



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

Estela Isabel Bini^{1,2}, Dulce Mata Espinosa¹, Brenda Marquina Castillo¹, Jorge Barrios Payán¹, Darío Colucci², Alejandro Francisco Cruz¹, Zyanya Lucía Zatarain¹, Edgar Alfonseca¹, Marta Romano Pardo³, Oscar Bottasso², Rogelio Hernández Pando^{1*}

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

* E-mail: rhdezpando@hotmail.com

Introduction

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Ethics Statements

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

Experimental Model of Progressive Pulmonary TB in BALB/c Mice

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

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

In a similar way, a group of 45 BALB/c female mice, 8-week-old and 21–23 gr of weight, was gonadectomized by removing both ovaries through bilateral incisions over the dorsum under anaesthesia in gas chamber using 0.2 ml per mouse of sevoflurane. In the sham operation group, ovaries were identified and the surgical incision was then stitched with sterile silk. After two weeks for recovering, all the animals were anesthetized in gas chamber using 0.1 ml per mouse of sevoflurane, and infected through endo-tracheal instillation with 2.5×10^7 live bacilli into a cabinet level III of biosecurity. Mice were maintained in vertical position until spontaneous recovery. Infected mice were maintained in groups of five in cages fitted with micro-isolators connected to negative pressure in biosafety level III facilities.

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

Preparation of Lung Tissue for Histological Analysis and Morphometry

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

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

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

Real Time PCR Analysis of Cytokines in Lung Homogenates

Left or right lung lobes from three different mice per group in two different experiments were used to isolate mRNA using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to recommendations of the manufacturer. Quality and quantity of RNA were evaluated through spectrophotometry (260/280) and on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed using 5 µg RNA, oligo-dT, and the Omniscript kit (Qiagen, Inc). Real-time PCR was performed using the 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA) and Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers for genes encoding acidic ribosomal protein (RPLP0) as house keeping gene (FWD: 5'-CTC TCG GTT TCT GGA GGG TG-3'; RV: 5'-ACG CGC TTG TAC CCA TTG AT-3'), TNF-α, IFN-γ, IL-12, iNOS, IL17, were designed using the program Primer Express (Applied Biosystems, USA) [24].

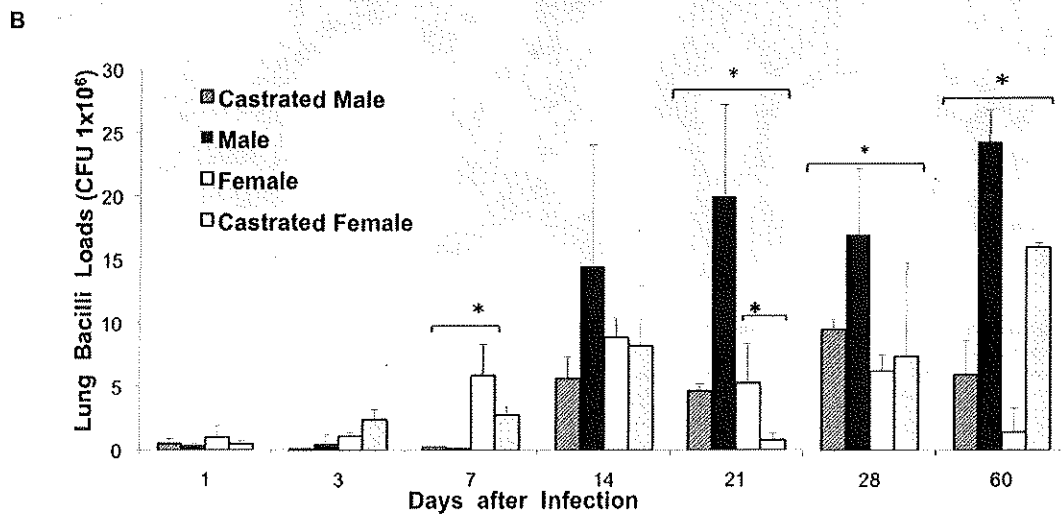
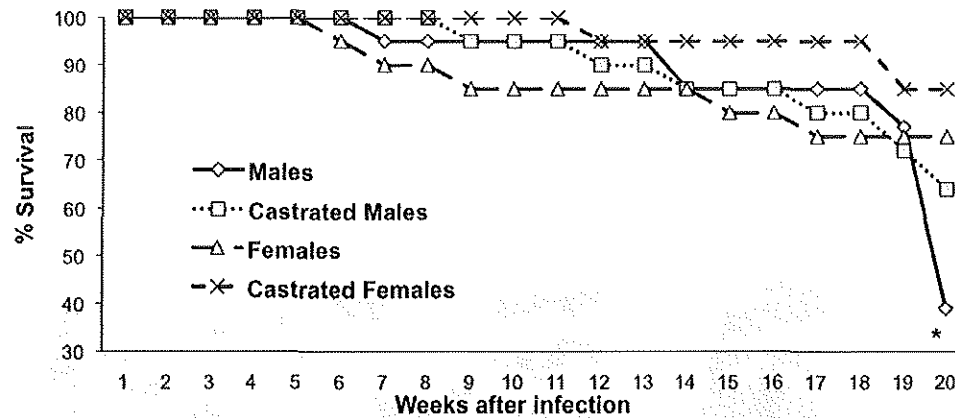


Figure 1. Survival and pulmonary bacilli loads comparisons among male and female BALB/c mice, castrated and non-castrated. Mice were infected by intratracheal route with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A) Survival curve constructed with 20 mice, male mice showed significant lower survival difference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

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

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

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

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

Statistical Analysis

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

Results

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

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

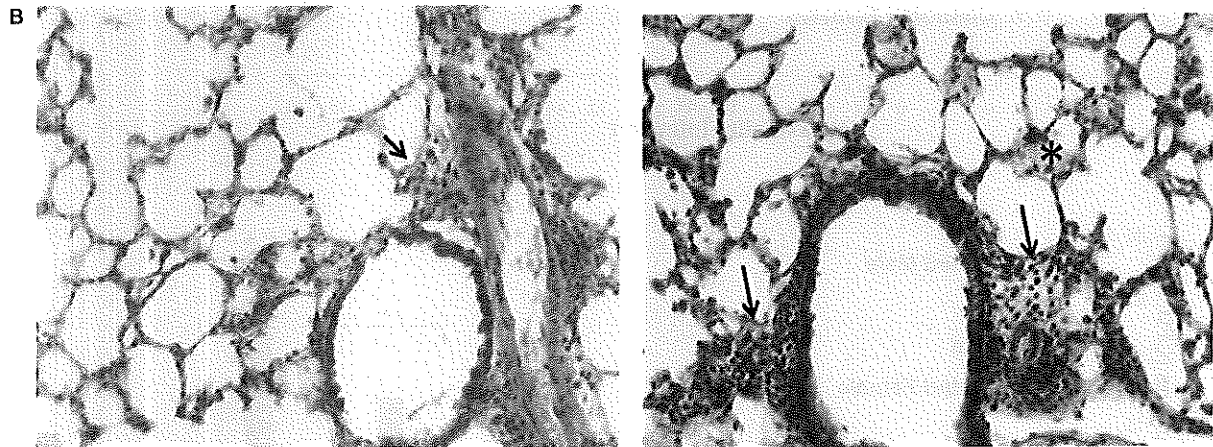
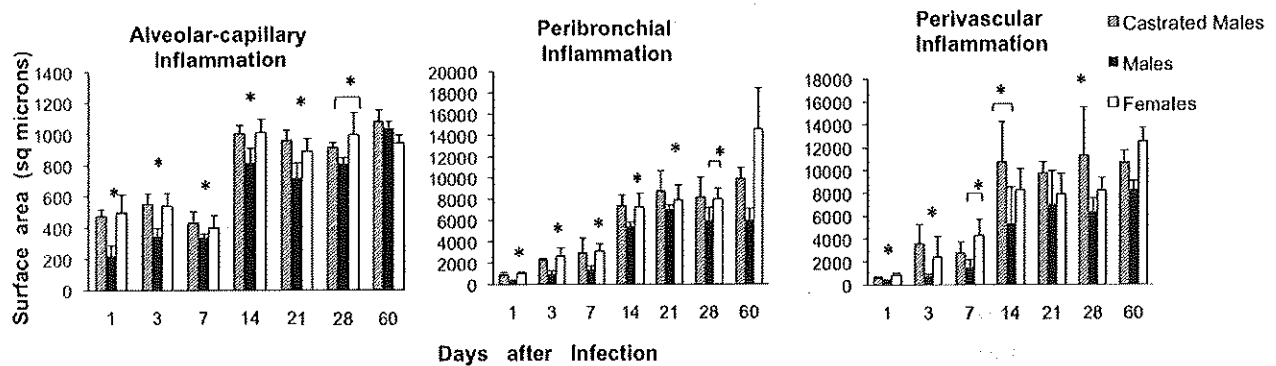


Figure 2. Kinetics of inflammatory infiltrates in the lungs of infected BALB/c mice and representative pulmonary histopathology. A) Kinetics of inflammatory infiltrates in the lungs of noncastrated and castrated male and female mice. Three lungs from the same number of different animals for each time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

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

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

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

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

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

Cytokines Gene Expression in the Lungs of Infected Mice

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

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

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

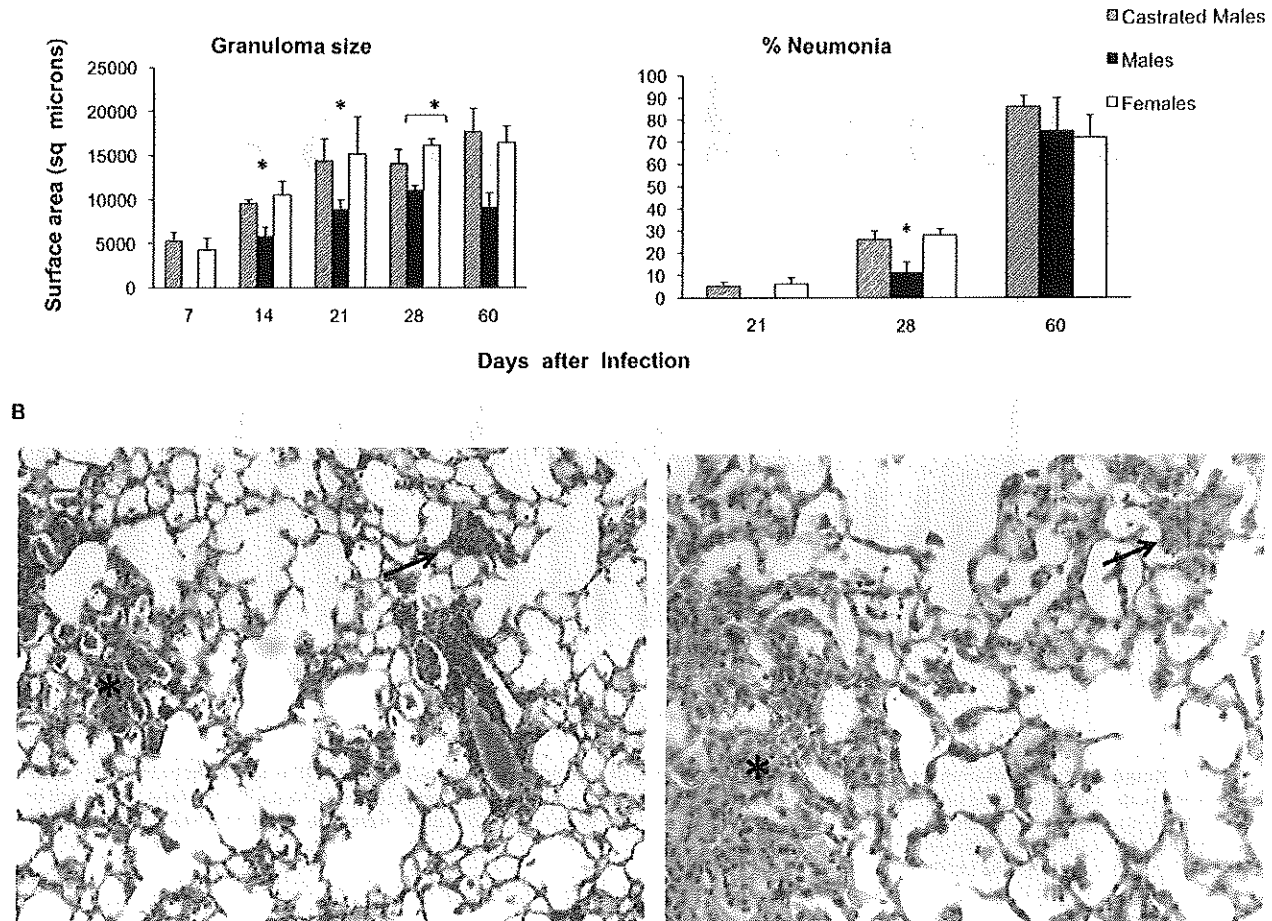


Figure 3. Determination of granuloma size and pneumonia in the lungs after 28 days of infection. A) Size in square microns of granulomas and the percentage of the lung surface affected by pneumonia determined by automated morphometry in at least 3 mice per time point and condition, asterisks represent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

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

Discussion

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

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

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

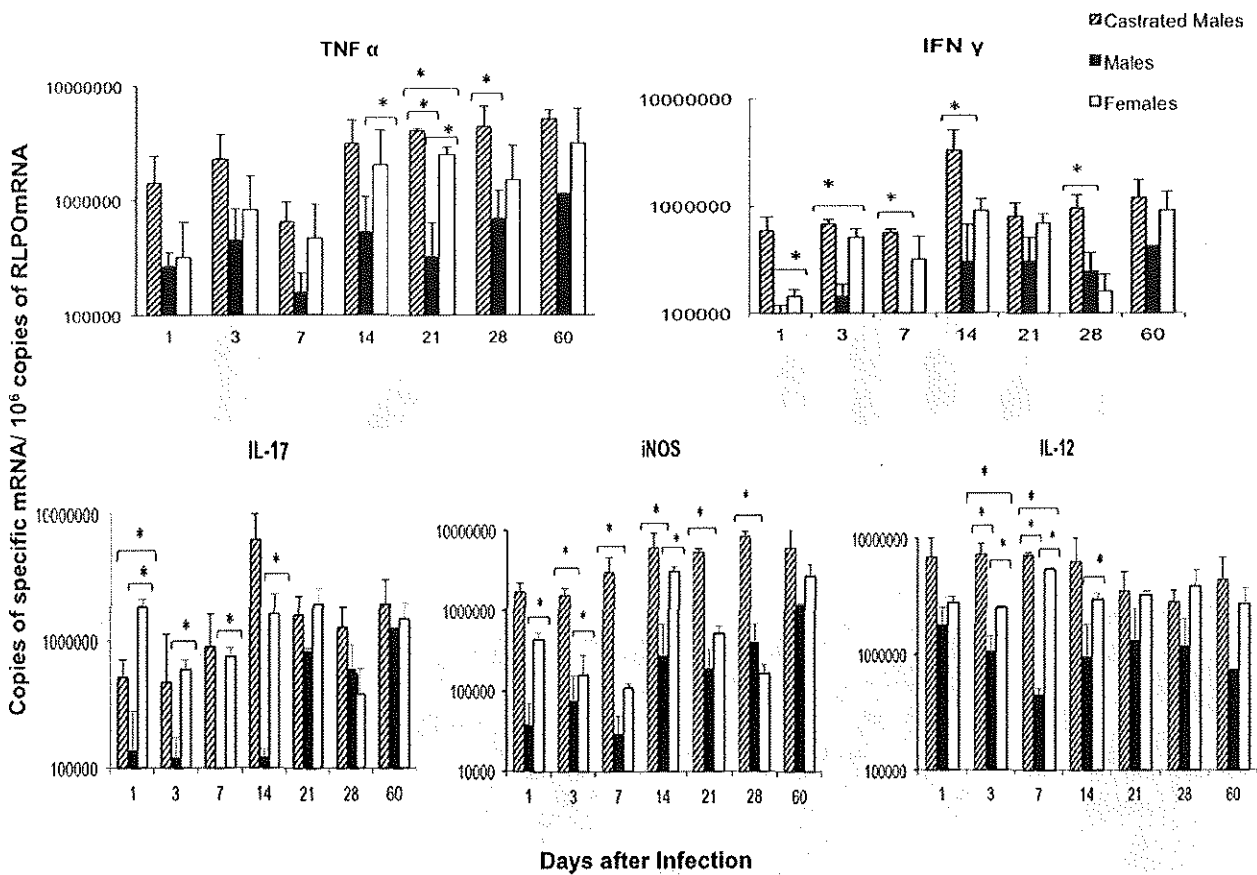


Figure 4. Kinetics of pro-inflammatory cytokines and INOS gene expression determined by RT-PCR in the infected lungs. Castrated males and noncastrated male and female BALB/c mice were infected with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv and euthanized at different time-points. The lungs from three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

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

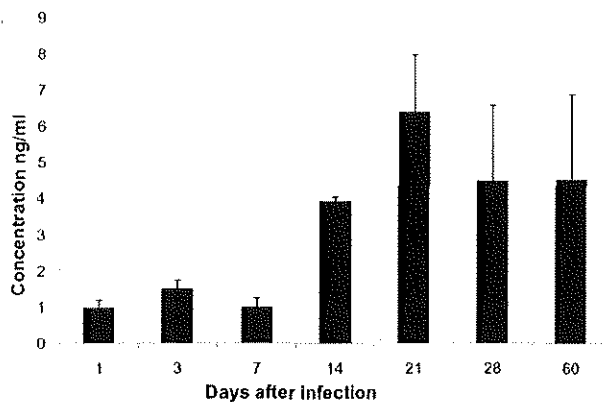


Figure 5. Serum testosterone concentration along pulmonary tuberculosis. Sera from male non-castrated mice were used to determine testosterone by ELISA in the indicated time points after intratracheal infection with *M. tuberculosis* strain H37Rv. Data are expressed as means and standard deviation of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

