, VIP, IGF-I y II, TNF- α y TGF- β_1 se encuentran entre los mediadores conocidos hasta la fecha como los más relevantes en la regulación de la función adrenal. Del balance de los mismos dentro del tejido adrenal, resultan sus efectos estimuladores o inhibidores de la secreción de esteroides (200, 201). Las cuatro primeras se comportan en humanos como factores estimulantes de la secreción esteroidea adrenal, mientras que TNF- α y TGF- β_1 se encuentran dentro de los factores inhibidores de la misma. En humanos el TNF- α se ha comportado como inhibidor de la secreción basal e inducida por ACTH de cortisol, desviando la vía sintética hacia la producción de andrógenos adrenales. El TGF- β_1 por su parte, actúa del mismo modo que el TNF- α sobre la vía sintética de cortisol y además como inhibidor específico de la producción de andrógenos adrenales (DHEA y DHEA-S) (200-203).

Es asimismo conocido el rol del TGF- β en el contexto de la TB pulmonar. Existen numerosas publicaciones que reportan elevados niveles de esta citocina en plasmas y sobrenadantes de cultivo de CPM de enfermos tuberculosos y asocian las concentraciones de la misma con la severidad de la TB (151,152). Asimismo, el TGF- β ha sido citado por

Hernández–Pando et al. (215) como un factor de mal pronóstico en la evolución de la TB experimental. De modo que esta citocina podría ser uno de los factores responsables de nuestras observaciones.

De acuerdo con la hipótesis planteada por Straub y Besedovsky (237), el organismo sería capaz de mantener su homeostasis a través de una respuesta integrada y coordinada de los diferentes supersistemas (inmune, nervioso, endócrino y reproductivo). Tales respuestas coordinadas e integradas, habrían sido mantenidas en el transcurso de la evolución para hacer frente y eliminar agentes patógenos en un período relativamente corto de tiempo (días a pocas semanas). Sin embargo, si tales respuestas coordinadas provenientes de los supersistemas fallan y son incapaces de retornar a la normalidad, tras la eliminación del patógeno, el resultado de ello sería una RI agresiva, la cual favorecería el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas discapacitantes.

Es así que tanto para la enfermedad tuberculosa, como para otras patologías crónicas donde se observa la recientemente reportada disfunción adrenal (disociación de la secreción de cortisol y DHEA), la imposibilidad del huésped de superar la noxa en forma apropiada, conduciría a una nueva situación, producto de la interacción del SI y neuroendócrino, que favorecería aún más la perpetuación de la enfermedad y el deterioro progresivo del huésped. Ello estaría producido fundamentalmente por la pérdida de los importantes efectos antigluco corticoides de DHEA, hecho que favorecería el mantenimiento de un estado proinflamatorio en el huésped.

5- CONCLUSIONES GENERALES.

⊕ El estadio de la TB al momento del diagnóstico no necesariamente se vincula con el tiempo de evolución de la enfermedad, sino que más bien representaría el resultado de la interacción huésped-bacteria.

⊕ La vacunación con BCG tendría un probable rol protector sobre el desarrollo de la TB; no evitando la infección con MTB, sino previniendo un curso más tórpido de la enfermedad .

⊕ En base a lo observado *in vitro*, se comprobó la existencia del vínculo entre el sistema neuroendócrino y el SI a través de los efectos que son capaces de mediar los GC, tanto sobre la proliferación celular estimulada como sobre la producción de citocinas por parte de estas células. Muy probablemente, del fino balance entre ambos sistemas, dependa el tipo de RI que el huésped desarrolle frente a la micobacteria y, de la regulación de la misma, la evolución de la enfermedad.

⊕ El perfil de citocinas y hormonas plasmáticas observado, permitió corroborar tal vínculo. Pudo demostrarse que en el grupo de individuos en los cuales la TB progresa, la interacción entre el SI y endócrino, conducirían en primera instancia, a una alteración de la función de la glándula suprarrenal y en segundo paso, a una desregulación en los ejes tiroideo y gonadal. Todas las modificaciones que se producen conducirían al desarrollo de un patrón de respuesta inadecuado para eliminar el agente infeccioso y consecuentemente perpetuarían la enfermedad, conduciendo al deterioro progresivo del huésped. Tal desregulación de la RI estaría mediada tanto por mecanismos centrales como locales adrenales.

⊕ Más aún, la mayoría de las modificaciones en el perfil de citocinas y hormonas, se correlacionaron con la severidad de la TB, indicando que el tipo de vínculo que se establece entre ambos sistemas podría ser responsable del curso de la TB en un determinado huésped.

⊕ El padecer TB se mostró como un factor determinante en la inhibición de la secreción del andrógeno adrenal. Ello se debería al efecto de productos celulares generados tras la RI específica frente a antígenos provenientes de MTB.

⊕ Tanto para la enfermedad tuberculosa, como para otros modelos de patologías crónicas donde se observa tal disfunción adrenal, manifiesta en la disociación de la secreción de cortisol y DHEA, la imposibilidad del huésped de superar la noxa en forma apropiada, conduciría a una nueva situación, producto de la interacción del SI y neuroendócrino, que favorecería aún más la perpetuación de la enfermedad y el deterioro progresivo del huésped. Ello estaría producido fundamentalmente a la pérdida de los importantes efectos antigluco corticoides de DHEA, lo cual permitiría el mantenimiento de un estado proinflamatorio en el huésped.

6- REFERENCIAS.

1. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Rev* 79: 1-71, 1999.
2. von Lichtenberg F. *Micobacterias: Tuberculosis*. En: Cotran Kumar Robbins. *Patología Estructural y Funcional*, 4º Edición, Ed Panamericana, 1996.
3. Sudre P, ten-Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO* 70: 149-159, 1992.
4. World Health Organization Report on the TB Epidemic. WHO/TB 94-177, 1994.
5. Stanford JI. *Mycobacteria: Biology and Epidemiology*. En: *Tuberculosis and other Mycobacteria*. The Medicine Publishing Company Ltd. Medicine: 102-104, 1999.
6. Mandell, Douglas, Bennett. *Tuberculosis*. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3rd Ed., 1990.
7. D'Esopo ND. Clinical trials in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 125(3): 85-93, 1982.
8. Stead WW, Dutt AK. Chemotherapy for tuberculosis today. *Am Rev Respir Dis*. 125(3): 94-101, 1982.
9. Snider DE Jr, Zierski M, Graczyk J, Bek E, Farer LS. Short-course tuberculosis chemotherapy studies conducted in Poland during the last decade. *Eur J Respir Dis*. 68: 12-18, 1986.
10. Rich AR. *The Pathogenesis of Tuberculosis*, 2nd ed., Ill: Charles C Thomas, Springfield, 1951.
11. Dannenberg AM Jr. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 125(3): 25-30, 1982.
12. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global Burden of Tuberculosis. Estimated Incidence, Prevalence and Mortality by Country. *JAMA*, 282(7): 677-686, 1999.
13. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ*. 72:213-220, 1994.
14. Murray CJL, Styblo K, Rouillon A. Health sector priorities review: tuberculosis. En: *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Jamison DT, Mosley WH eds. New York, NY: Oxford University Press, 1993.
15. Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull World Health Organ*. 70:149-159, 1992.
16. World Bank. En: *World Development Report*. New York, NY: Oxford University Press, 1993.
17. Chrétien J. Tuberculosis today. *Eur Respir J* 8 (Suppl) 20: 617-619, 1995.
18. Heubner RE, Castro KG. The changing face of tuberculosis. *Ann Rev Med* 46: 47-55, 1995.
19. Armstrong JA, D'Arcy Hart P. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med*, 134:713-740, 1971.

20. Dannenberg Am Jr, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses. Dual mechanisms that control bacillary multiplication. En: Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. B.R. Bloom ed, American Society of Microbiology, Washington, DC, 1994.
21. Flynn J, Chan J. Minireview: Tuberculosis: latency and reactivation. *Inf Immun*, 69(7): 4195-4201, 2001.
22. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 66:1277-1281, 1998.
23. Ehlers MW, Daffe M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key?. *Trends Microbiol*. 6: 328-335, 1998.
24. Collins H, Kauffmann SHE. The many faces of host response to tuberculosis. *Immunology* 103:1-9, 2001.
25. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 288: 1647-1650, 2000.
26. Russell DG, Dant J, Strugill-Koszycki S. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalema. *J Immunol*, 156: 4764-4773, 1996.
27. Gobin J, Horwitz MA. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. *J Exp Med*, 183: 1527-1532, 1996.
28. Höner zu Bentrup K, Miczak A, Swenson DL, Russell DG. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 181:7161-7167, 1999.
29. McKinney JD, Höner su Bentrup K, Muñoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchetti JC, Jacobs WR Jr, Russell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406:735-738, 2000.
30. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*, 81:641-650, 1995.
31. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5243-5248, 1997.
32. Cooper AM, Segal B, Frank AA, Holland SM, Orme IM. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47 (phox -/-) mice. *Infect Immun*, 68:1231-1234, 2000.
33. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton WJ. 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 limphotoxin. J Immunol, 162:3504-3511, 1999.
34. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer M, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 counts in patients with human immunodeficiency virus infection. Am Rev Resp Dis, 148:1292-1297, 1993.
 35. Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. J Immunol, 159:290-297, 2000.
 36. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, Macdonald HR, Meylan PR. Fas ligand - induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 160:5448-5454, 1998.
 37. Shaible Ue, Hagens K, Fischer K, Collins HL, Kauffmann SHE. Intersection of group 1 CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. J Immunol, 164:4843-4852, 2000.
 38. Beatty WL, Rhoades E, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. Traffick, 1:235-347, 2000.
 39. Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, Lavani A. High frequencies of circulating IFN- γ secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC-class I restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis* infected subjects without disease. Eur J Immunol 30:2713-2732, 2000.
 40. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. Nature, 339:544-548, 1989.
 41. Griffin JP, Harshan KV, Born WK, Orme IM. Kinetics of accumulation of gamma delta receptor bearing bearing T lymphocytes in mice infected with live mycobacteria. Infect Innun, 59:4263-4265, 1991.
 42. Hmama Z, Gabathuler WA, Jefferies G, Dejong G, Reiner NE. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. J Immunol, 161:4884-4893, 1998.
 43. Noss EH, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. Cell Immunol, 201:63-74, 2000.
 44. Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits INF-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. J Immunol, 163:3898-3906, 1999.