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

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

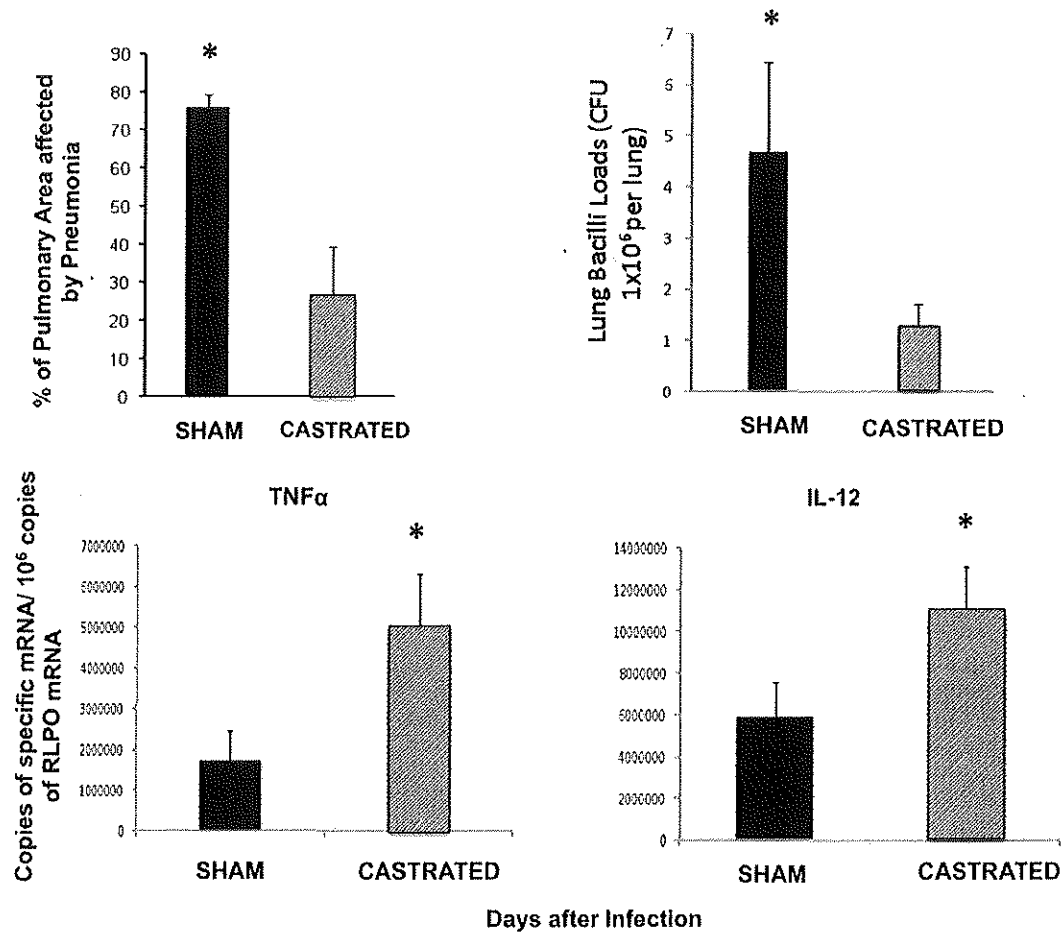


Figure 6. Effect of orchidectomy in BALB/c mice after 60 days of infection. Male mice were infected intratracheally with *M. tuberculosis* strain H37Rv and after two months one group of six animals were castrated and other group was sham operated. One month after castration animals were euthanized and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

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

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

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

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

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

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

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

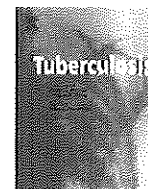
Author Contributions

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

References

- Klein SL (2000) The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Rev* 24: 627–638.
- WHO (2009) Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO. Available: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/.
- Martínez AN, Rhee JT, Small PM, Behr MA (2000) Sex differences in the epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 26–31.
- Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, Dye C, Nunn P (2000) Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore gender differences in case detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 123–132.
- Uplekar M, Rangan S, Ogden J (1999) Gender and tuberculosis control: towards a strategy for research and action. WHO/TB/2000.280. Geneva: World Health Organization.
- Neyrolles O, Quintana Murci L (2009) Sexual inequality in tuberculosis. *Plos Med* 6: e1000199.
- Buaman A, Heineman MJ, Faas M (2005) Sex hormones and immune response. *Hum Reprod Update* 11: 411–423.
- Ansar AS, Penhale WJ, Talal N (1985) Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormones action. *Am J Pathol* 121: 531–551.
- Butterworth M, McClellan B, Allansmith M (1967) Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature* 214: 1224–1225.
- Eidinger D, Garrett TJ (1972) Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J Exp Med* 136: 1093–1116.
- Rhodes A, Scott A, Markham RL, Monk Jones ME (1969) Immunological sex differences: a study of patients with rheumatoid arthritis, their relatives, and controls. *Ann Rheum Dis* 28: 104–120.
- Cutolo M, Seriole B, Villaggio B, Pizzorni C, Cravotto C, et al. (2002) Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 66: 131–142.
- Ahmed SA, Hissong BD, Verheij D, Damer K, Becker K, et al. (1999) Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 107: 681–686.
- D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, et al. (1999) Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann NY Acad Sci* 876: 426–429.
- Rook GA, Hernández Pando R, Dheda K, Teng Seah G (2004) H-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunol* 25: 183–188.
- Zuckerman SH, Bryan Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL (1995) In vivo modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology* 86: 18–24.
- Fox HS, Bond BL, Parlow TG (1991) Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* 146: 4362–4367.
- Yamamoto Y, Tomioka H, Sato K, Saito H, Yamada Y, et al. (1990) Sex differences in the susceptibility of mice to infection induced by *Mycobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis* 142: 430–433.
- Yamamoto Y, Saito H, Setogawa T, Tomioka H (1991) Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun* 59: 4089–4096.
- Tsuyuguchi K, Suzuki K, Matsumoto H, Tanaka E, Amitani R, et al. (2001) Effect of oestrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin Exp Immunol* 123: 428–434.
- Hernández Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, et al. (1996) Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89: 26–33.
- Hernández Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva Sahú J, et al. (1997) Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 90: 607–617.
- Hernández Pando R, Strebler Ma de la Luz, Orozco H, Arriaga K, Pavón L, et al. (1998) The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology* 5: 231–241.
- Hernández Pando R, Aguilar D, Smith I, Manganelli R (2010) Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 78: 3168–3176.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, et al. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37: 112–119.
- Jiménez Corona ME, García García L, DeRiemer K, Ferreyra Reyes L, Bobadilla del Valle M, et al. (2006) Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 61: 348–353.
- Weiss MG, Sommerfeld J, Uplekar MW (2008) Social and cultural dimensions of gender and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 829–830.
- Balasubramanian R, Garg R, Santha T, Gopi PG, Subramani R, et al. (2004) Gender disparities in tuberculosis: report from a rural DOTS programme in south India. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 323–332.
- Tekkel M, Rahu M, Loit HM, Bahurin A (2002) Risk factors for pulmonary tuberculosis in Estonia. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 887–894.
- Curtis AB, Ritzon R, Novick LF, Driscoll J, Blair D, et al. (2000) Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns in a homeless shelter outbreak. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 308–313.
- Kolappan G, Gopi PG (2002) Tobacco smoking and pulmonary tuberculosis. *Thorax* 57: 964–966.
- Lienhardt C, Fielding K, Sillah JS, Bah B, Gustafson P, et al. (2003) Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. *Int J Epidemiol* 34: 914–923.
- Hamid Salim MA, Declercq E, Van Deun A, Saki KA (2004) Gender differences in tuberculosis: a prevalence survey done in Bangladesh. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 952–957.
- Bustamante J, Picard C, Fieschi C, Filipe Santos O, Feinberg J, et al. (2007) A novel X-linked recessive form of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *J Med Genet* 44: e65.
- Filipe Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku CL, et al. (2006) X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* 203: 1745–1759.
- Boelaert JR, Vandecasteele SJ, Appelberg R, Gordeuk VR (2007) The effect of the host's iron status on tuberculosis. *J Infect Dis* 195: 1745–1753.
- Lin CM, Davidson TM, Ancoli-Israel S (2006) Gender differences in obstructive sleep apnea and treatment implications. *Sleep Med Rev* 12: 181–196.
- Rodón A, Moser M, Tri S, Mercader M, Kuntz SM, et al. (2004) Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J Immunol* 173: 6098–6108.
- Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ (1998) Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human

- monocytes: requirement for CD4⁺T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. *J Immunol* 160: 2400–2417.
40. Brown IN, Glynn AA (1987) The *Ity/Ish/Bcg* gene significantly affects mouse resistance to *Mycobacterium lepraemurium*. *Immunology* 62: 587–591.
 41. Roberts M, Buchanan K, Evans M, Marin RH, Satterlee DG (2009) The effect of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *J Exp Biol* 212: 3125–3131.
 42. Okada M, Suzuki A, Mizuno (1997) Effects of 17 α -estradiol and progesterone on migration of human monocytic THP-1 cells stimulated by minimally oxidized low-density lipoprotein *in vitro*. *Cardiovasc Res* 34: 529–535.
 43. Asai K, Hiki N, Minura Y, Ogawa T, Unou K, et al. (2001) Gender difference in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 16: 310–313.
 44. Buckley AR (2001) Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lipids* 10: 684–690.
 45. del Rey AD, Mahood GV, Bozza VV, Bogue C, Farroni MA, et al. (2007) Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun* 21: 171–179.



IMMUNOLOGICAL ASPECTS

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



Estela Isabel Bini ^{a,b,*}, Luciano D'Attilio ^b, Brenda Marquina-Castillo ^a, Dulce Mata-Espinosa ^a, Ariana Díaz ^b, Ricardo Marquez-Velasco ^c, Octavio Ramos-Espinosa ^a, Armando Gamboa-Domínguez ^a, Maria Luisa Bay ^b, Rogelio Hernández-Pando ^a, Oscar Bottasso ^b

^a Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México City, Mexico

^b Institute of Clinical and Experimental Immunology of Rosario, IDICER (CONICET-UNR), Suipacha 590, Rosario, Argentina

^c Department of Immunology, National Institute of Cardiology "Dr Ignacio Chavez", Juan Badiano 1, Tlalpan, México City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2015

Received in revised form

12 June 2015

Accepted 21 June 2015

Keywords:

Tuberculosis

Testosterone

Cytokines

Gonadal steroids

SUMMARY

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

Methods: Plasma samples from 36 active untreated pulmonary TB male patients were used to determine TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6, cortisol, dehydroepiandrosterone, testosterone, progesterone, estradiol, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) by ELISA. Healthy controls corresponded to 21 volunteers without contact with TB patients and similar age (40 ± 16.8 years). Testicular histological samples from necropsies of patients dying from TB were immune-stained for IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IFN- γ . The TM3 mouse Leydig cell line was incubated with recombinants TNF- α , IFN- γ and TGF- β , supernatants were collected and used to measure testosterone by ELISA.

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

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One-third of the human population is infected by *M. tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB). The development of clinical TB occurs in 5%–10% of them at some point in their lives, for reasons that are not completely understood [1]. As yet, the development of TB seems to depend on a relatively inability

of the host to mount an effective response [2]. In individuals wherein the immune response fails to clear the pathogen, a sort of trade-off between the host and microbe takes place, in many cases resulting in a misdirected response which contributes to the development of different levels of tissue damage, as is the case of TB [3,4]. Earlier studies by our group indicate that dysregulated immune responses during human TB translate in an excessive production of pro-inflammatory cytokines which are known to stimulate the endocrine system promoting an unfavorable environment, either for the development of a protective immune response, or the clinical status of patients [5,6]. This bears some relationship with the view that chronic stressful conditions may lead to protracted responses not always beneficial [7], i.e.;

* Corresponding author. Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México D.F., Mexico. Tel.: +52 55 54870900.

E-mail address: estelabini@yahoo.com.ar (E.I. Bini).

endocrine abnormalities involving disturbances of the HP Adrenal (HPA) and Gonadal (HPG) axes, among others.

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

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

In expanding our knowledge into this kind of immune-endocrine communication, the present study was initially addressed to explore the eventual relationship between components mainly from the HPG axis with cytokines involved in the immune and inflammatory response, of male TB patients. One finding to remark was the detection of decreased levels of testosterone in presence of higher amounts of luteinizing hormone (LH), suggesting that testosterone secretion may be modulated by *in situ* influences arisen because of the infectious process, i.e., cytokines. According to this assumption, testicular histological samples from necropsies of patients dying from TB were immune-stained for several pro-inflammatory cytokines which revealed an abundant presence of interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IFN- γ in interstitial macrophages, Sertoli cells and some spermatogonia.

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

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

2. Materials and methods

2.1. Sample population

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

2.2. Plasma measurements

Blood samples were collected from patients and healthy volunteers at 8:00 am. Plasma was obtained from EDTA-treated blood. Following addition of aprotinin (100 U/ml plasma; Trasylol, Bayer, Germany), samples were preserved at -20°C . TNF- α , IFN- γ , TGF- β (Pharmingen, Germany), IL-6 (Amersham, UK), cortisol, DHEA, testosterone, progesterone, estradiol, Luteinizing Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) (DRG Systems, Germany, in all cases) concentrations were determined using commercially available ELISA kits. The detection limits and the Coefficient Variation % (CV) were, respectively: IFN- γ : 4.7 pg/ml; TGF- β : 2 pg/ml, CV: 1; TNF- α : 7.8 pg/ml; IL-6 0.1 pg/ml, cortisol: 2.5 ng/ml, CV: 8.1–5.6; DHEA: 0.1 ng/ml, CV: 3.52–2.64; progesterone 2 ng/ml, CV: 5.4–6.86; testosterone: 0.07 ng/ml, CV: 4.16–3.34; estradiol: 4.6 pg/ml, CV: 6.81–4.13; LH: 0.2 ng/ml (range assay: 0.86–100 mIU/mL), CV: 7.62–4.57; and FSH: 0.4 $\mu\text{g/dl}$ (range assay: 1.27–200 mIU/mL), CV: 7.91–4.18. Results were expressed as the average of two determinations (pg/ml) in an ELISA microplate reader at 450 nm. Cytokines were quantified using reference standard curves generated with human recombinant cytokines. Recent parallel studies by measuring cortisol or DHEAS in plasma (by ELISA with aprotinin) or serum (by electrochemoluminescence without aprotinin) in the same blood samples, yielded quite similar results (the correlation coefficient was nearly to 1 in both cases).

2.3. Cytokine detection by immunohistochemistry in testicular samples

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

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

2.4. *In vitro* production of testosterone by Leydig cells incubated with cytokines

The TM3 cell line, derived from mouse Leydig cells, was purchased from ATCC (ATCC® CRL1714™). Cells were cultured in 1:1 vol of Ham's F12 medium and Dulbecco's modified Eagle's medium, with 2.5 mM L-glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate, 1.2 g/L sodium bicarbonate, and 15 mM HEPES (all from Corning Life Technology,

USA), 92.5%; Horse serum, 5%; Fetal bovine serum (both from Thermo Scientific, USA) 2.5%; and 1% of Penicillin-Streptomycin (GYBCO, USA). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere (95%) at 5% CO₂. For assessing testosterone production, TM3 cells were plated in 96-well plates. After 48 h, medium was replaced with medium containing 2.5 UI/ml hCG (Sigma, USA) kindly provided by Dra Lorenza Díaz, Reproductive Biology Department, INCMNSZ, and recombinants TNF- α , IFN- γ and TGF- β kindly provided by Dr F Lopez Casillas from the Cellular Physiology Institute, National University of México; (TNF- α 5 ng/ml, IFN- γ 4000 pM, and TGF- β at 1 ng/ml). Different conditions were settled by triplicate. Leydig cell culture media from each treatment were collected 24 h later and used to assess testosterone by a commercial ELISA kit (DRG systems, USA), according to the manufacturer indications.

2.5. Statistical analysis

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

3. Results

Assessment on hormones from the HPG axis showed that TB patients had respectively decreased and increased amounts of testosterone and LH respect to healthy controls (HCo); with a statistically insignificant trend of FSH levels to be a little increased in TB patients (Figure 1, panels a–c). Levels of estradiol and progesterone in TB patients practically overlapped with those seen in HCo, with progesterone showing the lowest amounts in both subject groups (data not shown). In relation to cytokines, there were no gross between-group differences in TNF- α values (data not shown), whereas IFN- γ , IL-6 and TGF- β levels were found augmented in TB, significantly different from HCo (Figure 2, panels a–c). Tested compounds were unrelated to age. Further comparisons within the

TB group according to disease severity showed that patients with more progressive forms of TB had a further increase, statistically insignificant, of IFN- γ and IL-6 levels respect cases with mild disease (data not shown).

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

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

3.1. Histological and immunohistochemistry findings

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

3.2. Testosterone production by Leydig cells exposed to different cytokines

In a further experiment, the TM3 cell line, derived from mouse Leydig cells, was cultured in triplicate and exposed to different

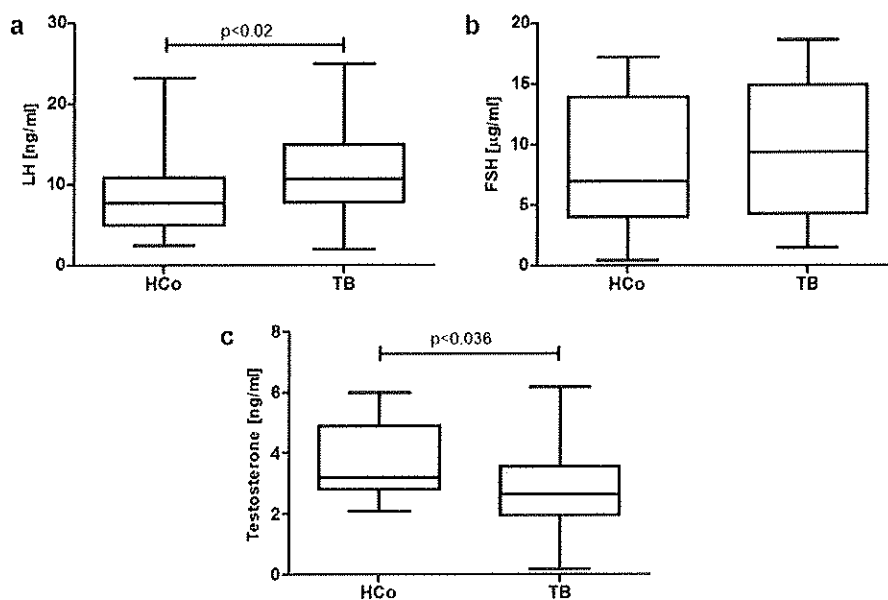


Figure 1. Circulating levels of hormones in patients with active pulmonary TB and healthy controls (HCo). Box plots show 25–75 percentiles of data values in each group with maximum and minimum values. The line represents the median values. Comparisons between groups (TB vs HCo) were performed by non-parametric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

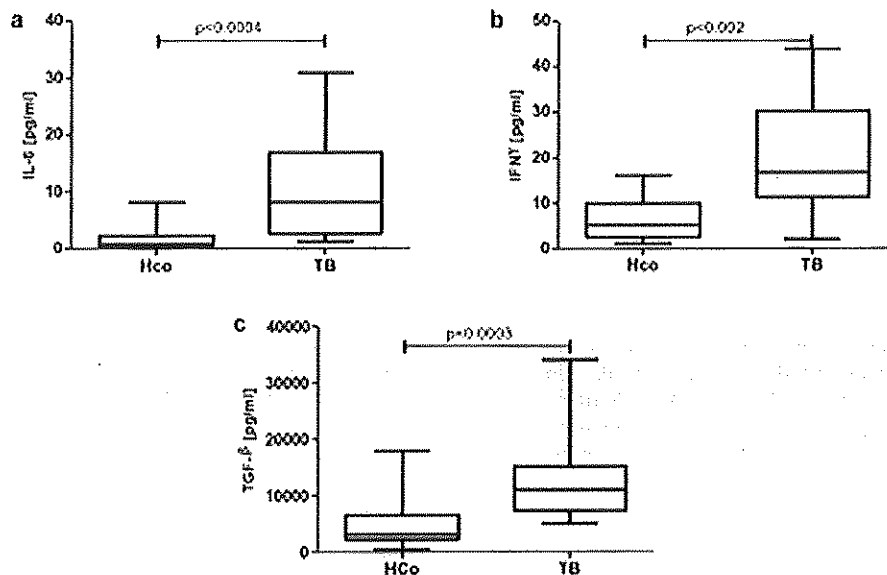


Figure 2. Circulating levels of cytokines in patients with active pulmonary TB and healthy controls. Box plots show 25–75 percentiles of data values in each group with maximum and minimum values. The line represents the median values. Comparisons between groups (TB vs HCo) were performed by non-parametric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

mouse recombinant cytokines (TNF- α , IFN- γ and TGF- β). Assessment on the levels of testosterone in culture media collected 24 h later revealed that cytokine-treated cultures produced much lesser amounts of testosterone when compared with cultures without cytokines (overall difference, $p < 0.015$, Table 1).

4. Discussion

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

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

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

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

Since testes from TB patients contained increased amounts of pro-inflammatory cytokines, an attempt at experimentally reproducing the influence of such situation on testosterone production was carried out. Confirming reports from other laboratories, pro-inflammatory cytokines significantly inhibited testosterone production by Leydig cells [12,21]. In analyzing cytokine effects, we also wished to ascertain the effect of TGF- β since this cytokine was also found increased in TB patients [26] being quite relevant in several aspects of TB immunopathogenesis [27]. Our findings revealed that Leydig cells exposed to TGF- β produced lesser amounts of testosterone. Beyond its pro- and anti-inflammatory effects [28], TGF- β was also shown to influence male gonadal function. In the testis, TGF- β regulates the secretor function of Leydig and Sertoli cells, as well as testis development and spermatogenesis [29,30]. TGF- β 1 represses testosterone production in Leydig cells through decreasing LH/hCG receptor expression and the expression of steroidogenic genes such as StAR and P450c17 [31]. As well as reducing testosterone production, our former studies also showed that TGF- β was also able to inhibit DHEA by adrenal cells [32], which bears relation with the present demonstration of the inverse association between TGF- β and DHEA. Collectively, it implies a broader range of inhibition of androgen production by this cytokine and the adverse consequences

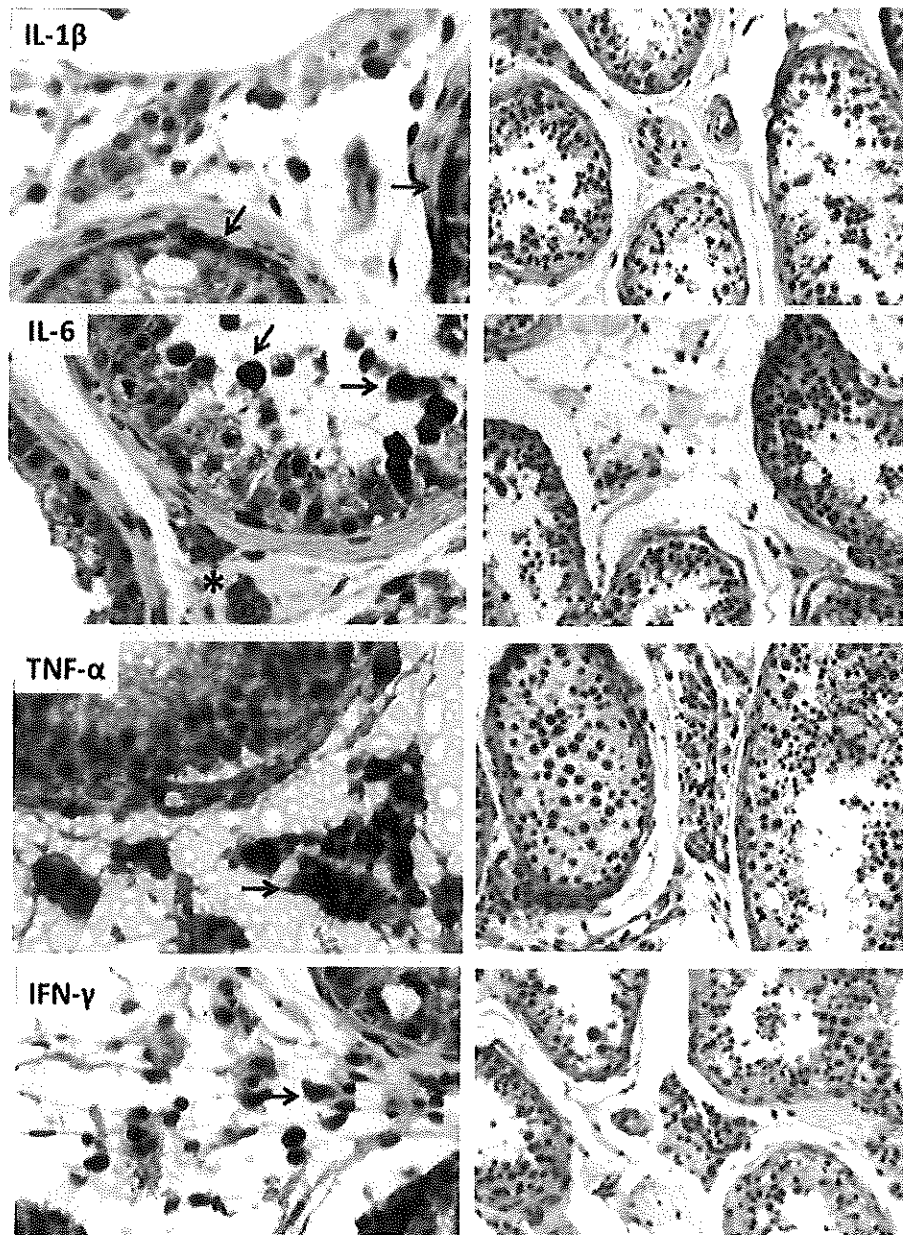


Figure 3. Representative immunohistochemistry for cytokine detection in testicular tissue. Sections from TB autopsy cases (left row) and control cases from subjects dying from causes other than TB (right row), were incubated with specific antibodies to detect the indicated cytokines. Sertoli cells showed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

resulting from it; mainly because of the anabolic and anti-inflammatory effects of testosterone [33]. Within this context, diminished amounts of testosterone would not be sufficient to counteract the synthesis of mediators dealing with accompanying inflammatory reaction. Since testosterone and Cortisol display anti-inflammatory effects, the negative correlation between both steroids perhaps may reflect a compensatory interaction between the HPG and HPA axes, to assure some form of a counterbalancing effect for the accompanying inflammation. Also, the inverse correlation between testosterone and IFN- γ levels may be explained in view of the inhibitory effects of the gonadal steroid on Th1 cell differentiation [34]. Another reason for the inhibition of testosterone

production may have to do with energy conservation necessary to sustain the immune response. Alternatively, it may represent an adaptive mechanism attempting to avoid the reproduction of the more susceptible people to illness and hence preventing the propagation of this defect.

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

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

Treatments	Testosterone levels (ng/ml)
TNF- α	0.119 \pm 0.012
TGF- β	0.102 \pm 0.042
IFN- γ	0.130 \pm 0.026
Control	5.740 \pm 0.026*

Recombinant cytokines TNF- α 5 ng/ml, or IFN- γ 4000 pM, or TGF- β 1 ng/ml were added to TM3 cells after 2 hours with hCG to stimulate basal testosterone production. Control cultures were stimulated with hCG. Testosterone concentration in the media in which Leydig cells were cultured was assessed 24 h later in duplicate.

Significantly different from the remaining groups $p < 0.001$.

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

5. Conclusions

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

Acknowledgments

This study was supported by CONACyT (contract: 84456) and Thematic Network N° 253053, CONACyT.

Funding: None declared.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The study protocol was approved by the Ethic Committee of the School of Medical Sciences, National University of Rosario, Argentina.

References

- [1] World Health Organization. World health report. WHO report. 2013. Available at: www.who.int/vhr/en/.
- [2] Cass J.D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:581–91.
- [3] Kandari F, Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:20–7.
- [4] Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Adverse neuro-immuno-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci* 2013;53:77–85.
- [5] del Rey A, Mahuad CV, Bozza V, Bogue C, Farroni MA, et al. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun* 2007;21:171–9.
- [6] Santucci N, D'Attilio L, Kovalevski I, Bozza V, Besedovsky H, et al. Multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2011;6:e26363.
- [7] Kiewen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 1988;338:171–9.

- [8] Keven K, Uysal AR, Erdogan G. Adrenal function during tuberculous infection and effects of antituberculosis treatment on endogenous and exogenous steroids. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:419–24.
- [9] Rook GA, Hernandez-Pando R. Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids and antigluco-corticoids. *Psychoneuroendocrinology* 1997;22(Suppl. 1):S109–13.
- [10] Bini E, Bottasso O, Hernandez Pando R. Immunity, sex hormones and infection. *Adv Neuroimmune Biol* 2011;1:163–77. <http://dx.doi.org/10.3233/NIB-2011-010>.
- [11] Hales DB. Cytokines and testicular function. In: Hill JA, editor. *Cytokines and reproduction*. NY: John Wiley & Sons; 2000. p. 17–42 [Chapter 2].
- [12] Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2004;215:135–41.
- [13] Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, Reddy MC, Roy KR, et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol* 2006;22:493–500.
- [14] O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology* 2000;141:238–46.
- [15] Stephan JP, Syed V, Jegou B. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997;134:109–18.
- [16] Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod* 1995;53:1407–16.
- [17] Boockfor JA, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology* 1994;134:2150–5.
- [18] Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jegou B. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat Sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. *Endocrinology* 1997;138:2863–70.
- [19] Byniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. The influence of collagenase treatment on the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. *J Immunol Methods* 2005;301:186–9.
- [20] De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 1993;133:389–96.
- [21] Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review. *Microsc Res Tech* 2009;72:620–8.
- [22] Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Cravioito C, Straub RH. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical and gonadal functions in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;992:107–17.
- [23] Tengstrand B, Carlström K, Hafström I. Gonadal hormones in men with rheumatoid arthritis – from onset through 2 years. *J Rheumatol* 2009;36:887–92.
- [24] Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Raptis SA, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1271–6.
- [25] Bongiovanni B, Diaz A, D'Attilio L, Santucci N, Didoli G, et al. Changes in the immune and endocrine responses of patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1262:10–5.
- [26] Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, Urizar L, Rondelli CF, et al. *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* 1999;49:210–7.
- [27] Foossi Z, Ellner JJ. The role of TGF- β in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:107–14.
- [28] Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:447–53.
- [29] Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction* 2006;132:233–46.
- [30] Gnassi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997;18:541–609.
- [31] Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:379–84.
- [32] D'Attilio L, Bozza VV, Santucci N, Bongiovanni B, Didoli G, et al. Inhibition of DHEA production by factors released from *M. tuberculosis*-stimulated peripheral blood mononuclear cells is abrogated by transforming growth factor- β neutralization. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1262:1–9.
- [33] Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3313–8.
- [34] Kissicki HT, Sandab MG, Dunna LK, Pellegrinik KL, Ona ST, et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *PNAS* 2014;111:9887–92.



UNIVERSIDAD DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
Escuela de Graduados

ROSARIO, 27 de agosto de 2015

VISTO: las presentes actuaciones por las que se solicita la integración del Jurado que intervendrá en la evaluación del Trabajo de Tesis Doctoral presentado por la alumna de la carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Lic. Estela I. Bini, titulado: "Inmunidad y esteroides sexuales en la tuberculosis. Estudios clínicos y experimentales", realizado bajo la Dirección del Dr. Oscar Bottasso y la Co-Dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando; y

CONSIDERANDO:

QUE, la Dirección de la carrera de Doctorado informa que el Trabajo de Tesis presentado satisface los requisitos formales reglamentarios y eleva propuesta de designación de los profesionales que integrarán el Jurado encargado de evaluar dicho trabajo, adjuntando las respectivas notas de aceptación de cada uno de los miembros;

QUE, al propio tiempo solicita se les permita coordinar la fecha para la defensa oral de la Tesis de referencia, una vez obtenidos los dictámenes correspondientes;

QUE, la Doctorando Bini ha cumplimentado la totalidad de las exigencias académicas establecidas en el plan de estudios de la citada Carrera;

QUE, la Vicedirección de Escuela de Graduados acuerda con la propuesta efectuada por dicha Carrera;

QUE, la Comisión de Asuntos Académicos en su Despacho N° 116, sugiere se apruebe la constitución del Jurado que evaluará la Tesis de la Doctorando Bini y se autorice a la Dirección de la citada Carrera a coordinar la fecha y hora para la Defensa de Tesis, si ésta fuera aceptada;

POR ELLO y teniendo en cuenta lo acordado en sesión del día de la fecha;

EL CONSEJO DIRECTIVO

RESUELVE:

ARTICULO 1ro.º- Designar a los profesionales que más abajo se mencionan, en el carácter que se especifica, como integrantes del Jurado que tendrá a su cargo la evaluación del Trabajo de Tesis Doctoral presentado por la Doctorando de la carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Lic. Estela Isabel BINI (Legajo N° B-2728/6), titulado: "INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES", realizado bajo la Dirección del Dr. Oscar Bottasso y la Co-Dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando:

/ / /

CIENCIAS MÉDICAS
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS ///
Universidad Nacional de Rosario

MIEMBROS TITULARES:

- Dra. María del Carmen SASIÁIN (AN de Medicina)
- Dr. Eduardo CHULUYAN (UBA)
- Dra. María José MUNUCE (Hospital Provincial del Centenario)

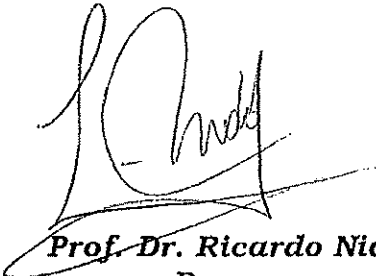
MIEMBROS SUPLENTE:

- Dra. Natalia SANTUCCI (Fac. Cs. Médicas UNR)
- Dra. Fabiana GARCÍA (Fac. Cs. Médicas UNR)

ARTICULO 2do.- Autorizar a la Dirección de la carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas, a coordinar la fecha para la Defensa Oral de la Tesis de referencia, una vez obtenidos los dictámenes aceptando dicho trabajo.

ARTICULO 3ro.- Regístrese, comuníquese, gírese a la Dirección de la carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas de esta Casa de Estudios para su conocimiento y prosecución del respectivo trámite.

RESOLUCION C.D. N° 251/2015


Prof. Dr. Ricardo Nidd
 Decano

cvb.-



FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
CERTIFICO QUE LA PRESENTE FOTOCOPIA ES
AUTÉNTICA DE SU ORIGINAL TENIDO A LA VISTA

ROSARIO 24 FEB 2017

FIRMA:
 AUTENTICACIÓN DE FIRMA: ELIZABET V. BOLCAJO
 DIRECTORA
 SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
 CONTROLADO POR:

11a Fa 3100
S2000KTR
4804558/63
341 4004558



FACULTAD DE
CIENCIAS MÉDICAS
Universidad Nacional de Rosario

2016 - "Año del Bicentenario de la Declaración de la Independencia Nacional"
Expediente N° 42705/0401

ROSARIO, 20 de octubre de 2016

VISTO: las presentes actuaciones por las que la Dirección de la carrera de Posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas, eleva para su aprobación el Trabajo de Tesis de la doctorando Estela I. Bini, titulado: "Inmunidad y esteroides sexuales en la tuberculosis. Estudios clínicos y experimentales"; y

CONSIDERANDO:

QUE, el Jurado encargado de dictaminar sobre la Tesis de referencia, integrado por las Dras. María del Carmen Sasiain y María José Munuce y el Dr. Eduardo Chuluyan, luego de efectuada la defensa oral, expresa:

- "El trabajo de tesis aborda un tema relevante dentro de la "fisiopatogenia de la tuberculosis, evaluando la influencia de la "regulación bidireccional del sistema inmune con el eje hipotálamo-hiposifario-gonadal. La tesis presenta un enfoque multidisciplinario del tema, lo cual obligó a la doctorando a formarse en diferentes áreas como son la infectología, la inmunología y la endocrinología. La metodología utilizada es acorde a los objetivos propuestos. Si bien este Jurado destaca la calidad de los resultados presentados y su discusión oral, se reconocen algunos puntos desaprovechados en la versión escrita. Se resalta la dicotomía entre la versión expuesta oralmente y la escrita."
- "Por lo expuesto, este Jurado considera por unanimidad que la Tesis de "la Doctorando merece la calificación de: 9 (nueve)".

QUE, la Comisión de Asuntos Académicos en su Despacho N° 389 sugiere, en base a lo dictaminado por los miembros del referido Jurado, aprobar el trabajo de Tesis Doctoral presentado por la doctorando Estela I. Bini;

POR ELLO y teniendo en cuenta lo acordado en sesión del día de la fecha;

EL CONSEJO DIRECTIVO

RESUELVE:

ARTICULO 1ro.- Aprobar el Trabajo de Tesis de la carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas, presentado por la doctorando Licenciada Estela Isabel BINI (Legajo N° B-2728/6), titulado: "INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES", con una calificación de NUEVE (9).

/ / /



**FACULTAD DE
CIENCIAS MÉDICAS**///
Universidad Nacional de Rosario

ARTICULO 2do.- Por Biblioteca procédase a desglosar el soporte informático que obra a fs. 10 que contiene copia digital de la Tesis de referencia para consulta de los interesados.

ARTICULO 3ro.- Regístrese, comuníquese, gírese a la Dirección Registro de Alumnos para su conocimiento y notificación fehaciente de la interesada, debiendo agregar copia de la presente resolución en el legajo personal de la recurrente y, cumplido, remítase a la Biblioteca de esta Casa de Estudios a fin de que cumplimente lo dispuesto en el artículo 2do. Diligenciado, archívese.