45. Toossi Z, Ellner J. Host Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci.* 25(3):133-140, 1998.
46. Houssay A. Hipófisis. En: Cingolani H, Houssay A. *Metabolismo y endocrinología, Reproducción.* En: *Fisiología Humana de Bernardo A. Houssay.* Tomo 3. Ed. "El Ateneo", 1989.
47. De Nicola AF. Corteza Suprarrenal. *Metabolismo y endocrinología, Reproducción.* En: Cingolani H, Houssay A. *Fisiología Humana de Bernardo A. Houssay.* Tomo 3. Ed. "El Ateneo", 1989.
48. Besedovsky H, Del Rey A. Cytokines as mediators of Central and Peripheral Immune - Neuroendocrine interactions. En: Adler R, Felten D, Cohen N. *Psychoneuroimmunology.* 3rd Ed. Academic Press Ed. Vol I, 2001.
49. Gutierrez E, Banks W, Kastin A. Blood-born Interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood brain barrier. *Journal of Neuroimmunology*, 55:153-160, 1994.
50. Berkenbosch F, Goeij D, del Rey A, Besedovsky, H. Neuroendocrine, sympathetic, and metabolic responses induced by Interleukin-1. *Neuroendocrinology*, 50:570-576, 1989.
51. Besedovsky H, del Rey A. Immune-Neuro-Endocrine interactions: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17:64-402, 1996.
52. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E. Lymphokine containing supernatants from Con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *Journal of Immunology*, 126:385-387, 1981.
53. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, De Prada M, Burri R, Honegger C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science*, 221:564-566, 1983.
54. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Lotz W, Schwulera U. Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland. *Clin Exp Immun*, 59:622-628, 1985.
55. Besedovsky H, Sorkin E. Network of immunoendocrine interactions. *Clin Exp Immun*, 27:1-12, 1977.
56. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E. What do the immune system and the brain know about each other?. *Immunology Today*, 4:342-346, 1983.
57. Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Mueller J. Hormonal changes during the immune response. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 150:466-479, 1975.
58. Bret-Dibat J, Bluthé R, Kent S, Kelley K, Dantzer R. Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behaviour in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain, Behaviour and Immunity*, 9:242-246, 1995.
59. Maier S, Goehler L, Fleshwe M, Watkins L. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann NY Acad Sci*, 840:289-300, 1998.

60. Sehic E, Blatteis C. Blockade of lipopolisaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Research*, 726: 160-166, 1996.
61. Watkins L, Goehler L, Relton J, Tartaglia N, Siebert L, Martin D, Maier S. Blockade of the interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: Evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neuroscience Letters*, 183:27-31, 1995.
62. Ban E, Milon G, Prudhomme N, Fillion G, Haour F. Receptors for interleukin-1 (alpha and beta) in mouse brain: Mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience*, 43: 21-30, 1991.
63. Cunningham E, Wada E, Carter D, Tracey D, Battey J, De Souza E. In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary and adrenal gland of the mouse. *Journal of Neuroscience*, 12:1101-1114, 1992.
64. Deyerle K, Sims J, Dower S, Bothwell M. Pattern of IL-1 receptor gene expression suggests role in non-inflammatory processes. *Journal of Immunology*, 149: 1657-1665, 1992.
65. Araujo D, Lapchak P, Collier B, Quirion R. Localization of interleukin-2 receptors in the rat brain: Interaction with the cholinergic system. *Brain Research*, 498:257-266, 1989.
66. Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M. Expression of high affinity receptors for murine interleukin-4 (BSF-1) on hemopoietic and non-hemopoietic cells. *Journal of Immunology*, 140:456-464, 1988.
67. Schöbitz B, de Kloet E, Sutano W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and Interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *European Journal of Neurosciences*, 5:1426-1435, 1993.
68. Kinouchi K, Brown G, Pasternak G, Donner D. Identification and characterisation of receptors for tumour necrosis factor- alpha in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18:1532-1538, 1991.
69. Tada M, Diserens A, Desbaillets I, Tribolet N. Analysis of cytokine receptor messenger RNA expression in human glioblastoma cells and normal astrocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Neurosurgery*, 80:1063-1073, 1994.
70. Chang Y, Albright S, Lee F. Cytokines in the central nervous system: expression of macrophage colony stimulating factor and its receptor during development. *Journal of Neuroimmunology*, 52:9-17, 1994.
71. Ban E, Marquette C, Sarrieau A, Fitzpatrick F, Fillion G, Milon G, Rostene W, Haour F. Regulation of Interleukin-1 receptor expression in mouse brain and pituitary by lipopolisaccharide and glucocorticoids. *Neuroendocrinology*, 58:581-587, 1993.
72. Turnbull A, Rivier C. Regulation of the Hypothalamic - Pituitary - Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of action. *Physiological Reviews*, 79(1):1-71, 1999.
73. Addison T. On the constitutional and local effects of the suprarenal capsules. London: Highley, 1855.

74. Jaffe H. The influence of the suprarenal gland on the thymus. Stimulation of the growth of the thymus gland following double suprarenalectomy in young rats. *J Exp Med*, 40:753-760, 1924.
75. del Rey A, Besedovsky H, Sorkin E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. *J Immunol*, 133:572-575, 1984.
76. Munck A, Guyre P, Holbrook N. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*, 5:25-44, 1984.
77. Smith E, Blalock J. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin - like substances: association with leukocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:7530-7534, 1981.
78. Smith E, Phan M, Kruger T, Copenhaver D, Blalock J. Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:6010-6013, 1983.
79. Weigent D, Baxter J, Wear W, Smith L, Bost K, Blalock J. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J*, 2:2812-2818, 1988.
80. Blalock J. Proopiomelanocortin - derived peptides in the immune system. *Clin Endocrinol*, 22:823-827, 1985.
81. Blalock J, Johnson H, Smith E, Torres B. Enhancement of the in vitro antibody response by thyrotropin. *Biochem Biophys Res Commun*, 125:30-34, 1984.
82. Johnson H, Smith E, Torres B, Blalock J. Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:4171-4174, 1982.
83. Johnson H, Torres B, Smith E, Dion L, Blalock J. Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin. *J Immunol*, 132:246-250, 1984.
84. Montgomery D, Lefevre J, Ulrich C, Adamson C, Zukoski C. Identification of prolactin - like proteins synthesised by normal murine lymphocytes. *Endocrinology*, 127:2601-2603, 1990.
85. Besedovsky H, del Rey A, Klusman I, Furukawa H, Arditi G, Kabiersch A. Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40:613-618, 1991.
86. Imura H, Fukata J, Mori T. Cytokines and endocrine functions: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clin Endocrinol*, 35:107-115, 1991.
87. Sharp B, Matta S, Peterson P, Newton R, Chao C, McAllen K. Tumour necrosis factor - alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison with interleukin - 1 β . *Endocrinology*, 124:3131-3133, 1989.
88. Van der Meer M, Sweep C, Pesman G, Borm GF, Hermus AR. Synergism between IL-1 β and TNF- α on the activity of the pituitary - adrenal axis and on food intake of rats. *Am J Physiol*, 268 (Endocrinol Metab 31):551-557, 1995.
89. Robinson J, Badway J. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. En: *Macrophage - pathogen Interactions*, Zwilling B and Eisenstein Ed. NY: Dekker, 1994.