RESOLUCION C.D. N° 1565/2016

Prof. Dr. Ricardo Nidd
Decano

ES COPIA

GUSTAVO R. BUSTAMANTE
DIRECTOR DE DESPACHO
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
U.N.R.

eub.-

118 Fb 3100
3rio S2000KTR
341 4804558/63
221 1004500



**INFORME FINAL PARA UNU-BIOLAC DEL PROYECTO DE TESIS
“INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS.
ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES”**

Becaria: Estela Isabel Bini

Día a día, durante siglos, el sistema inmune de los mamíferos se fue adaptando en respuesta a los agentes con quienes ha ido interactuando: virus, bacterias y patógenos y ha desarrollado la capacidad para reconocerlos, reaccionar ante ellos y superar un cuadro infeccioso lo que depende de una respuesta eficaz.

Esta capacidad de respuesta está ligada también a otros factores como nutricionales, étnicos, etarios y de género. Al respecto, por ejemplo, existen estudios epidemiológicos que informan que por cada 10 personas infectadas con Tuberculosis, 7 son hombres y sólo 3 son mujeres.

Las hembras poseen un sistema inmune con diferente capacidad de respuesta respecto de los machos. Los niveles séricos de anticuerpos son más altos y sus respuestas tras la inmunización son más robustas, con una mejor respuesta humoral. Además, rechazan los aloinjertos de piel más rápidamente, lo que es indicador de una mayor inmunidad celular. Estas diferencias de género, verificadas tanto en humanos como en modelos animales, serían las responsables de la mayor susceptibilidad de las hembras al desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoidea (AR), LES (Lupus Eritematoso Sistémico) y Encefalomiелitis Autoinmune Experimental. En los machos la testosterona parece ejercer un efecto protector que disminuiría su susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes.

El dimorfismo sexual -en cuanto a la respuesta inmune- podría estar relacionado con acciones de los esteroides sexuales sobre la producción de citocinas. Comparando los perfiles de citocinas secretadas por células presentadoras de antígenos (en adelante CPA) de machos y hembras se observa que las CPA de machos secretan mayores niveles de IL-10 mientras que las CPA de las hembras producen niveles superiores de IL-12. Esto favorecería una mayor respuesta de tipo Th2 en machos. Ello está avalado por diferencias en cuanto a la presencia de receptores específicos para estas hormonas en distintos tipos de células inmunocompetentes. Los estudios sobre los efectos de la testosterona en ratones indican que la castración aumenta la susceptibilidad al shock endotóxico acompañada de una mayor expresión de TLR4 sobre la superficie celular de sus macrófagos, por lo que la testosterona reduciría la expresión de TLR4 en estas células. Los mismos autores demostraron además que estrógenos como el 17-β estradiol aumentan la expresión de TLR4 y de CD14 en macrófagos y regulan la susceptibilidad a la sepsis experimental. Al privar del estrógeno endógeno la producción de citocinas pro y antiinflamatorias decrecía, a la par de una reducción de TLR4 en dichas células. Se desprende que mientras los andrógenos suprimen la respuesta ante el desafío con una endotoxina bacteriana, los estrógenos promueven un aumento de tal reactividad.

Tomados en su conjunto, los andrógenos parecen ejercer efectos supresores en la respuesta inmune celular y humoral, y se comportan como hormonas anti-inflamatorias naturales. Por su parte, los estrógenos producen un incremento en los mediadores de la respuesta humoral y afectan el balance entre células T y B, ya que descienden la actividad de las primeras mientras que favorecen una hiperactividad de las segundas.

Los andrógenos también tienen efecto en la secreción de citocinas, pero su influencia sobre las mismas puede depender no sólo de la concentración del esteroide, sino también del estatus hormonal del individuo, del rango social, o del momento estacional.

Existen antecedentes de que los esteroides sexuales también influyen sobre la respuesta inmune anti-infecciosa. En nuestro proyecto, nos hemos concentrado en la respuesta inmune y el análisis del efecto de los esteroides sexuales durante el curso de la Tuberculosis. Ésta enfermedad está ocasionada por un agente de vida intracelular, el *Mycobacterium tuberculosis*, el cual afecta esencialmente al pulmón donde puede producir desde algunas pocas lesiones hasta un cuadro de extensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Dicho espectro de afectación orgánica parece estar relacionado con la respuesta inmune celular hacia la micobacteria, habida cuenta que puede mediar tanto protección como daño tisular. Los elementos esenciales que participan de esta respuesta comprenden a los macrófagos y a las células T. Los primeros fagocitan a la micobacteria, promoviendo la producción de diferentes citocinas y la presentación de antígenos a células CD4+, las que a su vez sintetizan mediadores tipo Th1, como el IFN- γ y la IL-2, capaces de potenciar la acción bacteriostática-bactericida de los macrófagos y promover la proliferación de los linfocitos respondedores, respectivamente. Como fuera señalado más arriba las células T también pueden diferenciarse hacia el tipo Th2 para sintetizar citocinas estimuladoras de la inmunidad humoral como la IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Estudios en pacientes con Tuberculosis pulmonar (TB) de distintas geografías concuerdan en observar alteraciones en la producción de citocinas Th1 y Th2 con un predominio de las primeras en las formas leves, no así en los casos avanzados donde prevalece la síntesis de citocinas Th2. Los factores por lo cuales se produce esta alteración involucran no sólo a mediadores inmunológicos sino también a componentes del sistema neuroendócrino dado su estrecha interconexión.

Del Rey *et al* también reportaron una disminución en los niveles de testosterona en presencia de mayores concentraciones de estradiol lo que en su conjunto podría favorecer la persistencia de las reacciones inflamatorias como así también el corrimiento hacia el perfil Th2 en la enfermedad progresiva, habida cuenta de las acciones de ambas hormonas sobre estas respuestas.

Muy pocos estudios han tenido en cuenta la participación de los esteroides sexuales en la resistencia/susceptibilidad a la TB tanto en humanos como modelos experimentales. Un par de trabajos señalan que los ratones hembras son más resistentes a la infección con micobacterias no tuberculosa, y que el tratamiento con testosterona eleva la susceptibilidad a la infección con *Mycobacterium marinum*.

En función de todo lo expuesto consideramos de sumo interés analizar la influencia de las hormonas sexuales en la enfermedad tuberculosa. Para una aproximación más mecanística el estudio se centró en un modelo muy bien caracterizado de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Para la realización de este proyecto, era clave el uso de un bioterio con las características de bioseguridad imprescindibles para el trabajo con una cepa virulenta de *M. tuberculosis*, y las máximas condiciones de higiene para evitar variabilidad causada por otros factores. Para tal fin nos contactamos con el Dr. Hernández-Pando, en México, quien tiene muy bien desarrollado este modelo y el equipamiento necesario para llevarlo a cabo. Así pudimos iniciar el estudio desde el inicio de la infección, determinar los niveles hormonales y de citocinas, modificar el perfil hormonal de los ratones mediante la

castración, hacer un estudio histológico morfométrico, y determinar el número de colonias de micobacterias presentes en los pulmones murinos.

Para ser más específicos, nuestros objetivos eran:

En el modelo experimental (a realizarse en México)

- Establecer las diferencias en el curso de la enfermedad (mortalidad, carga bacilar pulmonar, extensión de daño histológico, expresión de citocinas de tipo Th-1 y Th-2) entre ratones machos y hembras de la cepa Balb/c infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de *M. tuberculosis* vivo y virulento cepa H37Rv.
- Comparar la evolución de la enfermedad entre ratones machos y hembras castrados y no castrados
- Cuantificar la concentración de testosterona en el suero de ratones machos infectados a lo largo de la enfermedad

En pacientes (a realizarse en Argentina)

- En pacientes con TB pulmonar de distinta severidad, HIV negativos y que aún no han iniciado tratamiento antibacilar.
- Investigar en qué medida las variaciones en los niveles circulantes de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona y citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-6) se correlacionan entre sí y con la severidad de la enfermedad.
- Determinar si existen diferencias por sexo en cuanto a la presentación clínica de la enfermedad.

El apoyo de UNU-BIOLAC fue fundamental para la concreción del estudio experimental en México.

REALIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL, EN MÉXICO:

Se trabajó con ciento diez ratones machos y el mismo número de hembras, Balb/c, de 8 semanas de edad, que fueron divididos en cuatro grupos:

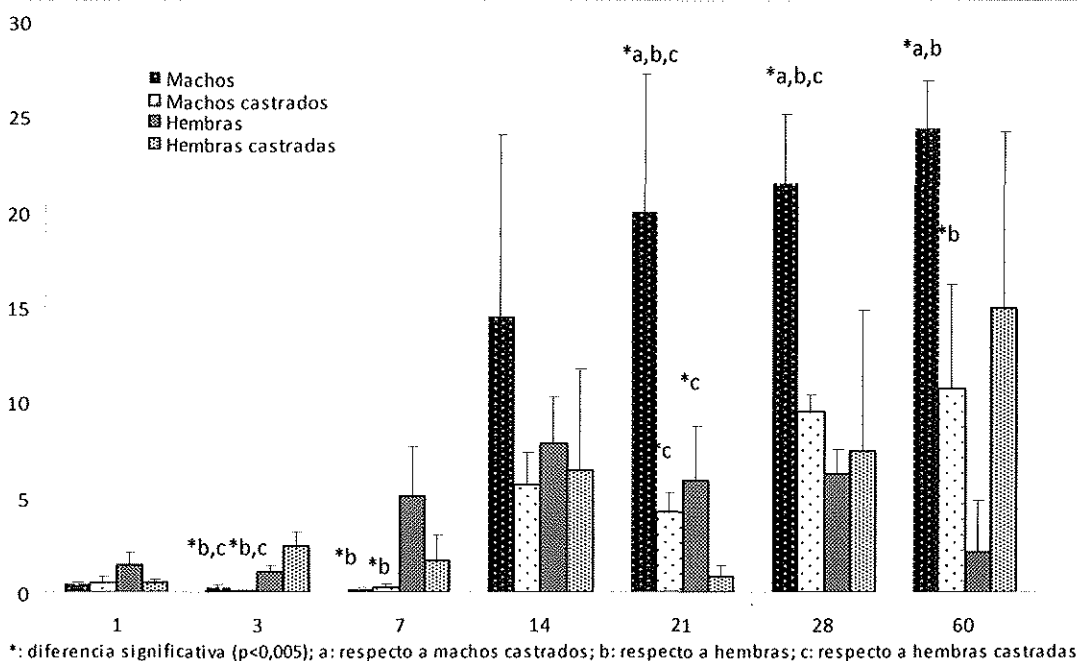
- Machos Sham, son los que recibieron una simulación de castración quirúrgica.
- Machos Castrados, a los que se les extrajeron quirúrgicamente los testículos.
- Hembras Sham, a las que se les practicó simulación de ooforectomía.
- Hembras Castradas, recibieron ooforectomía bilateral.

Se colocó a las hembras en jaulas con aserrín con orina de machos, para sincronizar el ciclo hormonal, y se dejó a todos los ratones recuperarse durante una semana. Entonces se realizó la infección intratraqueal con dosis de 100ul conteniendo 250.000 bacterias vivas de cepa H37Rv. Habitualmente se trabaja con esta dosis en el laboratorio para asegurar que los ratones desarrollen tuberculosis progresiva, que la enfermedad alcance un estadio avanzado en un plazo relativamente corto, (1 mes) y poder evaluar sobrevida en un plazo de aproximadamente 4 meses.

Una vez infectados, se sacrificaron grupos de 6 ratones en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días, por exsanguinación, seccionando la arteria braquial derecha, bajo anestesia. La sangre se colectó para posteriormente separar el suero. En tres ratones por grupo, se separaron los pulmones derechos previamente perfundidos con alcohol etílico para su posterior inclusión en parafina y estudio morfométrico. Los demás pulmones fueron extraídos e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, y de allí almacenados a -70°C, hasta su procesamiento, ya sea para obtención de cDNA para PCR, o para siembra y recuento de colonias. Diez animales por grupo se dejaron para determinar mortalidad espontánea y construir gráficas de supervivencia.

DETERMINACIÓN DE CARGA BACILAR:

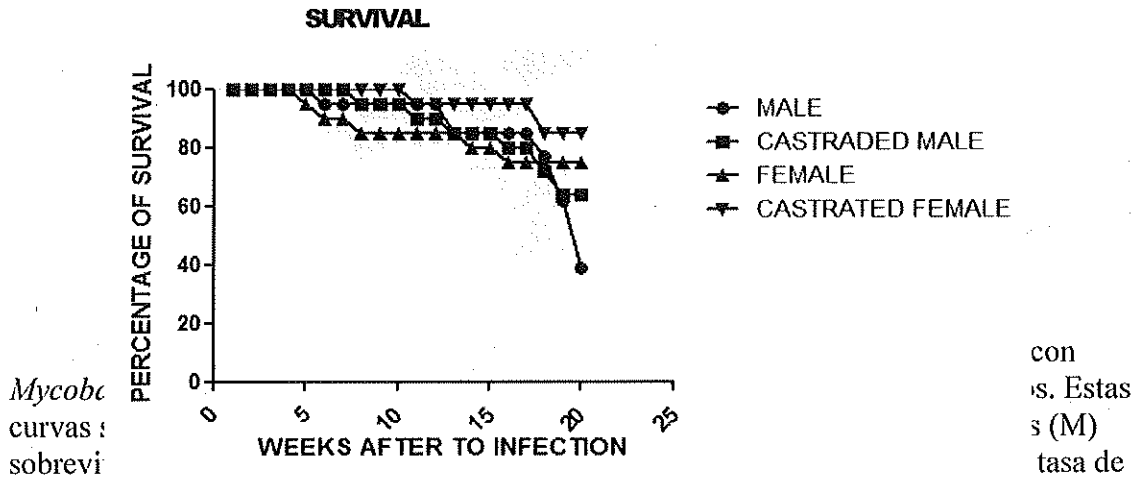
Se homogeneizaron, diluyeron y sembraron según las especificaciones indicadas en el proyecto, cuatro pulmones congelados por grupo, por día establecido. Se realizó un recuento previo a los 14 días y uno definitivo a los 21 días. (El recuento previo se realizó para el caso en que las colonias fueran muy numerosas y se hiciera imposible individualizarlas para contarlas a los 21 días).



Los resultados se expresan en millones de UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Sobre el eje X, como indica el modelo, los **días post infección** en que se realizan los sacrificios para la obtención de las muestras. Se utilizó, para establecer las diferencias significativas, una t de student, comparando de a grupos de dos, con $p > 0,05$. Desde los primeros días (3 y 7) comienzan a observarse diferencias significativas en el número de UFC de machos comparados con machos castrados y hembras. Sin embargo, hacia el día 14 esa tendencia se invierte y los machos registraron mayor número de Unidades Formadoras de Colonias, que se hace significativo en los días 21, 28 y 60.

SOBREVIDA:

Con el fin de evaluar la Mortalidad, que era otro de los objetivos, medimos la Sobrevida, que consiste en calcular el porcentaje de ratones que mueren como consecuencia de la enfermedad.



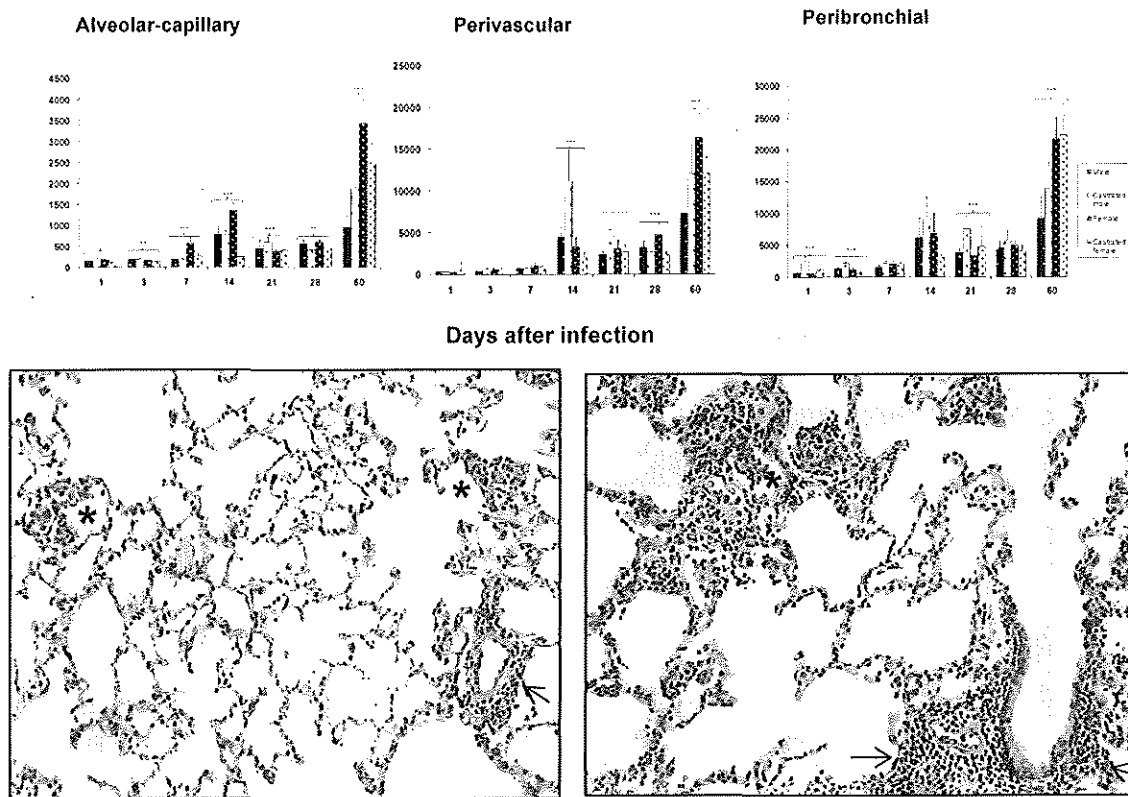
sobrevida del 75%, similar a lo que se observó en las hembras castradas (CF), mientras que el 60% de los machos castrados (CM) permanecían vivos luego de 120 días post infección.

El análisis estadístico se realizó usando Log rank test y arrojó diferencia significativa entre M y F, con $p < 0.005$.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO:

Se realizaron cortes histológicos de los tres pulmones por grupo, por día de sacrificio que habíamos perfundido con alcohol etílico en el momento del sacrificio, y se determinó, por morfometría automatizada, Área de Inflamación Intersticial o Capilar-Alveolar, Perivascular, Peribronquial, tamaño de los Granulomas y porcentaje de área pulmonar afectado por Neumonía.

Se representa en las diferentes áreas la cinética del infiltrado inflamatorio durante el curso de la enfermedad, hasta el día 60. Las mediciones se realizaron en micrones al cuadrado. Los asteriscos indican las diferencias significativas. Para establecer las mismas se empleó una t de student, comparando grupos de a dos, con $p > 0,05$.