90. Ross D, Bolscher B, de Boer M. Generation of reactive oxygen species by phagocytes. En: Mononuclear Phagocytes, R Van Furthe Ed., Dordrecht., Neatherlands: Kluwer Academic Publishers.
91. Dinarello C. Role of IL-1 and tumour necrosis factor in systemic responses to infections and inflammation. En: Inflammation: Basic principles and Clinical correlates, 2nd Ed., Gallin, Goldstein, Syederman Eds, NY, Raven Press.
92. Boomershine C, Wang T, Zwilling B. Neuroendocrine Regulation of Macrophage and Neutrophil function. En: Adler R, Felten D, Cohen N. Psychoneuroimmunology. 3rd Ed. Academic Press Ed. Vol I, 2001.
93. Crowle A, Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Inflammation and Immunity*, 58:632-638, 1990.
94. Stead W. Genetics and resistance to tuberculosis. *Annals of Internal Medicine*, 116:937-941, 1992.
95. Stead W, Lofgren J, Sinner J, Riddick W. Racial differences in susceptibility to infection with *M. tuberculosis*. *New England Journal of Medicine*, 322:422-427, 1990.
96. Ishigami T. The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. *American Review of Tuberculosis*, 2:470-484, 1919.
97. Collins F. Mycobacterial disease: Immunosuppression and acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Microbiology Review*, 2:360-377, 1989.
98. Wiegshaus E, Balasubramanian V, Smith D. Immunity to tuberculosis from the perspective of pathogenesis. *Infection and Immunity*, 57:3671-3676, 1989.
99. Berkenbosch F, Wolvers D, Derijk R. Neuroendocrine and immunological mechanisms in stress-induced immunomodulation. *Journal of Steroid Biochemistry*, 40:639-647, 1991.
100. Khansari D, Murgu A, Faith R. Effects of stress on the immune system. *Immunology Today*, 11:170-175, 1990.
101. Kiecolt-Glaser J, Glaser R. Psychoneuroimmunology and health consequences: data and shared mechanisms. *Psychosomatic Medicine*, 57:269-274, 1995.
102. Sheridan J, Dobbs C, Jung J, Chu X, Konstantinos A, Padgett D, Glaser R. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity. *Ann NY Acad Sci*, 840:803-808, 1998.
103. Ader R, Felten D, Cohen N (Eds). *Psychoneuroimmunology*, 2nd Ed, NY: Academic Press, 1991.
104. Johnson E, Kamilaris T, Chrousos G, Gold P. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioural homeostasis. *Neuroscience Biobehavioural Review*, 16:115-130.
105. Solomon G. *Psychoneuroimmunology: Interaction between the central nervous system and immune system*. *Journal of Neuroscience Research*, 18:1-9, 1987.

106. Felten D, Felten S, Bellinger D, Carlson S, Ackerman K, Madden K, Olschowski J, Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunology Review*, 100:225-260, 1987.
107. Abrass C, O'Connor S, Scarpace P, Abrass I. Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *Journal of Immunology*, 135:1338-1341, 1985.
108. Liggett S. Identification and characterization of a homogeneous population of beta 2-adrenergic receptors on human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis*, 139:552-555, 1989.
109. Sanders V. The role of adrenoceptors mediated signals in the modulation of lymphocyte function. *Advances in Neuroimmunology*, 5:283-298, 1995.
110. Madden D, Felten D. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiology Review*, 75:77-106, 1995.
111. Shen H, Sha L, Kennedy J, Ou D. Adrenergic receptors regulate macrophage secretion. *International Journal of Immunopharmacology*, 16:905-910, 1994.
112. Kohut M, Davis J, Jackson D, Colbert L, Strasner A, Essig D, Pate R, Ghaffar A, Mayer E. The role of stress hormones in exercise-induced suppression of alveolar macrophage antiviral function. *Journal of Neuroimmunology*, 81:193-200, 1998.
113. Fukushima T, Sekizawa K, Jin Y, Yamaya M, Sasaki H, Takishima T. Effects of beta-adrenergic receptor activation on alveolar macrophage cytoplasmic motility. *American Journal of Physiology*, 265:L67-L72, 1993.
114. Payvar F, Wrangé O, Carlstedt-Duke J, Okret S, Gustafsson J, Yamamoto K. Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA*, 78:6628-6632, 1981.
115. Carbtree G, Munck A, Smith K. Glucocorticoids and lymphocytes: increased glucocorticoid receptor levels in antigen stimulated lymphocytes. *Journal of Immunology*, 124: 2430-2435, 1980.
116. Miesfeld R. Molecular genetics of corticosteroid action. *Am Rev Respir Dis*, 141: S11-S17, 1990.
117. Munck A, Mendel D, Smith L, Ortl E. Glucocorticoid receptors and actions. *Am Rev Respir Dis*, 141:S2-S10, 1990.
118. Zwilling B, Brown D, Pearl D. Induction of major histocompatibility complex class II glycoproteins by interferon gamma: Attenuation of the effects of restraint stress. *Journal of Neuroimmunology*, 37:115-122, 1991.
119. Kern J, Lamb R, Reed J, Daniele R, Nowell P. Dexametasone inhibition of interleukin - 1 beta production by human monocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 81:237-244, 1988