En el panel superior, en el **Intersticio Capilar-Alveolar** de las F en los días 7 y 14 se observó un significativo infiltrado inflamatorio de linfocitos y macrófagos. También este grupo mostró la mayor inflamación durante la fase avanzada de la infección, en el día 60, resultando ser 4 veces mayor que la de los M, el doble de los CM, y 30% mayor que CF

En el **Área Perivascular**, los ratones CM mostraron una inflamación dos veces mayor que los otros grupos, mientras que en el día 60 post infección, las F exhibieron el infiltrado inflamatorio más alto, tres veces mayor que los M y 30% mayor que los animales CF.

En el **Área Peribronquial**, durante el primer mes se observó la inflamación más alta en los CM, mientras que hacia el día 60, F y CF mostraron la reacción inflamatoria más alta en esta área, más del doble de lo medido en ratones M. De este modo, y en general, los ratones F mostraron más inflamación en los diferentes compartimentos histológicos pulmonares.

En el panel inferior, las fotografías muestran lesiones histopatológicas representativas de áreas no neumónicas, luego de 60 días de infección. La figura de la izquierda corresponde a un pulmón de ratón macho que exhibe granulomas pequeños (marcado con asterisco), y menor infiltrado inflamatorio en torno a vasos sanguíneos y bronquios (indicados con flechas), que en el pulmón del ratón hembra, en la figura de la derecha. (Hematoxilina/eosina, aumento 400x)

En las gráficas a continuación indicamos, en el panel superior, determinación de Área ocupada por Granulomas y porcentaje de Área pulmonar ocupada por Neumonía en los pulmones de los ratones Balb/c machos y hembras, castrados y no castrados, luego de la

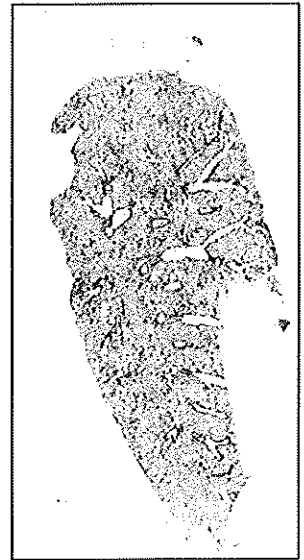
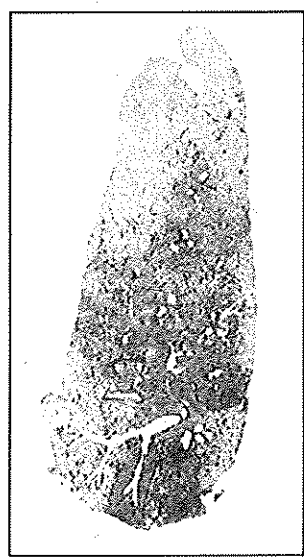
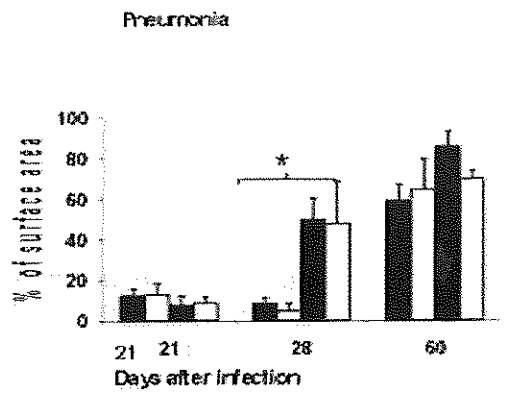
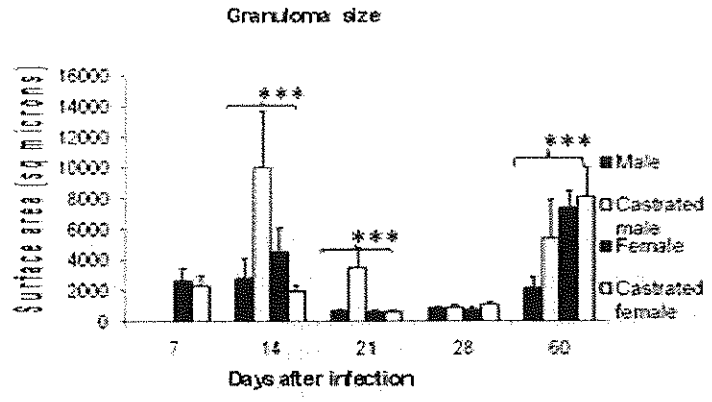
infección por micobacterias. Las mediciones se indican en micrones al cuadrado. Se realizaron en tres pulmones por grupo de ratones, por tiempo, los asteriscos indican las diferencias significativas.

En la determinación de **Área ocupada por Granulomas** fue sorprendente que los pulmones de las hembras (F) mostraron granulomas bien formados desde las dos semanas post infección, mientras que los ratones M recién exhiben esa forma y organización una semana más tarde, resultando ser 4 veces más pequeños que los alcanzados por el grupo de CM, que fue el de mayor tamaño de granulomas en promedio. Hacia el día 21 post infección los ratones CM mostraron los granulomas más grandes, arrojando un promedio tres veces mayor que el de los otros grupos. Por el contrario, hacia el día 60, en la fase avanzada de la enfermedad, se midieron los granulomas de mayor tamaño en F y CF, con valores que resultaron 3 veces mayores que M y 25% mayores que CM.

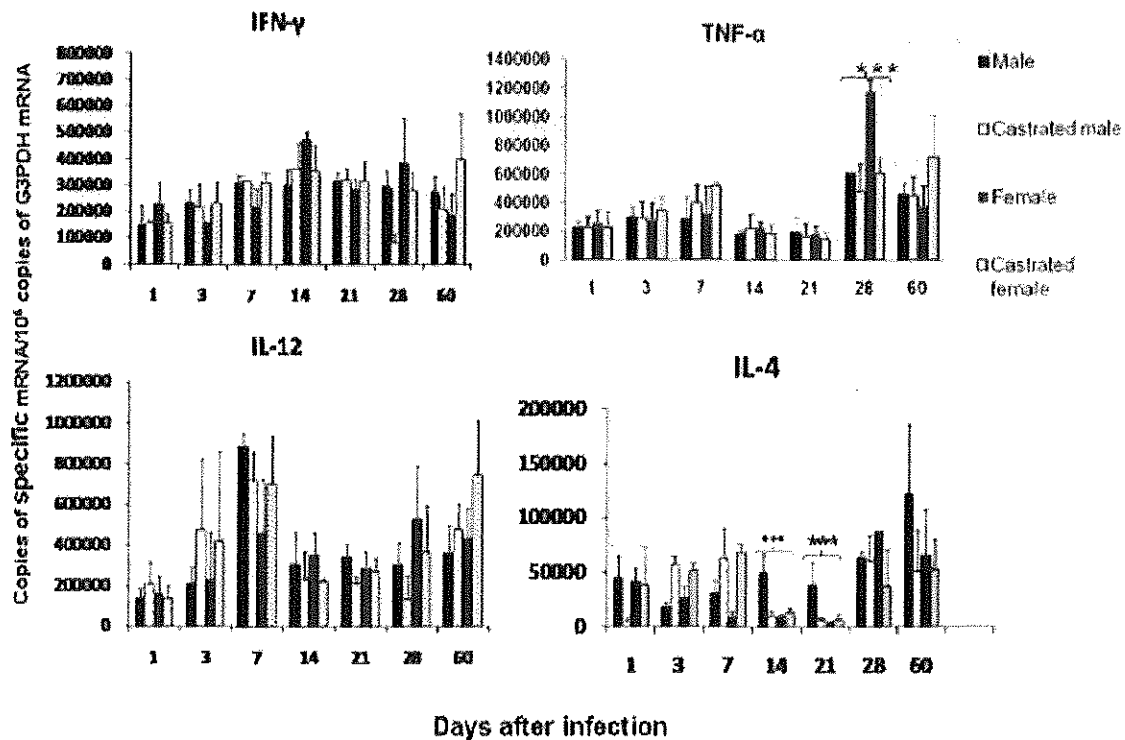
Si analizamos el gráfico de **Área ocupada por Neumonía**, podemos apreciar que luego de 3 semanas post infección, menos de un 10% de la superficie pulmonar estaba afectada por neumonía y esto sucede en todos los grupos. Una semana más tarde, se observó un incremento muy llamativo en la inflamación intra alveolar en los grupos F y CF, que afectaba el 50% de la superficie pulmonar, mientras que los pulmones de los ratones M presentaban un 10% de neumonía. Al día 60 post infección, los ratones F presentaron la mayor superficie afectada por neumonía, un 80%; en los otros grupos se observó una consolidación similar que afectaba el 60% +/- 5 de la superficie pulmonar.

En el panel inferior se muestran campos histológicos a bajo aumento, de un pulmón infectado de ratón hembra sham (figura a la izquierda), y macho (figura a la derecha), a los 28 días post infección.

El pulmón de la hembra presenta áreas más extensas de consolidación inflamación (asterisco) que el ratón macho (Hematoxilina/eosina, aumento 25x).



**CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE CITOCINAS
DETERMINADA POR RT-PCR EN LOS PULMONES INFECTADOS**



La expresión genética de las citocinas IL-4, IL-12, IFN γ y TNF α corresponde a los pulmones de los grupos de ratones Balb-c machos y hembras, castrados y no castrados, infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37 Rv, sacrificados en los diferentes tiempos. Se utilizaron los pulmones de tres animales diferentes para cada tiempo, los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos.

Se destacan la expresión de TNF α , en las hembras en el día 28, y de IL-4 en el grupo de los machos en los días 14, 21 y 60.

DISCUSIÓN

Las diferencias a las que se hace referencia en la literatura acerca de la tasa de hombres y mujeres infectados con TB ha sido atribuida a factores biológicos. Polimorfismos, mutaciones en genes localizados en el cromosoma X pueden conferir mayor susceptibilidad a TB en los machos, así como características especiales del metabolismo y la nutrición relacionadas con el género, o diferencias anatómicas y funcionales en el tracto respiratorio de machos y hembras. Pero tal vez el factor biológico más importante asociado a la diferente susceptibilidad entre machos y hembras está dado por las acciones regulatorias de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune.

Al parecer los andrógenos poseen efectos supresivos sobre la respuesta celular y humoral, por lo que son considerados como hormonas anti inflamatorias naturales, mientras que los estrógenos aumentan la inmunidad humoral y afectan el balance de células T y B, disminuyendo la actividad de la inmunidad mediada por células e induciendo una alta producción de anticuerpos. Estos efectos de los esteroides gonadales pueden influenciar en las diferencias entre géneros favoreciendo la susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas. Esto es muy importante en el caso de la TB, ya que el modo de control del huésped de la infección por micobacteria está siendo asociado a células T y a macrófagos activados, en ambos modelos, humano y murino.

Los esteroides poseen diferentes funciones y aún efectos opuestos dependiendo de sus concentraciones. Esto se hace más evidente en las hembras que exhiben fluctuaciones importantes durante el ciclo menstrual y en estados fisiológicos específicos, como embarazo y menopausia.

En general los estrógenos estimulan la respuesta inmune, en particular la actividad Th-1, pero en situaciones específicas como el embarazo en que el estradiol se encuentra a niveles muy altos, las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y la actividad de células NK se encuentra disminuida; mientras que la producción de mediadores anti-inflamatorios (IL-4, IL-10 y TGF- β) está incrementada. En las mujeres que no se encuentran embarazadas, durante la fase lútea, la concentración de estrógenos y progesterona es elevada, lo que induce un predominio de respuesta Th-2 y alta producción de IL-4.

Los andrógenos poseen un efecto similar, induciendo preferencialmente respuesta Th-2, pero en ellos la variabilidad no depende solo de la concentración, también del estatus hormonal personal, status social y momento estacional. Por otra parte, elevados niveles de testosterona pueden resultar en niveles elevados de cortisol, con la consecuente disminución de la respuesta del sistema inmune, lo que favorece la progresión y reactivación de la TB.

A este respecto, el hecho que los machos con TB moderada o severa presenten niveles disminuidos de testosterona con modesto incremento en las concentraciones de estradiol puede verse como un intento fallido por estimular mecanismos protectivos de inmunidad mediada por células.

Nuestros experimentos realizados en ratones Balb/c mostraron que los machos murieron más tempranamente y el recuento de unidades formadoras de colonias fue significativamente menor que las de las hembras en los primeros días, como si inicialmente controlaran mejor la infección, pero esa tendencia se revierte hacia el día 14, para ser significativa durante toda la fase avanzada, con niveles muy altos de UFC, a diferencia de las hembras que mantienen niveles más parejos y mucho más bajos durante esta fase. Estos resultados concuerdan con los de la morfometría que muestran formación de granulomas más tempranamente, y mayor inflamación en todos los compartimentos celulares, como si

la inflamación, mayor en las hembras, estuviera controlando la infección, menor en los estadios avanzados, lo que sea hace evidente en el bajo recuento de las unidades formadoras de colonias en esta etapa.

Particularmente en el día 28, las hembras mostraron una extensa inflamación alveolar y la máxima expresión de TNF α , lo que coincide con la baja carga bacilar observada en la fase avanzada de la enfermedad en este grupo F hacia el día 60. Este bajo recuento de colonias, sumado a una mayor consolidación de la inflamación pulmonar, implica que las hembras pueden sufrir mayor daño tisular por excesiva inflamación, que los machos.

Interesantemente, el grupo de CM mostró una tasa de supervivencia y recuento de unidades formadoras de colonias semejante a los del grupo de las F. Esto sugiere que la baja resistencia a la TB en ratones M estaría mediada en gran medida por la testosterona.

Se ha observado que la castración de los ratones machos luego de la pubertad incrementó el tamaño del timo y del bazo, con alto número de células CD4 periféricas y CD8. Estas células mostraron además una importante proliferación y una respuesta exagerada transiente luego de ser estimuladas por la exposición a un antígeno. Estas observaciones concuerdan con los resultados expuestos durante los días 14, 21 y durante la fase avanzada luego de dos meses de infección, el área ocupada por granulomas de los CM es tres veces más grande que la ocupada por los granulomas de los ratones M, el porcentaje de área ocupada por neumonía es similar en ambos, pero el recuento de colonias de CM es significativamente más bajo que en M. De este modo, la castración estaría protegiendo a los ratones machos, confiriéndoles mayor supervivencia y un control más eficiente del crecimiento bacilar pulmonar.

En relación con la expresión de IL-4, los ratones CM mostraron dos veces menos expresión que los M hacia el día 60. En los M, en los días 14 y 21 en que la tendencia de una baja carga bacilar se modifica, y pasan a tener alta carga bacilar, con diferencias significativas con respecto a los otros grupos, se observa que esa modificación coincide con la alta expresión, con diferencias significativas, de IL-4. Es decir, que el descontrol de los niveles de la carga bacilar en los M podría deberse en parte a la presencia de IL-4, que es inductora de Th2, e inhibe Th1, que es quien mejor controla esta infección. Se ha observado que cuando se infecta con altas dosis de *M. tuberculosis*, ya sea por vía intratraqueal, como en nuestro modelo, o por vía endovenosa; los niveles de IL-4 se incrementan durante la fase avanzada de la enfermedad y ese incremento tendría un efecto negativo para el huésped, ya que cuando hacen delección del gen de IL-4, o la neutralizan por anticuerpos in vivo, se atenúa la enfermedad.

Algo semejante se ha informado también en pacientes con TB, en países en vías de desarrollo, en general en miembros de familias que viven en condiciones de hacinamiento. En estos casos se observó mayor frecuencia de la enfermedad en hombres, y mayor frecuencia de altos niveles de IL-4 en los pacientes.

Existen otras hormonas sexuales que pueden participar en la alta resistencia a TB que exhiben los CM. La supresión farmacológica de la testosterona induce la presencia de altos niveles circulantes de Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH), prolactina y estrógenos. La Gonadotropina puede estimular la proliferación de linfocitos T y B, y la prolactina promueve la expansión y supervivencia de células T. De este modo, el efecto protector contra TB en CM puede ser mediado en parte por la acción de estas hormonas.

En un modelo realizado en ratones DBA/2 infectados por vía intratraqueal con una baja dosis de *M. avium*, observaron diferencias significativas en la carga bacilar entre hembras sham y castradas. Nosotros no encontramos esas diferencias en términos de mortalidad ni de recuento de colonias entre F y CF infectados con *M. tuberculosis*. Más aún, las CF presentaron mayor expresión de IFN- γ , IL-12 and TNF- α en la fase avanzada de la enfermedad (día 60), que las F. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden ser explicados por la aparición de diversos factores, como el uso de otra línea de animales, y de otro agente infeccioso, con otro nivel de virulencia (la de *M. avium* es menor que la de *M. tuberculosis*), distinta dosis de infección, y diferente constitución antigénica, ya que la cantidad y calidad del estímulo antigénico puede modificar en los macrófagos el número de receptores que expresan, modificando así la respuesta inmune. Además pueden participar otras hormonas sexuales, como la GnRH antes mencionada, que se encuentra elevada en animales gonadectomizados y puede participar en la protección de ratones CF.

CONCLUSIONES:

- 1) Los datos de la sobrevida nos sugieren que los ratones machos son más susceptibles a la TB que las hembras y que los machos castrados.
- 2) Los machos presentan un incremento progresivo en la carga bacilar a lo largo del curso de la infección, mientras que las hembras presentan muy poca fluctuación, solo una leve variación hacia el día 14 y luego alcanza una meseta dentro de la cual se mantienen.
- 3) Los machos presentan menor carga bacilar durante la fase inicial lo que indica mayor control de la infección en esta etapa. Esta tendencia se revierte a partir del día 14, alcanzando una carga bacilar muy alta durante la fase progresiva.
- 4) Las hembras controlan mejor la infección y desarrollan inflamación mucho más importante que los machos.
- 5) Los experimentos de castración en machos sugieren que las gónadas son un factor importante debido a que cuando son extirpadas existe similitud en la cantidad de bacterias presentes en pulmón y en la sobrevida, que las hembras castradas. Esta susceptibilidad prevenida por castración nos hace pensar en que la testosterona es un factor significativo de susceptibilidad, probablemente debido a sus efectos anti- inflamatorios. Estos resultados experimentales explicarían porqué hay mayor número de tuberculosos hombres, y podrían tener implicaciones en el aumento de la respuesta a la inmunoterapia, particularmente en el tratamiento de TB multidrogo resistente, sugiriendo que la manipulación del sistema endócrino puede ser un potencial adyuvante en el tratamiento de esta importante enfermedad infecciosa.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D.F. a 23 de Junio del 2015

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y

EXPERIMENTALES " con registro CINVA: 712

debido a que el protocolo ha concluido.