120. Lee S, Tso A, Chan H, Thomas J, Pettie K, Eugui E, Allison A. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukine - 1 beta gene and decrease the stability of interleukin - 1 beta mRNA. *Proc Nat Acad Sci USA*, 85:1204-1208, 1988.
121. Northrop J, Crabtree G, Mattila P. Negative regulation of interleukine - 2 transcription by the glucocorticoid receptor. *J Exp Med*, 175:1235-1245, 1992.
122. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *Journal of Immunology*, 154:4719-4725, 1995.
123. Meagher L, Cousin J, Seckl J, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *Journal of Immunology*, 156:4422-4428, 1996.
124. Cronstein B, Kimel S, Levin R, Martiniuk F, Weissmann G. Mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosteroids - the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular -adhesion molecule-1. *Proc Nat Acad Sci USA*, 89:9991-9995, 1992.
125. Burton J, Kehrl M. Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk of cortisol - and dexametasone- treated cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56:997-1006, 1995.
126. Schaffener A. Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages, without imparing their responsiveness to gamma interferon. *Journal of Clinical Investigation*, 76(5):1755, 1985.
127. Hierholzer K, Bühler H. Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action. En: *Comprehensive Human Physiology*, Vol I, Greger R, Windhorst U (Eds), 1996.
128. Ashwell J, Lu F, Vacchio M. Glucocorticoids in T Cell development and function. *Ann Rev Immunol*, 18:309-345, 2000.
129. McKay L, Cidlovsky J. Molecular control of Immune/Inflammatory Responses: Interactions between Nuclear Factor- κ B and Steroid Receptor-Signaling Pathways. *Endocrine Rev*, 20(4):435-459, 1999.
130. Dahbahar F, McEwen B. Bidirectional Effects of Stress and glucocorticoid hormones on Immune function: Possible explanations for paradoxical observations. En: Adler R, Felten D, Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. 3rd Ed. Academic Press Ed. Vol I, 2001.
131. Sephton S, Sapolsky R, Kraemer H, Spiegel D. Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(12):994-1000, 2000.
132. Dhabhar F, Miller A, McEwen B, Spencer R. Effects of stess on immune cell distribution - dynamics and hormonal mechanisms. *Journal of Immunology*, 154:5511-5527, 1995b.
133. Dhabhar F, Miller A, McEwen B, Spencer R. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution - role of adrenal steroid hormones. *Journal of Immunology*, 157:1638-1644, 1996.

134. Dhabhar F, Miller A, Stein M, McEwen B, Spencer R. Diurnal and stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain, Behaviour and Immunity*, 8:66-79, 1994.
135. Landmann R, Müller F, Perini C, Wesp M, Erne P, Bühler F. Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecholamines. *Clin Exp Immunol*, 58:127-135, 1984.
136. Fleshner M, Watkins L, Lockwood L, Laudenslager M, Maier S. Specific changes in lymphocyte subpopulations: A potential mechanism for stress-induced immunomodulation. *J Neuroimmunol*, 41:131-142, 1992.
137. Walzer P, LaBine M, Redington T, Cushion M. Lymphocyte changes during chronic administration of and withdrawal from corticosteroids: Relation to *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Immunol*, 133:2502-2508, 1984.
138. Dhabhar F, Satoskar A, Bluethmann H, David J, McEwen B. Stress-induced enhancement of skin immune function: a role for INF-gamma. *PNAS*, 97:2846-2866, 2000.
139. Daynes R, Araneo B. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce growth factors Interleukin 2 and Interleukin 4. *Eur J Immunol*, 19:2319-2325, 1989.
140. Gajewsky T, Schell S, Nau G, Fitch F. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev*, 111:79-110, 1989.
141. Mosmann T, Coffman R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol*, 7:145-173, 1989.
142. Dhabhar F, McEwen B. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behaviour and Immunity*, 11:286-306, 1997.
143. Edwards E, Dean L. Effects of crowding of mice on humoral antibody formation and protection to lethal antigenic challenge. *Psychosomatic Medicine*, 39:19-24, 1977.
144. Fleshner M, Laudenslager M, Simons L, Maier S. Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. *Physiol Behav*, 45:1183-1187, 1989.
145. Batrop R, Lazarus L, Luckhurst E, Kiloh L, Penny R. Depressed lymphocyte function after breavment. *Lancet*, 8016: 834-836, 1977.
146. Irwin M, Patterson T, Smith T, Caldwell C, Brown S, Gillin C, Grant I. Reduction of immune function in life stress and depression. *Biol Psych*, 27:22-30, 1990.
147. Cheng G, Morrow-Tesch J, Beller D, Levy E, Black P. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. *Brain, Behaviour and Immunity*, 4:278-291, 1990.
148. Brown D, Zwilling B. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. *J Neuroimmunol*, 53:181-187, 1994.

149. Wiegers G, Labeur M, Stec I, Klinkert W, Holsboe R, Reul J. Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth. *J Immunol*, 155:1893-1902, 1995.
150. Stocklin E, Wissler M, Goullieux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, 383:726-728, 1996.
151. Dlugovitzky D, Torres-Morales A, Rateni L, Farroni MA, Largacha C, Molteni O, Bottasso OA. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degree of pulmonary involvement. *FEMS Immunol Microbiol*, 18:203-207, 1997.
152. Dlugovitzky D, Bay M, Rateni L, Urizar L, Rondelli F, Largacha C, Farroni M, Molteni O, Bottasso O. In vitro synthesis of interferon- γ , interleukin-4, transforming growth factor- β , and interleukin 1- β by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients. Relationship with the severity of pulmonary involvement. *Scand J Immunol*, 49:210-217, 1999.
153. Ramirez F, Fowell D, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol* 156:2406-2412, 1996.
154. Brinkmann V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets. *J Immunol* 155:3322-3328, 1995.
155. Fischer A, Konig W. Influence of cytokines and cellular interactions on the glucocorticoid-induced Ig (E, G, A, M) synthesis of peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 74: 228-233, 1991.
156. Padgett D, Sheridan J, Loria R. Steroid hormone regulation of a polyclonal Th2 immune response. *Ann NY Acad Sci* 774: 323-325, 1995.
157. Suzuki T, Suzuki N, Daynes R, Engleman E. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 61:202-211, 1991.
158. Daynes R, Araneo B, Hennebold J, Enioutina J, Mu H. Steroids as regulators of the mammalian immune response. *J Invest Dermatol* 105:14s-19s, 1995.
159. Tabata N, Tagami H, Terui T. Dehydroepiandrosterone may be one of the regulators of cytokine production in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 289: 410-414, 1997.
160. Gennari R, Alexander J. Arginine, glutamine, and dehydroepiandrosterone reverse the immunosuppressive effect of prednisone during gut-derived sepsis. *Crit Care Med* 25:1207-1214, 1997.
161. Hernández Pando R, Streber M, Orozoco H, Arriaga K, Pavon L, Alnakhli S, Rook G. The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology* 95:234-241, 1998.