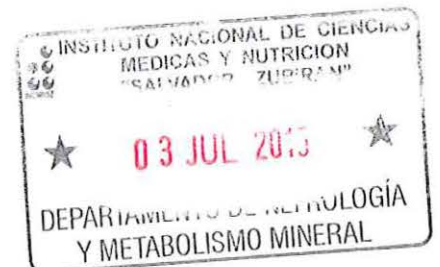
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Nombre y Firma del (a) Investigador (a)

Dr. Rogelio Hernández Pando
Sección de Patología Experimental

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Acuse

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D.F. a 23 de Junio del 2015.

Dr. Rogelio Hernández Pando
Depto. de Patología Experimental
Presente

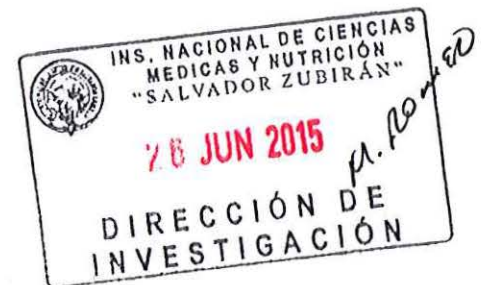
Estimado Dr. Hernández.:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: "INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES", con clave: PAT-712-1214-1, debido a que el periodo de realización y la prórroga correspondiente autorizado por la CINVA ha concluido. Favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

cc.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

Ause
Bruce Marguier
16/Dic/14

México, D. F., a 10 de Diciembre del 2014.

Recibido
Pat
10/12/2014

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
Depto. de Patología Experimental
Presente.

REF.: CINVA 712, Clave: PAT-712-12/14-1

Estimado Dr. Hernández Pando:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

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

Este comité ha dictaminado **aprobar** la prórroga solicitada por seis meses a partir del 1º. de Enero del 2015, pero será necesario comunicarse con el DIEB para informarse sobre el incremento en la producción y posible calendarización de entregas.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

M. Bobadilla Sandoval

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Dra. Ma. Elena Flores, Encargada del Bioterio



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México D. F., a 24 de noviembre del 2014.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

En relación a su oficio con fecha 28 de octubre del año en curso, en el que nos solicita le notifiquemos si el proyecto titulado: "INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLINICOS Y EXPERIMENTALES", con registro CINVA 712, requiere de una prórroga; le solicito de la manera más atenta sea concedida por 6 meses a partir del 1 de enero de 2015, dicha solicitud obedece a nuestra necesidad de continuar con nuestra investigación debido a que los resultados arrojados por este protocolo son publicables y de un alto interés para la comunidad científica.

En diversas reuniones científicas en las que se han presentado resultados previos se ha sugerido que se evalúe la importancia de los esteroides sexuales en la infección por otras bacterias con elevada virulencia, motivo por el cual necesitamos más animales para infectarlos con otros candidatos de micobacterias. Por la importancia del estudio se utilizaran 13 ratones por tiempo de sacrificio para cada bacteria y así asegurar la cantidad de muestras necesarias para las metodologías que se pretenden realizar obteniendo aun una significancia estadística.

Los ensayos a repetirse son en hembras y machos de la cepa BALB/c, a continuación se enlistan las metodologías a realizar:

- ELISA para detección de hormonas
- PCR en tiempo real para transcritos de citocinas
- Carga Bacilar por UFC
- Análisis Morfométrico

Sexo	Cinética de sacrificios	Reto con bacterias	Análisis	No. de animales
Hembras	1,3,7,14,21,28, 60	H37Rv,5186,583	Carga Bacilar, PCR en tiempo real, Histología, ELISA HGnRH FSH, LH	273
Machos	1,3,7,14,21,28, 60	H37Rv,5186,583	Carga Bacilar, PCR en tiempo real, Histología, ELISA Testosterona	273

Solicitamos que se nos otorgue un 10% más a la cantidad solicitada para cubrir perdidas durante el proceso de infección.

Sin más por el momento me despido con cordiales saludos.

Atentamente,

Dr. Rogelio Hernández Pando
Investigador en Ciencia Médicas F
Departamento de Patología
Sección de Patología Experimental

Recibí
Mf. 3/12/14



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ause

"2014, Año de Octavio Paz"

México, D.F. a 28 de Octubre del 2014



Dr. Rogelio Hernández Pando
Depto. de Patología Experimental
Presente

Estimado Dr. Hernández:

Por este conducto le informo que su proyecto: "INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES.", con registro CINVA 712 finalizó en el mes de agosto del año en curso. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente.

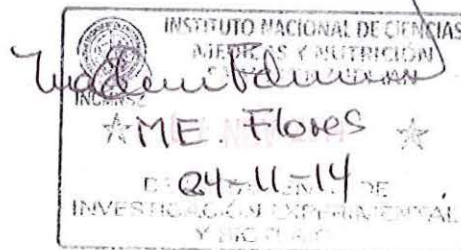
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

[Handwritten Signature]
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
c.c.p. Dra. María Elena Flores Carrasco, Encargada del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio.





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

21 SEP 2012

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

Agosto 20, 2012

Dr. Rogelio Hernández Pando
Investigador Responsable del Proyecto
Departamento de Patología
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: "Inmunidad y Esteroides Sexuales en la Tuberculosis. Estudios Clínicos y Experimentales".

Registro CINVA: 712

Clave: PAT-712-12/14-1

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA), decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente

MVZ., M. Sc, Cert.L.A.M. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales



- ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ., M. en C. Octavio Villanueva Sánchez .Secretario de la Comisión de Investigación en Animales
- Dra. Nimbe Torres y Torres.- Comisión de Investigación en Animales

Investigación

Tradición

Servicio

Asistencia

Docencia

20007700



Eréndira Angeles

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

Folio del registro: PAT-712-12/14-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

Título del proyecto: INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES

Tipo de proyecto: Investigación Experimental

Antecedentes: Interrelaciones inmuno-endócrinas La demostración que las células integrantes de los sistemas inmune, endócrino y nervioso comparten receptores para citocinas, hormonas y neuropeptidos, proveyó una base molecular para entender las influencias de los mediadores producidos por respuestas generadas en alguno de estos sistemas sobre la actividad de los restantes [1]. El Hipotálamo es el responsable de coordinar el sistema endócrino, puesto que recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo a la vez que interpreta estímulos ambientales como temperatura e iluminación, y promueve importantes acciones regulatorias en periferia. En respuesta a variados estímulos y mediante la liberación de hormonas peptídicas, la dupla hipotálamo-hipófisis regula la actividad de componentes claves del sistema endócrino como la tiroides, suprarrenales y gónadas. Nuestro análisis se concentrará en dos sistemas el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG). Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal Las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH ó LHRH), secretadas por el hipotálamo, estimulan la producción y liberación las gonadotropinas Foliculoestimulante (FSH) y Luteoestimulante (LH) a nivel hipofisario. Tales factores liberadores modulan la respuesta inmune [2, 3]. Está demostrada la presencia de sitios de unión específicos para GnRH en células T periféricas humanas (CD4+, CD8+) [4, 5], y de transcritos de mRNA de GnRh y su receptor (GnRH-R) en linfocitos periféricos [6]. La expresión del receptor de GnRH parece estar regulada por la GnRH nativa, lo que sugiere una función autócrina de esta hormona en las células inmunes. También se constató un efecto de GnRH sobre el desarrollo del sistema inmune, a través de una acción directa sobre la maduración del timo y el desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular. [7]. La GnRH tendría un rol exacerbador de desórdenes autoinmunes. Los estudios de Jacobson y col [8] en ratones de ambos sexos proclives al Lupus Sistémico Eritematoso (LES), castrados o no, indican que la administración de antagonistas de GnRH produce una reducción de los anticuerpos anti-DNA, y niveles séricos de IgG, y una disminución en la severidad de la enfermedad renal y aumento de la supervivencia. En cuanto a las hormonas FSH y LH las mismas son glucoproteínas producidas en respuesta a la acción de la GnRH hipotalámica para actuar sobre las gónadas como reguladoras de los ciclos sexuales. La LH actúa sobre el folículo ya maduro generando una serie de eventos que desembocan en la ovulación. Es la responsable de la ovulación, la maduración del oocito y la luteinización del folículo. Bioquímicamente, la LH produce en primer lugar aumento de pregnenolona y secundariamente de testosterona y estradiol, vía de la progesterona. La LH estimula la producción de esteroides gonadales como el estradiol, progesterona y testosterona, a partir del colesterol. Los andrógenos y estrógenos rigen las diferencias entre sexos. Todos los estrógenos se sintetizan a partir de andrógenos, comenzando por colesterol o acetato. Los andrógenos como el androstenediol y testosterona se sintetizan en ovarios y testículos, y son parcialmente convertidos a estrógenos de tipo estrona y estradiol

Ambos sexos producen las mismas hormonas esteroides y las diferencias fisiológicas entre los mismos son cuantitativas, en función de la cantidad de andrógeno producido y del porcentaje que termina convirtiéndose en estrógeno [9]. La respuesta celular a una hormona requiere la interacción con un receptor presente en la membrana o bien en su interior [10]. Los receptores de hormonas sexuales son mayoritariamente nucleares, aunque también se encuentran en citoplasma, donde son difíciles de visualizar. Se supone que todos ellos se hallan en equilibrio dinámico entre ambos compartimentos, facilitado por su escasa avidez a unirse a estructuras celulares en ausencia de hormona. Los receptores estrogénicos poseen un dominio de unión a la hormona con distintas funciones: una parte de la molécula le confiere función de factor activador de la transcripción; otra región participa en la dimerización del receptor, indispensable para el reconocimiento de genes dependientes de la hormona; y una región de interacción con otras proteínas, como la hsp90 y p59. Cuando la hormona se une al dominio correspondiente del receptor, el receptor cambia su conformación pierde su afinidad por la hsp90, se libera de ella, y puede así dimerizar para favorecer la transcripción génica [11]. Los estrógenos señalizan a través de dos receptores, ER α y ER β [12]. Es muy importante considerar que la preponderancia de uno de los subtipos de receptores sobre el otro puede producir cambios en los efectos estrogénicos [13]. Tanto el ER α como el ER β se expresan en órganos linfoides y en progenitores hematopoyéticos en la médula ósea [14-16]. Además el ER α , y en algunos casos el ER β se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) y monocitos [17-22]. Para la progesterona se han descrito receptores citosólicos (PRs), pertenecientes a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares [22], y receptores asociados a membrana (mPRs) [23]. Se conocen tres isoformas de PRs: PR-A, PR-B y PR-C [24-26] con patrones de expresión específicos del tejido, que pueden ser modificados tras la exposición hormonal [27-29]. En ratones predominan las formas PR-A y PR-B [30,31]. En el hombre, los receptores para andrógenos pertenecen a una superfamilia de receptores esteroides, vitamina D, rodopsina y otros ligandos. Poseen la capacidad de unirse a regiones específicas del DNA y favorecer la transcripción de los genes codificados en ellas actuando como factores de transcripción toda vez que se unen a su ligando [31]. Además de esta actividad genómica el complejo hormona receptor tiene una actividad no genómica reflejada en la capacidad de inducir la activación de cascadas enzimáticas (como las MAPK, PKA y PKC) en el citoplasma [32-34]. El AR está codificado por un único gen y presenta dos isoformas (A y B), que podrían desempeñar diferentes roles en la regulación de la transcripción génica [35].

Efectos de los esteroides sexuales sobre componentes del sistema inmune Las hembras poseen un sistema inmune con diferente capacidad de respuesta respecto de los machos. Los niveles séricos de anticuerpos son más altos [36] y sus respuestas tras la inmunización [37-39] son más robustas, con una mejor respuesta humoral. Las hembras también rechazan los aloinjertos de piel más rápidamente, indicador de una mayor inmunidad celular [40, 41]. Estas diferencias de género, verificadas tanto en humanos como en modelos animales, serían las responsables de la mayor susceptibilidad de las hembras al desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoidea (AR), LES y Encefalomielitís Autoinmune Experimental. En los machos la testosterona parece ejercer un efecto protector que disminuiría su susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes [42]. El dimorfismo sexual en cuanto a la respuesta inmune podría estar relacionado con acciones de los esteroides sexuales sobre la producción de citocinas. Comparando los perfiles de citocinas secretadas por CPA de machos y hembras se observa que las CPA de machos secretan mayores niveles de IL-10 mientras que las CPA de las hembras producen niveles superiores de IL-12 [43]. Esto favorecería una mayor respuesta de tipo Th2 en machos [44-46]. Ello está avalado por diferencias en cuanto a la presencia de receptores específicos para estas hormonas en distintos tipos de células inmunocompetentes. Los estudios sobre los efectos de la testosterona en ratones indican que la castración aumenta la susceptibilidad al shock endotóxico acompañada de una mayor expresión de TLR4 sobre la superficie celular de sus macrófagos, por lo que la testosterona reduciría la expresión de TLR4 en estas células [47]. Los mismos autores demostraron además que estrógenos como el 17- β estradiol aumentan la expresión de TLR4 y de CD14 en macrófagos y regulan la susceptibilidad a la sepsis experimental. Al privar del estrógeno endógeno la producción de citocinas pro y antiinflamatorias decrecía, a la par de una reducción de TLR4 en dichas células. Se desprende que mientras los andrógenos suprimen la respuesta ante el desafío con una endotoxina bacteriana, los estrógenos promueven un aumento de tal reactividad [48]. Tomados en su conjunto, los andrógenos parecen ejercer efectos supresores en la respuesta inmune celular y humoral, y se comportan como hormonas anti-inflamatorias naturales. [49]. Por su parte, los estrógenos producen un incremento en los mediadores de la respuesta humoral y afectan el balance entre células T y B, ya que descienden la actividad de las primeras mientras que favorecen una hiperactividad de las segundas [50]. Por su parte, la progesterona, hormona clave para el mantenimiento del embarazo, interviene en la supresión de la inmunidad materna contra el feto debido a su importante acción antiinflamatoria, como así también al inhibir el desarrollo de respuestas Th1 y favorecer la actividad Th2 [51, 52]. Durante la fase lútea del ciclo menstrual de las mujeres, en que las concentraciones de progesterona y estradiol se encuentran elevadas se produce un aumento en la síntesis de IL-4 la cual influye para que predomine la respuesta Th2 [53]. Los

andrógenos también tienen efecto en la secreción de citocinas, pero su influencia sobre las mismas puede depender no solo de la concentración del esteroide, sino también del estatus hormonal del individuo, del rango social, o del momento estacional [53]. Los esteroides sexuales también influyen sobre la respuesta inmune anti-infecciosa. La primera demostración que los esteroides sexuales influían directamente sobre la respuesta inmune surgió del trabajo de Henry y Beverly quienes observaron diferencias en dicha respuesta en machos y hembras infectados con *Toxoplasma gondii* [54]. Esto fue corroborado por otros estudios donde se constató que la exacerbación de la enfermedad por parte de los estrógenos, resultaba contrarestanda por la gonadectomía lo cual implicaba un buen grado de resistencia [55, 56]. En estudios más recientes y en consonancia con los hallazgos señalados, pudo comprobarse que la mayor resistencia de los machos al protozoo coincide con una producción más rápida y elevada de IL-12 e IFN γ respecto de las hembras [57]. Entre las explicaciones sobre la mayor susceptibilidad de las hembras a la infección por *T. gondii* se sugiere una inhibición de los estrógenos sobre el promotor de IFN- γ [58], como así también los efectos inhibitorios de estrógenos y progesterona sobre los macrófagos y la producción de óxido nítrico [59].

Tuberculosis La Tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha venido afligiendo a la humanidad desde tiempos remotos. Aproximadamente se presentan 8.8 millones de nuevos casos por año mientras que 1.6 millones de personas fallecen a causa de la misma durante el mismo periodo. La enfermedad esta ocasionada por un agente de vida intracelular, el *Mycobacterium tuberculosis*, el cual afecta esencialmente al pulmón donde puede producir desde algunas pocas lesiones mínimas hasta un cuadro de intensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Dicho espectro de afectación orgánica parece estar relacionado con la respuesta inmune celular hacia la micobacteria, habida cuenta que puede mediar tanto protección como patología. Los elementos esenciales que participan de esta respuesta comprenden a los macrófagos y a las células T. Los primeros fagocitan a la micobacteria, promoviendo la producción de diferentes citocinas y la presentación de antígenos a células CD4+, las que a su vez sintetizan mediadores tipo Th1, como el IFN- γ y la IL-2, capaces de potenciar la acción bacteriostática-bactericida de los macrófagos y promover la proliferación de los linfocitos respondedores, respectivamente. Como fuera señalado más arriba las células T también pueden diferenciarse hacia el tipo Th2 para sintetizar citocinas estimuladoras de la inmunidad humoral como la IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Estudios en pacientes con Tuberculosis pulmonar (TB) de distintas geografías concuerdan en observar alteraciones en la producción de citocinas Th1 y Th2 con un predominio de las primeras en las formas leves, no así en los casos avanzados donde prevalece la síntesis de citocinas Th2. Los factores por lo cuales se produce esta alteración involucran no sólo a mediadores inmunológicos sino también a componentes del sistema neuroendócrino dado su estrecha interconexión. Es sabido que las citocinas inflamatorias estimulan el eje HHA con la consecuente secreción de cortisol y DHEA. Ambas hormonas pueden afectar, a su vez el desarrollo de la respuesta inmune. Así, los glucocorticoides facilitan la actividad Th2 en parte a través de una inhibición de las células Th1, mientras que la DHEA y la DHEAs contrarrestan los efectos de los GC favoreciendo respuestas Th1. Un trabajo reciente sobre la relación entre los niveles de cortisol y DHEA en pacientes tuberculosos varones con distinto grado de lesión pulmonar puso de manifiesto que todos ellos presentaban un aumento en los valores de cortisol, no así la DHEA cuyas concentraciones se ubicaron muy por debajo de los controles, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos [60]. Estudios simultáneos apuntan asimismo que este desequilibrio entre ambos esteroides pueden favorecer un desbalance Th1/Th2 lo cual tendría una repercusión desfavorable para la TB puesto que el control de la replicación del patógeno depende fundamentalmente de una respuesta Th1 apropiada. Del Rey et al también reportaron una disminución en los niveles de testosterona en presencia de mayores concentraciones de estradiol lo que en su conjunto podría favorecer la persistencia de las reacciones inflamatorias como así también el corrimiento hacia el perfil Th2 en la enfermedad progresiva, habida cuenta de las acciones de ambas hormonas sobre estas respuestas. Muy pocos estudios han tenido en cuenta la participación de los esteroides sexuales en la resistencia/susceptibilidad a la TB tanto en humanos como modelos experimentales. Un par de trabajos señalan que los ratones hembras son más resistentes a la infección con micobacterias no tuberculosa, y que el tratamiento con testosterona eleva la susceptibilidad a la infección con *Mycobacterium marinum* [61, 62]. En función de todo lo expuesto resulta de sumo interés analizar la influencia de las hormonas sexuales en la enfermedad tuberculosa. Para una aproximación más mecanística el estudio de centrará inicialmente en un modelo muy bien caracterizado de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* cepa H37Rv. En un paso posterior se abordará el estudio de los perfiles para hormonas sexuales en pacientes con TB pulmonar.