162. Rook G, Honour J, Kon O, Wilkinson R, Davidson R, Shaw R. Urinary steroid metabolites in tuberculosis: a new clue to pathogenesis. *Q J Med* 89:333-341, 1996.
163. Filley E, Rook G. Effect of mycobacteria on sensitivity to the cytotoxic effects of tumour necrosis factor. *Infect Immunity* 59:2567-2572, 1991.
164. Daynes R, Meikle A, Araneo A. Locally active steroid hormones may facilitate compartmentalisation of immunity by regulating the types of cytokines produced by helper T-cells. *Res Immunol* 142:40-45, 1991.
165. Boulay J, Paul W. Hematopoietin sub-family classification based on size, gene organization and sequence homology. *Curr Biol* 3:573-581, 1993.
166. Kooijman R, Hooghe-Peters, Hooghe R. Prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the immune system. *Adv Immunol* 63:377-454, 1996.
167. Berczi I. The role of growth and lactogenic hormone family in immune function. *Neuroimmunomodulation* 1:201-216, 1994.
168. Mukherjee P, Mastro A, Hymer W. Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 126:88-94, 1990.
169. Cesario T, Yoosefi S, Carandag G, Sadati N, Le J, Vaziri N. Enhanced yield of gamma interferon in prolactin-treated human peripheral blood mononuclear cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 205:89-95, 1994.
170. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation* 4:171-180, 1997.
171. Wilder R. Neuroendocrine - immune system interactions and autoimmunity. *An Rev Immunol*, 13:307-338, 1995.
172. Poynter M, Daynes R. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor kappa-B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem*, 273:32833-32841, 1998.
173. Dashtaki R, Whorton A, Murphy T, Chitano P, Reed W, Kennedy T. Dehydroepiandrosterone and analogs inhibit DNA-binding of AP-1 and airway smooth muscle proliferation. *J Pharmacol Exp Ther*, 285:876-883, 1998.
174. Blauer K, Poth M, Rogers W, Bernton E. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effect of dexametasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology*, 129: 3174-3179, 1991.
175. May M, Holmes E, Rogers W, Poth M. Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone. *Life Sci* 46:1627-1631, 1990.
176. Araneo B, Daynes R. Dehydroepiandrosterone functions as more than antiglucocorticoid in preserving immunocompetence after thermal injury. *Endocrinology*, 136:393-401, 1995.

177. Padgett D, Loria R. Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol and androstenetriol. *J Neuroimmunol*, 84:61-68, 1998.
178. Wright B, Porter J, Browne E, Svec S. Antigluco-corticoid action of dehydroepiandrosterone in young obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 16:579-583, 1992.
179. Straub R, Schölmerich J, Zietz B. Replacement therapy with DHEA plus corticosteroids in patients with chronic inflammatory diseases- substitutes of adrenal sex hormones. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 59(2):108-118, 2000.
180. Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W. Anti-gluco-corticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol Cel Biochem*, 131:99-104, 1994.
181. Straub R, Zeuner M, Antoniou E, Schölmerich J, Andus T. Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease. *A J Gastroenterology* 93:2197-2202, 1998.
182. Straub R, Zeuner M, Antoniou E, Schölmerich J, Lang B. DHEA-S is positively correlated with soluble interleukin 2 receptor and soluble intracellular adhesion molecule un systemic lupus erithemtosus. *J Rheumatol*, 23:856-861, 1996.
183. Straub R, Miler E, Schölmerich J, Zietz B. Cytokine and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol*, 109(1):10-15, 2000.
184. Jaattela M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman U, Saksela E. Tumour necrosis factor is a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology*, 128:623-629, 1991.
185. Araghi-Niknam M, Zhang Z, Jiang S, Call O, Eskelson C, Watson R. Cytokine dysregulation and increased oxidation is prevented by dehydroepiandrosterone in mice infected with murine leukemia retnovirus. *Proc Soc Exp Biol Me*, 216:386-391, 1997.
186. Danenberg H, Alpert G, Lustig S, Ben-Nathan D. Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxine toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:2275-2279, 1992.
187. Boccuzzi G, Aragno M, Seccia M, Bringardello E, Tamagno E, Albano E, Danni O, Bellomo G. Protective effect of dehydroepiandrosterone agains copper-induced lipid peroxidation in the rat. *Free Radic Biol Med*, 22:1289-1294, 1997.
188. Mohan P, Jacobson M. Inhibition of macrophage superoxide generation by dehydroepiandrosterone. *Am J Med Sci*, 306:10-15, 1993.
189. Straub R, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Schölmerich J, Falk W, Lang B. Serum DHEA and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin 6, and DHEA

- inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol*, 83:2012-2017, 1998.
190. Young D, Skibinski G, Mason J, James K. The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6 sR) and transforming growth factor beta 1 levels in normal healthy blood donors. *Clin Exp Immunol*, 117:476-481, 1999.
 191. Kim H, Ryu S, Kim S, Choi B, Lee E, Kim HM, Chung H. Administration of dehydroepiandrosterone reverses the immune suppression induced by high dose antigen in mice. *Immunol Invest*, 24:583-593, 1995.
 192. Schmidt M, Kreutz M, Löffler G, Schölmerich J, Straub R. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J Endocrinol*, 164:161-169, 2000.
 193. Herrmann M, Zietz B, Schölmerich J, Straub R. Stress and rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 26(4):737-63, 2000.
 194. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann Rev Biochem*, 55:663-700, 1986.
 195. Flynn J, Chan J. Immunology of Tuberculosis. *Ann Rev Immunol*, 19:93-129, 2001.
 196. Harrison's 15th Edition: Principles of Internal Medicine, Vol 1: 1031, 2001.
 197. van Crevel R, Ottenhoff T, van der Meer J. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2):294-309, 2002.
 198. Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF. DHEA and DHEA-S: a Review. *Journal of Clinical Pharmacology*, 39:327-348, 1999.
 199. Imrich R. The role of neuroendocrine systems in the pathogenesis of rheumatic diseases. Minireview. *Endocrine Reg*, 36:95-106, 2002.
 200. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine Reviews*, 19(2):101-143, 1998.
 201. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol*, 59(Suppl 2):12-17, 2000.
 202. Lebrethon MC, Jaillard C, Naville D, Begeot M, Saez JM. Effects of Transforming Growth Factor $-\beta 1$ on human adrenocortical fasciculata-reticularis cell differentiated functions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79(4):1033-1039, 1994.
 203. Herrmann M, Scholmerich J, Straub RH. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann NY Acad Sci*, 966:166-186, 2002.
 204. Miller L and Hunt J. Minireview: Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Science* 59(1):1-14, 1996.

205. Besedovsky H, del Rey A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. *Z Rheumatol*; 59(Suppl 2):26-30, 2000.
206. Dorshkind K, Horseman ND. Anterior pituitary hormones, stress and immune system homeostasis. *BioEssays*, 23:288-294, 2001.
207. Dorshkind K, Horseman N. The roles of Prolactin, Growth Hormone, Insulin Growth Factor -1 and Thyroid Hormones in lymphocyte development and function: Insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Reviews*, 21(3):292-312, 2000.
208. Foster M, Montecino-Rodriguez E, Clark R, Dorshkind K. Regulation of T and B cell development by anterior pituitary hormones. *CMLS*, 54:1076-1082, 1998.
209. McMurray R. Estrogen, prolactin and autoimmunity: actions and interactions. *International Immunopharmacology*, 1(6):995-1008, 2001.
210. Freeman M, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80(4):1523-1631, 2000.
211. Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJ, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of Cytokines in patients with active tuberculosis and after treatment. *Clin Exp Immunol*, 115:110-113, 1999.
212. Yen P. Physiological and Molecular basis of Thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, 81(3):1097-1142, 2001.
213. Cremaschi GA, Gorelik G, Klecha AJ, Lysionek AE, Genaro AM. Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis. *Life Sci*. 67(26):3171-3179, 2000.
214. Papadopoulos AD, Wardlaw SL. Testosterone suppresses the response of the HPA axis to IL-6. *Neuroimmunomodulation*, 8(1):39-44, 2000.
215. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. 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(4):607-617, 1997.
216. Boom, W.H. The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Agents Dis*, 5:73-81, 1996
217. Sánchez FO, Rodríguez JI, Agudelo G, García LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun*, 62: 5673-5678, 1994.
218. Orme I. Immunity to mycobacteria. *Curr Op Immunol*, 5:497-502, 1993.
219. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russel DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in IFN- γ gene-disrupted mice *J Exp Med*, 178:2243-2249, 1993.
220. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon- γ resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*, 178: 2249-2252, 1993.

221. Rook GA, Steele J, Fraher L, Barker S, Karmali R, O'Riordan J, Stanford J. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology*, 57:159-163, 1986.
222. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol*, 12:721-727, 1990.
223. Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- γ via aerosol. *Lancet*, 349:1513-1515, 1997.
224. Kelestimur F, Goktas Z, Gulmez I, Unluhizarci K, Bayram F, Ozesmi M, Guven M, Tutus A. Low dose (1 microgram) adrenocorticotropin stimulation test in the evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in patients with active pulmonary tuberculosis. *J Endocrinol Invest*, 23:235-239, 2000.
225. Gulmez I, Kelestimur F, Durak AC, Ozesmi M. Changes in the size of adrenal glands in acute pulmonary tuberculosis with therapy. *Endocr J*, 43:573-576, 1996.
226. 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*, 2:419-424, 1998.
227. Hirsch CS, Yoneda T, Ellner JJ, Averill LE, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *M. tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor beta. *J Infect Dis*, 170:1229-1237, 1994.
228. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med*, 45:491-503, 1994.
229. Law K, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K, Chi C, Rom WN. 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, 1996.
230. Denis M, Gregg EO. Recombinant tumor necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology* 71:139-141, 1990.
231. Bermudez LE, Patrofsky MW, Young LS. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect Immun*, 60:4245-4252, 1992.
232. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257:539-542, 1992.
233. Agarwal SK, Marshall GD. Glucocorticoid-induced Type 1/Type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J Interferon Cytokines Res*, Dec;18(12):1059-68, 1998.