Definición del problema:

Estudios epidemiológicos diversos han mostrado una mayor frecuencia de TB en hombres que en mujeres, lo cual inicialmente fue atribuido a situaciones sociales, laborales o de asistencia a consulta médica, sin embargo en estudios recientes con pacientes la contribución de estos factores se ha descartado y actualmente se considera que ser de género masculino es un factor de riesgo para padecer TB. Es interesante que esto no se haya constatado en modelos experimentales

Justificación: Debido a su importancia fisiopatológica, es importante confirmar en modelos experimentales murinos que la TB es influenciada por hormonas sexuales y que esta es la base de las diferencias en frecuencia y capacidad de control entre mujeres y hombres

Hipótesis: La TB es más grave en términos de su evolución (más rápida y mortal), carga bacteriana pulmonar y extensión de daño tisular en el género masculino que en el femenino y esto se debe a la acción promotora de la respuesta inmunológica que tienen los estrógenos y a la actividad anti-inflamatoria de la testosterona

Fecha estimada de inicio: 03/09/2012

Fecha estimada de término: 29/08/2014

Comisión a la que somete @

¿Incluye documentos anexos?: Si

Investigadores participantes

(0) Comentarios

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Hernandez Pando, Rogelio	Investigador responsable	1	Si

Población vulnerable

(0) Comentarios

Población vulnerable vinculado al protocolo @

Otra población:: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Objetivos

(0) Comentarios

Objetivo: Objetivos específicos: En el modelo experimental (ESTA PARTE SE REALIZARÁ EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION) 1.-Establecer las diferencias en el curso de la enfermedad (mortalidad, carga bacilar pulmonar, extensión de daño histológico, expresión de citocinas de tipo Th-1 y Th-2) entre ratones machos y hembras de la cepa Balb/c infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de M. tuberculosis vivo y virulento cepa H37Rv. 2.-Comparar la evolución de la enfermedad entre ratones machos y hembras castrados y no castrados. 3.-Cuantificar las concentración de testosterona en el suero de ratones machos infectados a lo largo de la enfermedad. Estudios en pacientes (ESTA PARTE SE

REALIZARÁ EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA) 1.- En pacientes con TB pulmonar de distinta severidad. HIV negativos y que aún no han iniciado tratamiento antibacilar. 2.- Investigar en qué medida las variaciones en los niveles circulantes de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona y citocinas (IFN-GAMMA, TNF- α e IL-6) se correlacionan entre sí y con la severidad de la enfermedad. 3.-Determinar si existen diferencias por sexo en cuanto a la presentación clínica de la enfermedad.

Tipo de objetivo:

General

Metodología: Diseño general

(0) Comentarios

Metodología gral:

Estudios experimentales en ratones: Ciento diez ratones machos y el mismo número de ratones hembras de la cepa Balb/c con 8 semanas de edad serán divididos en 4 grupos. Al primer grupo de ratones machos simulados, se les practicará una incisión quirúrgica abdominal simulando la resección de los testículos, el segundo grupo corresponde al de machos castrados a los cuales se le extirparán quirúrgicamente los testículos, el tercer grupo será el de hembras simuladas y el cuarto grupo corresponde al de hembras con ooforectomía bilateral. A todas las jaulas de hembras se les colocará aserrín con orina de macho por tres días para sincronizar su ciclo hormonal. Después de una semana de recuperación de la cirugía, a todos los animales se les anestesiará con vapores de sevoflurano y en una campana de seguridad biológica nivel 3 se les infectará a través de una cánula intratraqueal de acero inoxidable, depositando 250,000 bacterias vivas de la cepa H37Rv suspendidas en 100 microlitros de PBS. Los animales infectados se confinarán en grupos de 10 por caja en un sistema de microaisladores conectados a un sistema de presión negativa y aire filtrado constante [98]. Las bacterias se crecen en medio líquido 7H9 hasta llegar a la fase logarítmica en las que se colectan y preparan para ser contadas y confirmada su viabilidad por citometría de flujo. Grupos de 6 ratones en cada uno de los grupos se sacrificarán en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días, el sacrificio se realiza bajo anestesia por exsanguinación, la sangre se colecta para posteriormente separar el suero, el tórax se abre inmediatamente para exponer los pulmones, el pulmón derecho o izquierdo de 4 animales se perfunde con alcohol etílico absoluto para posteriormente incluirlo en parafina y obtener cortes histológicos, los demás pulmones se extraen y congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Diez animales por grupo se dejan para determinar mortalidad espontánea y construir gráficas de supervivencia. Se realizarán dos experimentos completos independientes. Estudio morfométrico: En los cortes histológicos de cada pulmón y ratón sacrificado se determinará por morfometría automatizada utilizando el equipo Leica QWin 500, el área de inflamación intersticial, perivascular y peribronquial, así como el tamaño de los granulomas y el porcentaje de área pulmonar afectado por neumonía. Determinación de carga bacilar: En 4 pulmones congelados por grupo se determinará la carga bacilar después de homogenizarlos con un politrón en tubos falcon estériles que contienen 1ml de PBS/ Tween80 al 0.05%, cinco diluciones de cada homogenizado se siembran por duplicado en cajas de petri que tienen el medio BactoMiddlebrook 7H10 agar enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa. Las cajas se incuban a 37°C con 5% de CO₂. El número de unidades formadoras de colonias se cuenta después de 21 días. Medición de la expresión genética de citocinas por RT-PCR en tiempo real: De los 4 pulmones restantes por cada tiempo de sacrificio y de cada grupo experimental se purificará el RNA total usando el mini-kit RNeasy de Qiagen. Cada pulmón se sumerge en 2ml de medio RPMI-1640 con 0.5mg/ml de colagenasa tipo 2 y se incuba por 1hr a 37°C. Posteriormente el tejido se pasa a través de una malla de 70 micras, empujando el tejido con un pistilo y lavando con el medio. Las células así obtenidas se centrifugan, el sobrenadante se elimina y los glóbulos rojos se eliminan con un buffer de lisis. Después de contar las células, se adicionan 350 microlitros del buffer de lisis tisular por cada 50 millones de células y el RNA se purifica usando el mini-kit RNeasy de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad del RNA se evalúa por espectrofotometría (260/289nm) y en geles de agarosa. La transcripción reversa del RNA se llevará a cabo con 5 microgramos de RNA, oligo-dT y el kit Omniscript de Qiagen. El PCR en tiempo real se realizará utilizando el equipo 7500 real-time PCR de Applied Biosystems y el kit SYBR-Green. Se construirán curvas estándar del producto de PCR cuantificado y en diferentes diluciones, así como del control negativo. Los iniciadores (primers) específicos para cada citocina se diseñan con el programa Primer-Express, las secuencias son las siguientes: : gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH): 5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3', 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'; óxido nítrico sintetasa inducible 5'-AGCGAGAGCAGGTGGAAG-3', 5'-CATTTCCGTCTCTCCCAA-3'; factor de necrosis tisular alfa 5'-

TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3', 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'; interferon gama: 5'-GGTGACATGAAAATCC^TG^CAG-3', 5'-CCTCAA^AACTGGCA^ATACTCATGA-3'; interleucina 4: 5'-CGTCC^TCACAGCAACGGAGA-3', 5'-GCAGCTTATCGATGAATCCAGG-3'. Las condiciones del PCR son: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. Las cantidades específicas del RNA mensajero en cada muestra se determinarán de acuerdo a la curva estándar del gen específico correspondiente. El número de copias de RNAm de cada citocina se expresa en relación a un millón de copias del gen constitutivo G3PDH. Todo el trabajo experimental es realizado en conformidad con el comité local de ética en experimentación con animales, el cual se fundamenta en el artículo de la constitución mexicana NOM062-ZOO-1999 sobre reglas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El proyecto ha sido revisado y aprobado por el comité de investigación de animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" con la clave PAT-19-10-12-1. Lugar de Trabajo del Modelo Experimental: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", DF, México. Estudios en pacientes (esta parte se realizara en la Universidad de Rosario Argentina) Grupos de estudio Enfermos. La muestra de pacientes será seleccionada entre enfermos adultos (18 a 60 años). Todos serán pacientes con serología negativa para HIV, y el diagnóstico de TB se realizará sobre la base de criterios clínicos y radiológicos sumado a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en los fluidos biológicos. Todas las muestras se obtendrán antes de la iniciación del tratamiento específico. En todos los pacientes con TB se tendrá en cuenta el grado de compromiso, el cual será clasificado según la extensión y tipo de lesión radiológica en: leve, pacientes con un único lóbulo involucrado sin cavidades visibles; moderado, pacientes con compromiso unilateral de 2 o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, que no excedan un diámetro total de 4 cm; avanzada o severa, enfermedad bilateral con afectación masiva y cavidades múltiples. Con el propósito de analizar potenciales factores de confusión sobre las variables de impacto se tomarán en cuenta datos en relación a edad y sexo como así también a los valores sanguíneos de glucosa, uremia, proteínas totales, antecedentes de alcoholismo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica vinculada al tabaquismo. Todos los pacientes deberán hallarse libres de compromiso directo de la glándula suprarrenal por el bacilo tuberculoso (la Enfermedad de Addison es muy poco frecuente en nuestro medio). La ficha clínica también recogerá información acerca de otras variables vinculadas a la TB como eritrosedimentación, síndrome de impregnación bacilar, frecuencia cardíaca y respiratoria. También se conformará un cuestionario para conocer el estado menstrual de las pacientes (o presencia de menopausia), ingesta de anti-conceptivos. Controles. Este grupo se compondrá de voluntarios sanos similares en sexo y edad, que no registren contactos con pacientes TB, enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos. En buena parte de los casos las muestras de sangre se obtienen de personal de laboratorio. La incorporación de las personas se efectuará una vez que hayan otorgado su libre consentimiento a participar. Todos ellos serán previamente informados de los objetivos del estudio, el cual se ajustará a las normas éticas nacionales e internacionales que regulan la investigación en seres humanos. La identidad de los participantes no será revelada. Cuantificación de citocinas: Los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6 se determinarán en el plasma por enzimoimmunoensayos comerciales (ELISA, R&D o Pharmingen). Cuantificación de hormonas: Las concentraciones en plasma de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona se determinarán por enzimoimmunoensayos de competición comerciales (ELISA, DRG Systems, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Análisis estadísticos: El análisis estadístico se efectuará por medio del programa Stata Statistics Package. Se utilizará el método de Kolmogorov-Smirnov para analizar si las variables se distribuyen normalmente, en caso de no hacerlo se aplicarán las transformaciones necesarias. Las variables categóricas se analizarán por las pruebas de χ^2 o probabilidad exacta de Fisher, mientras que se aplicara el análisis de la variancia o la t de Student para las mediciones cuantitativas. Asimismo se empleará el modelo lineal generalizado a efectos de determinar si los factores concurrentes ligados a la condición clínica de los enfermos influyen sobre los diversos parámetros de interés. Dado las variaciones de las hormonas sexuales (LH, FSH, estradiol y progesterona) en función de la presencia o ausencia de menopausia, se pondrá un especial énfasis al análisis por separado de la población femenina en función de este factor. Los estudios de asociación entre los niveles circulantes de hormonas, citocinas y variables clínicas se efectuarán por medio de análisis multivariado. Se utilizará el método de Kaplan y Meier para comparar las curvas de supervivencia en los diferentes grupos de ratones y la prueba de los rangos logarítmicos. Se calcularán los coeficientes de correlación parciales. El significado estadístico será $P < 0.05$.

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

Beneficio: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Tipo de beneficio:

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Manejo de confidencialidad

(0) Comentarios

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto

(0) Comentarios

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Riesgo (s) del estudio

(0) Comentarios

Molestias generadas por el estudio:	NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.
Complicaciones del procedimiento:	NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.
Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas:	NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.
Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos:	NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.
Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten:	NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.
Otro tipo de riesgo:	

Consentimiento informado

(0) Comentarios

Hoja de informe al paciente: [CONSENTIMIENTO INFORMADO.pdf](#)

Carta de consentimiento informado: [CONSENTIMIENTO INFORMADO.pdf](#)

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de investigadores: [DECLARACION DE LOS INVESTIGADORES.pdf](#)



United Nations
University

UNU-BIOLAC

Biotechnology for Latin America and the Caribbean
Biotechnology for Latin America and the Caribbean

Caracas, 17 de enero de 2012.

Estela Bini
Presente.-

Estimada Becaria Bini,

Recibido en el instituto anfitrión

Reciba saludos cordiales de nuestra parte.

Hemos revisado y evaluado su postulación en el sistema de becas de UNU-BIOLAC.

La comisión de evaluadores ha dado el veredicto, su postulación para el proyecto de investigación sobre: *Estudio sobre las diferencias entre el género femenino y masculino para desarrollar tuberculosis*, a realizarse del 1 de marzo al 1 de julio de 2012, ha sido aprobada.

No está en el sistema de becas

El financiamiento para su beca contempla los siguientes rubros:

- ✓ Boleto aéreo por la ruta más corta y económica.
- ✓ Seguro de vida y accidentes.
- ✓ Estipendio mensual de USD 1.000 para:
 - Alojamiento y alimentación
 - Transporte local y gastos incidentales.
- ✓ Estipendio mensual de USD 500 para gastos de materiales y laboratorio en caso de que el mentor lo solicite (también llamado Bench Fee).

Verificar en el sistema de becas

RECIBIDO

Una vez culminada su estadía en el instituto anfitrión, usted deberá presentar un informe final que contenga:

- ✓ Proyecto de investigación desarrollado
- ✓ Objetivos alcanzados
- ✓ Conclusiones
- ✓ Cualquier otra información que considere pertinente incluir

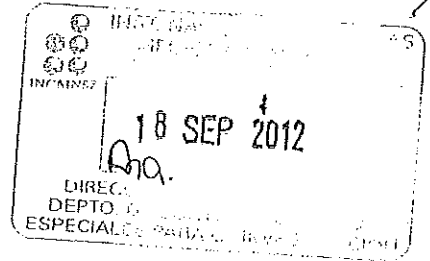
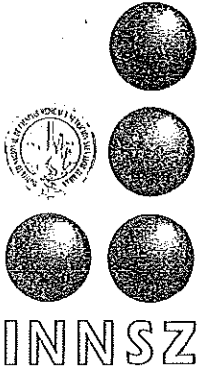
Dicho informe deberá estar avalado y firmado por su mentor o instructor en el instituto anfitrión y por su supervisor directo en su país de origen. Cada firma deberá estar acompañada de sello o cuño de cada institución.

Sin más a que hacer referencia quedamos a sus órdenes.

Atentamente,

Dr. José Luis Ramírez
Coordinador





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México D. F., a 17 de septiembre del 2012.

C. P. Martha Arredondo Urzua
Jefe del Depto. de C.F.E.I.
Presente.

Por medio de la presente informo a UD. que fue depositado a la cuenta No. 0129031085 la cantidad de ----- \$14,364.60---- (CATORCE MIL TRESCIENTOS SESENTA Y CUATRO PESOS 64/100 M. N), ----- por La Universidad de Naciones Unidas, por el concepto de Beca para la Dra. Estela Isabel Bini de nacionalidad Argentina, por lo que solicito sea transferido al proyecto. PAT-712-12/14-1 y se elabore el recibo correspondiente.

Sin más por el momento me despido enviándole un cordial saludo.

Atentamente

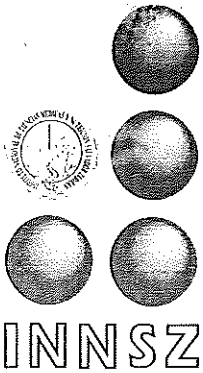
Dr. Rogelio Hernández Pando
Investigador Responsable de Proyecto.

RHP/ear *

Investigación
Tradición Servicio
Asistencia Docencia

ONAR SE LLEVO EL ORIGINAL
DE ESTA CARTA Y
COPIA DE LOS DOCTS. DE
BECAS

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



18 OCT 2012

Doc.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México D. F. a 26 de septiembre de 2012.

Dr. David Kersenobich Stalnikowitz
Director General
Presente

Estimado Dr. Kersenobich:

Por medio de la presente me permito solicitarle de la manera más atenta su aceptación para exentar del pago de gastos administrativos de estipendio personal y apoyo para compra de reactivos, de la beca recientemente otorgada por la Universidad de las Naciones Unidas a la Lic. en Biología Estela Isabel Bini., los cuales fueron depositados al proyecto titulado: Inmunidad y Esteroides Sexuales en la Tuberculosis. Estudios Clínicos y Experimentales, con número: PAT-712-12/14.1

La Lic. Bini es de nacionalidad Argentina y actualmente está realizando sus tesis Doctoral en la Universidad de Rosario de su país natal, el tema de su tesis es sobre la influencia del género en la inmunopatología de la tuberculosis, la parte del estudio en pacientes lo está realizando en su país y los estudios experimentales los está realizando bajo mi supervisión, de hecho yo fungo como co-tutor de su tesis. La Lic. Bini no tiene apoyo económico por parte de su país, fue por esto que se tramitó una beca por parte de la Universidad de las Naciones Unidas, la cual fue recientemente aprobada para visitar periódicamente nuestro laboratorio apoyándola con un estipendio mensual de 1000 USD y de reactivos por 500 USD por 4 meses. Por el corto apoyo otorgado y debido a que no es mexicana me permito solicitar su aprobación para que quede exenta del pago de gastos administrativos. Cabe mencionar que el Dr. Rubén Lisker ha revisado el caso y dio su aprobación.

Como usted sabe, nuestro grupo de trabajo tiene una importante actividad colaborativa con diversos grupos extranjeros y este tipo de interacción nos permite ser más productivos y proyectar a nuestro grupo de trabajo internacionalmente, el intercambio de estudiantes ha sido en realidad una actividad constante y muy importante en esta interacción internacional.

Agradezco de antemano la atención a la presente y aprovecho la ocasión para enviarle afectuosos saludos.