234. Visser J, van Boxel-Dezaire A, Methorst D, Brunt T, de Kloet ER, Nagelkerken L. Differential regulation of IL-10 and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood*; 91(11): 4255-4264, 1998.
235. van der Poll T, Barber AE, Cyoke SM, Lowry SF. Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentration during human endotoxemia- a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(10): 3604-6, 1996.
236. Smith E, Cadet P, Stefano G, Opp M, Hughes T. IL-10 as mediator in the HPA axis and brain. *J of Neuroimmunol*; 100:140-148, 1999.
237. Straub R, Besedovsky, H. Integrated evolutionary, immunological and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J*. 17(15):2176-2183, 2003.

7- PRESENTACIÓN Y PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS REPORTADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS.

Los resultados de esta tesis fueron **presentados en:**

- Efecto del Cortisol (CORT) y la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la respuesta proliferativa *in vitro* a sonicado de *M. tuberculosis* (ST) en individuos sensibilizados a micobacterias. C.V. Mahuad, L. Vietti, M.L. Bay, O. Bottasso. XLV Reunión Anual de la SAIC, XLVIII Reunión Anual de la SAI. 22-25/11/2000; Mar del Plata, Argentina. Medicina Vol 60 N° 5/2 p.779; 2000.
- Efecto estimulante de la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la respuesta proliferativa *in vitro* frente al sonicado de *Mycobacterium tuberculosis* (ST) en pacientes con tuberculosis pulmonar leve. C.V. Mahuad, D Dlugovitzky, ML. Bay, O. Bottasso. XLVI Annual Meeting of the SAIC, XLIX Annual Meeting of the SAI. 14-17 Nov., 2001; Mar del Plata, Argentina. Medicina Vol 61 N° 5/2 p.776; 2001.
- Efecto modulador de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la inhibición de la respuesta proliferativa específica *in vitro* inducida por Cortisol (GC), en pacientes con Tuberculosis Pulmonar (TBC). Bay ML, Mahuad CV, Bozza V, Wojdyla D, Farroni MA, Vogue C, Bottasso OA. 30° Congreso Argentino de Medicina Respiratoria. 26-29 de Oct., 2002; Buenos Aires, Argentina. Revista Argentina de Medicina Respiratoria, Año 2 N°1 (Anexo A) PO043, 2002.
- Immune-endocrine interactions during the development of pulmonary tuberculosis. C. Mahuad, ML.Bay, O.Bottasso, A.del Rey, H.Besedovsky. 3er Symposio GEBIN. 30 Sept.- 2 Oct., 2003, Munich. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, Vol. 253(5):261,Oct.2003.
- Interacciones Inmunoendócrinas en Tuberculosis pulmonar (TB).I. Niveles circulantes de Interferón gamma (IFN-G), Interleucina (IL) 10, IL-6, Cortisol, DHEA, Prolactina (PR) y Somatotrofina (STH). Mahuad C, Bay ML, Dlugovitzky D, Bozza V, del Rey A, Besedovsky H, Bottasso O. XLVIII Reunión Científica de la SAIC y LI Reunión Científica de la SAI, 19-22 Noviembre de 2003, Mar del Plata. Medicina Buenos Aires, Vol 63 N° 5/2, p 634, 2003.
- Interacciones Inmunoendócrinas en Tuberculosis pulmonar (TB). II. Niveles circulantes de Interleucina 6 (IL-6), Testosterona, Estradiol y Hormonas Tiroideas. Mahuad C, Bay ML, Dlugovitzky D, Dídoli G, del Rey A, Besedovsky H, Bottasso O. XLVIII Reunión Científica de la

SAIC y LI Reunión Científica de la SAI, 19-22 Noviembre de 2003, Mar del Plata. Medicina Buenos Aires, Vol 63 N° 5/2, p 634, 2003.

- Efecto de sobrenadantes de células periféricas mononucleares (CPM) de enfermos de tuberculosis (TB), reestimuladas *in vitro*, sobre la producción de dehidroepiandrosterona (DHEA) de células adrenales. Mahuad CV, Bozza V, Bay ML, Giri A, Besedovsky H, del Rey A, Bottasso O. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas SAIC, SAI, SAFE, SAN CABiología, SABiofísica, SAF. Mar del Plata 16-20/11/2004.
- Alteraciones de las concentraciones hormonales plasmáticas en pacientes con tuberculosis pulmonar de distinta severidad. Mahuad CV, Bozza V, Farroni M, Bogue C, del Rey A, Besedovsky H, Bottasso O, Bay ML. IV Congreso de la ALAT y 32° Congreso Argentino de Medicina Respiratoria. Buenos Aires 9-12/10/2004. Arch Bronconeumol 2004; 40 (supl 4): 25-26.
- Dehidroepiandrosterona como moduladora de la producción de factor de crecimiento transformante- β en cultivo de células mononucleares sanguíneas de pacientes con tuberculosis pulmonar. VV Bozza, CV Mahuad, L D'Attilio, DI Mahuad, MA Farroni, Bottasso OA y ML Bay. IV Congreso de la ALAT y 32° Congreso Argentino de Medicina Respiratoria. Buenos Aires 9-12/10/2004. Arch Bronconeumol 2004; 40 (Supl 4):26.

Los siguientes trabajos que agrupan los resultados correspondientes a los estudios acerca de los efectos de cortisol y DHEA sobre la linfoproliferación y la síntesis de interleucocinas *in vitro*, así como el perfil endócrino y de citoquinas plasmáticas durante la tuberculosis pulmonar fueron **publicados en**:

- Cortisol and dehydroepiandrosterone affect the response of peripheral blood mononuclear cells to mycobacterial antigens during tuberculosis. Mahuad C, Bay ML, Farroni MA, Bozza V, del Rey A, Besedovsky H, Bottasso O. *Scand J Immunol* 2004, Dec 60(6):639-646.
- Endocrine and cytokine responses during lung tuberculosis. Mahuad CV, del Rey A, Bozza VV, Bogue C, Farroni MA, Bay ML, Bottasso OA, Besedovsky HO. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005. Enviado a publicación.