Atentamente,

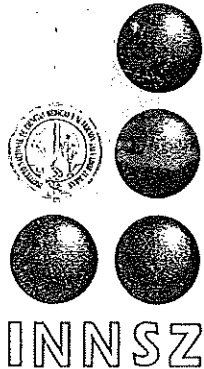
Dr. Rogelio Hernández Pando
Investigador en Ciencias Médicas F
Sección de Patología Experimental

Investigación

Tradición · Servicio

Asistencia · Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN
18 OCT 2012
Hca

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México D. F. a 26 de septiembre de 2012.

Dr. David Kersenobich Stalnikowitz
Director General
Presente

Estimado Dr. Kersenobich:

Por medio de la presente me permito solicitarle de la manera más atenta su aceptación para exentar del pago de gastos administrativos de estipendio personal y apoyo para compra de reactivos, de la beca recientemente otorgada por la Universidad de las Naciones Unidas a la Lic. en Biología Estela Isabel Bini, los cuales fueron depositados al proyecto titulado: Inmunidad y Esteroides Sexuales en la Tuberculosis. Estudios Clínicos y Experimentales, con número: PAT-712-12/14.1

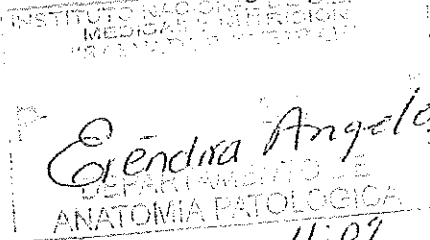
La Lic. Bini es de nacionalidad Argentina y actualmente está realizando sus tesis Doctoral en la Universidad de Rosario de su país natal, el tema de su tesis es sobre la influencia del género en la inmunopatología de la tuberculosis, la parte del estudio en pacientes lo está realizando en su país y los estudios experimentales los está realizando bajo mi supervisión, de hecho yo fungo como co-tutor de su tesis. La Lic. Bini no tiene apoyo económico por parte de su país, fue por esto que se tramitó una beca por parte de la Universidad de las Naciones Unidas, la cual fue recientemente aprobada para visitar periódicamente nuestro laboratorio apoyándola con un estipendio mensual de 1000 USD y de reactivos por 500 USD por 4 meses. Por el corto apoyo otorgado y debido a que no es mexicana me permito solicitar su aprobación para que quede exenta del pago de gastos administrativos. Cabe mencionar que el Dr. Rubén Lisker ha revisado el caso y dio su aprobación.

Como usted sabe, nuestro grupo de trabajo tiene una importante actividad colaborativa con diversos grupos extranjeros y este tipo de interacción nos permite ser más productivos y proyectar a nuestro grupo de trabajo internacionalmente, el intercambio de estudiantes ha sido en realidad una actividad constante y muy importante en esta interacción internacional.

Agradezco de antemano la atención a la presente y aprovecho la ocasión para enviarte afectuosos saludos.

Atentamente,

Dr. Rogelio Hernández Pando
Investigador en Ciencias Médicas F
Sección de Patología Experimental



- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

Investigación

Tradición

Servicio

Asistencia

Docencia



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

SEP 2012

(2443)
INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 17/07/2012

CLAVE: PAT-712-12/14-1

TÍTULO: INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Hernandez Pando Rogelio

DEPARTAMENTO O SERVICIO: UNIDAD DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Investigación Experimental

PATROCINADORES: UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES
UNIDAS

Patrocinador Cantidad : 79,926.60

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 03/09/2012 al 29/08/2014

Trimestre 1 \$79,926.60 Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 45,291.74	UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO ARGENTIA	
(sueldos y sobresueldos al personal)		INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION	
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		FIRMAS	
Materiales	\$22,645.87		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de Departamento
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		Director de Investigación	Director General
Viaticos	\$ 0.00	Fecha de resolución	
(reuniones científicas y trabajo de campo)		14-03-13	
Publicaciones	\$ 0.00		
costo directos de publicación, sobregiro)			
Suscripciones	\$ 0.00		
(libros, revistas, software, periódicos, etc)			

Varios	\$ 0.00
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	
Fondo de apoyo	\$ 11,988.99
(15% de la cantidad total de proyecto)	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Total :	\$79,926.60

10+
21/05/30

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

Antecedentes

Interrelaciones inmuno-endócrinas

La demostración que las células integrantes de los sistemas inmune, endócrino y nervioso comparten receptores para citocinas, hormonas y neuropéptidos, proveyó una base molecular para entender las influencias de los mediadores producidos por respuestas generadas en alguno de estos sistemas sobre la actividad de los restantes [1]. El Hipotálamo es el responsable de coordinar el sistema endocrino, puesto que recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo a la vez que interpreta estímulos ambientales como temperatura e iluminación, y promueve importantes acciones regulatorias en periferia. En respuesta a variados estímulos y mediante la liberación de hormonas peptídicas, la dupla hipotálamo-hipófisis regula la actividad de componentes claves del sistema endócrino como la tiroides, suprarrenales y gónadas. Nuestro análisis se concentrará en dos sistemas el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal

Las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH ó LHRH), secretadas por el hipotálamo, estimulan la producción y liberación las gonadotrofinas Foliculoestimulante (FSH) y Luteoestimulante (LH) a nivel hipofisario. Tales factores liberadores modulan la respuesta inmune [2, 3]. Está demostrada la presencia de sitios de unión específicos para GnRH en células T periféricas humanas (CD4+, CD8+) [4, 5], y de transcritos de mRNA de GnRh y su receptor (GnRH-R) en linfocitos periféricos [6]. La expresión del receptor de GnRH parece estar regulada por la GnRH nativa, lo que sugiere una función autócrina de esta hormona en las células inmunes. También se constató un efecto de GnRH sobre el desarrollo del sistema inmune, a través de una acción directa sobre la maduración del timo y el desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular. [7]. La GnRH tendría un rol exacerbador de desórdenes autoinmunes. Los estudios de Jacobson y col [8] en ratones de ambos sexos proclives al Lupus Sistémico Eritematoso (LES), castrados o no, indican que la administración de antagonistas de GnRH produce una reducción de los anticuerpos anti-DNA, y niveles séricos de IgG, y una disminución en la severidad de la enfermedad renal y aumento de la supervivencia.

En cuanto a las hormonas FSH y LH las mismas son glucoproteínas producidas en respuesta a la acción de la GnRH hipotalámica, para actuar sobre las gónadas como reguladoras de los ciclos sexuales. La LH actúa sobre el folículo ya maduro generando una serie de eventos que desembocan en la ovulación. Es la responsable de la ovulación, la maduración del oocito y la luteinización del folículo. Bioquímicamente, la LH produce en primer lugar aumento de pregnenolona y secundariamente de testosterona y estradiol, vía de la progesterona. La LH estimula la producción de esteroides gonadales como el estradiol, progesterona y testosterona, a partir del colesterol.

Los andrógenos y estrógenos rigen las diferencias entre sexos. Todos los estrógenos se sintetizan a partir de andrógenos, comenzando por colesterol o acetato. Los andrógenos como el androstenediol y testosterona se sintetizan en ovarios y testículos, y son parcialmente convertidos a estrógenos de tipo estrona y estradiol. Ambos sexos producen las mismas hormonas esteroides y las diferencias fisiológicas entre los

mismos son cuantitativas, en función de la cantidad de andrógeno producido y del porcentaje que termina convirtiéndose en estrógeno [9].

La respuesta celular a una hormona requiere la interacción con un receptor presente en la membrana o bien en su interior [10]. Los receptores de hormonas sexuales son mayoritariamente nucleares, aunque también se encuentran en citoplasma, donde son difíciles de visualizar. Se supone que todos ellos se hallan en equilibrio dinámico entre ambos compartimentos, facilitado por su escasa avidéz a unirse a estructuras celulares en ausencia de hormona. Los receptores estrogénicos poseen un dominio de unión a la hormona con distintas funciones: una parte de la molécula le confiere función de factor activador de la transcripción; otra región participa en la dimerización del receptor, indispensable para el reconocimiento de genes dependientes de la hormona; y una región de interacción con otras proteínas, como la hsp90 y p59. Cuando la hormona se une al dominio correspondiente del receptor, el receptor cambia su conformación pierde su afinidad por la hsp90, se libera de ella, y puede así dimerizar para favorecer la transcripción génica [11].

Los estrógenos señalizan a través de dos receptores, ER α y ER β [12]. Es muy importante considerar que la preponderancia de uno de los subtipos de receptores sobre el otro puede producir cambios en los efectos estrogénicos [13]. Tanto el ER α como el ER β se expresan en órganos linfoides y en progenitores hematopoyéticos en la médula ósea [14-16]. Además el ER α , y en algunos casos el ER β se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) y monocitos [17-22].

Para la progesterona se han descrito receptores citosólicos (PRs), pertenecientes a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares [22], y receptores asociados a membrana (mPRs) [23]. Se conocen tres isoformas de PRs: PR-A, PC-B y PR-C [24-26] con patrones de expresión específicos del tejido, que pueden ser modificados tras la exposición hormonal [27-29]. En ratones predominan las formas PR-A y PR-B [30,31].

En el hombre, los receptores para andrógenos pertenecen a una superfamilia de receptores esteroides, vitamina D, rhodopsina y otros ligandos. Poseen la capacidad de unirse a regiones específicas del DNA y favorecer la transcripción de los genes codificados en ellas actuando como factores de transcripción toda vez que se unen a su ligando [31]. Además de esta actividad genómica el complejo hormona receptor tiene una actividad no genómica reflejada en la capacidad de inducir la activación de cascadas enzimáticas (como las MAPK, PKA y PKC) en el citoplasma [32-34]. El AR está codificado por un único gen y presenta dos isoformas (A y B), que podrían desempeñar diferentes roles en la regulación de la transcripción génica [35].

Efectos de los esteroides sexuales sobre componentes del sistema inmune

Las hembras poseen un sistema inmune con diferente capacidad de respuesta respecto de los machos. Los niveles séricos de anticuerpos son más altos [36] y sus respuestas tras la inmunización [37-39] son más robustas, con una mejor respuesta humoral. Las hembras también rechazan los aloinjertos de piel más rápidamente, indicador de una mayor inmunidad celular [40, 41]. Estas diferencias de género, verificadas tanto en humanos como en modelos animales, serían las responsables de la mayor susceptibilidad de las hembras al desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoidea (AR), LES y Encefalomiелitis Autoinmune Experimental. En los machos la testosterona parece ejercer un efecto protector que disminuiría su susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes [42].

El dimorfismo sexual en cuanto a la respuesta inmune podría estar relacionado con acciones de los esteroides sexuales sobre la producción de citocinas. Comparando los

perfiles de citocinas secretadas por CPA de machos y hembras se observa que las CPA de machos secretan mayores niveles de IL-10 mientras que las CPA de las hembras producen niveles superiores de IL-12 [43]. Esto favorecería una mayor respuesta de tipo Th2 en machos [44-46]. Ello está avalado por diferencias en cuanto a la presencia de receptores específicos para estas hormonas en distintos tipos de células inmunocompetentes. Los estudios sobre los efectos de la testosterona en ratones indican que la castración aumenta la susceptibilidad al shock endotóxico acompañada de una mayor expresión de TLR4 sobre la superficie celular de sus macrófagos, por lo que la testosterona reduciría la expresión de TLR4 en estas células [47]. Los mismos autores demostraron además que estrógenos como el 17- β estradiol aumentan la expresión de TLR4 y de CD14 en macrófagos y regulan la susceptibilidad a la sepsis experimental. Al privar del estrógeno endógeno la producción de citocinas pro y antiinflamatorias decrecía, a la par de una reducción de TLR4 en dichas células. Se desprende que mientras los andrógenos suprimen la respuesta ante el desafío con una endotoxina bacteriana, los estrógenos promueven un aumento de tal reactividad [48].

Tomados en su conjunto, los andrógenos parecen ejercer efectos supresores en la respuesta inmune celular y humoral, y se comportan como hormonas anti-inflamatorias naturales. [49]. Por su parte, los estrógenos producen un incremento en los mediadores de la respuesta humoral y afectan el balance entre células T y B, ya que descienden la actividad de las primeras mientras que favorecen una hiperactividad de las segundas [50].

Por su parte, la progesterona, hormona clave para el mantenimiento del embarazo, interviene en la supresión de la inmunidad materna contra el feto debido a su importante acción antiinflamatoria, como así también al inhibir el desarrollo de respuestas Th1 y favorecer la actividad Th2 [51, 52]. Durante la fase lútea del ciclo menstrual de las mujeres, en que las concentraciones de progesterona y estradiol se encuentran elevadas se produce un aumento en la síntesis de IL-4 la cual influye para que predomine la respuesta Th2 [53].

Los andrógenos también tienen efecto en la secreción de citocinas, pero su influencia sobre las mismas puede depender no sólo de la concentración del esteroide, sino también del estatus hormonal del individuo, del rango social, o del momento estacional [53].

Los esteroides sexuales también influyen sobre la respuesta inmune anti-infecciosa. La primera demostración que los esteroides sexuales influían directamente sobre la respuesta inmune surgió del trabajo de Henry y Beverly quienes observaron diferencias en dicha respuesta en machos y hembras infectados con *Toxoplasma gondii* [54]. Esto fue corroborado por otros estudios donde se constató que la exacerbación de la enfermedad por parte de los estrógenos, resultaba contrarestanda por la gonadectomía lo cual implicaba un buen grado de resistencia [55, 56].

En estudios más recientes y en consonancia con los hallazgos señalados, pudo comprobarse que la mayor resistencia de los machos al protozooario coincide con una producción más rápida y elevada de IL-12 e IFN γ respecto de las hembras [57]. Entre las explicaciones sobre la mayor susceptibilidad de las hembras a la infección por *T. gondii* se sugiere una inhibición de los estrógenos sobre el promotor de IFN- γ [58], como así también los efectos inhibitorios de estrógenos y progesterona sobre los macrófagos y la producción de óxido nítrico [59].

Tuberculosis

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha venido afligiendo a la humanidad desde tiempos remotos. Aproximadamente se presentan 8.8 millones de nuevos casos

por año mientras que 1.6 millones de personas fallecen a causa de la misma durante el mismo período. La enfermedad esta ocasionada por un agente de vida intracelular, el *Mycobacterium tuberculosis*, el cual afecta esencialmente al pulmón donde puede producir desde algunas pocas lesiones místicas hasta un cuadro de intensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Dicho espectro de afectación orgánica parece estar relacionado con la respuesta inmune celular hacia la micobacteria, habida cuenta que puede mediar tanto protección como patología. Los elementos esenciales que participan de esta respuesta comprenden a los macrófagos y a las células T. Los primeros fagocitan a la micobacteria, promoviendo la producción de diferentes citocinas y la presentación de antígenos a células CD4+, las que a su vez sintetizan mediadores tipo Th1, como el IFN- γ y la IL-2, capaces de potenciar la acción bacteriostática-bactericida de los macrófagos y promover la proliferación de los linfocitos respondedores, respectivamente. Como fuera señalado más arriba las células T también pueden diferenciarse hacia el tipo Th2 para sintetizar citocinas estimuladoras de la inmunidad humoral como la IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Estudios en pacientes con Tuberculosis pulmonar (TB) de distintas geografías concuerdan en observar alteraciones en la producción de citocinas Th1 y Th2 con un predominio de las primeras en las formas leves, no así en los casos avanzados donde prevalece la síntesis de citocinas Th2. Los factores por lo cuales se produce esta alteración involucran no sólo a mediadores inmunológicos sino también a componentes del sistema neuroendócrino dado su estrecha interconexión. Es sabido que las citocinas inflamatorias estimulan el eje HHA con la consecuente secreción de cortisol y DHEA. Ambas hormonas pueden afectar, a su vez el desarrollo de la respuesta inmune. Así, los glucocorticoides facilitan la actividad Th2 en parte a través de una inhibición de las células Th1, mientras que la DHEA y la DHEAs contrarrestan los efectos de los GC favoreciendo respuestas Th1. Un trabajo reciente sobre la relación entre los niveles de cortisol y DHEA en pacientes tuberculosos varones con distinto grado de lesión pulmonar puso de manifiesto que todos ellos presentaban un aumento en los valores de cortisol, no así la DHEA cuyas concentraciones se ubicaron muy por debajo de los controles, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos [60]. Estudios simultáneos apuntan asimismo que este desequilibrio entre ambos esteroides pueden favorecer un desbalance Th1/Th2 lo cual tendría una repercusión desfavorable para la TB puesto que el control de la replicación del patógeno depende fundamentalmente de una respuesta Th1 apropiada.

Del Rey *et al* también reportaron una disminución en los niveles de testosterona en presencia de mayores concentraciones de estradiol lo que en su conjunto podría favorecer la persistencia de las reacciones inflamatorias como así también el corrimiento hacia el perfil Th2 en la enfermedad progresiva, habida cuenta de las acciones de ambas hormonas sobre estas respuestas.

Muy pocos estudios han tenido en cuenta la participación de los esteroides sexuales en la resistencia/susceptibilidad a la TB tanto en humanos como modelos experimentales. Un par de trabajos señalan que los ratones hembras son más resistentes a la infección con micobacterias no tuberculosa, y que el tratamiento con testosterona eleva la susceptibilidad a la infección con *Mycobacterium marinum* [61, 62].

En función de todo lo expuesto resulta de sumo interés analizar la influencia de las hormonas sexuales en la enfermedad tuberculosa. Para una aproximación más mecanística el estudio de centrará inicialmente en un modelo muy bien caracterizado de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* cepa H37Rv. En un paso posterior se abordará el estudio de los perfiles para hormonas sexuales en pacientes con TB pulmonar.

DEFINICION DEL PROBLEMA

Estudios epidemiológicos diversos han mostrado una mayor frecuencia de TB en hombres que en mujeres, lo cual inicialmente fue atribuido a situaciones sociales, laborales o de asistencia a consulta médica, sin embargo en estudios recientes con pacientes la contribución de estos factores se ha descartado y actualmente se considera que ser de género masculino es un factor de riesgo para padecer TB. Es interesante que esto no se haya constatado en modelos experimentales

JUSTIFICACION

Debido a su importancia fisiopatologica, es importante confirmar en modelos experimentales murinos que la TB es influida por hormonas sexuales y que esta es la base de las diferencias en frecuencia y capacidad de control entre mujeres y hombres

HIPÓTESIS

La TB es más grave en términos de su evolución (más rápida y mortal), carga bacteriana pulmonar y extensión de daño tisular en el género masculino que en el femenino y esto se debe a la acción promotora de la respuesta inmunológica que tienen los estrógenos y a la actividad anti-inflamatoria de la testosterona

OBJETIVOS

Objetivos específicos

En el modelo experimental

- Establecer las diferencias en el curso de la enfermedad (mortalidad, carga bacilar pulmonar, extensión de daño histológico, expresión de citocinas de tipo Th-1 y Th-2) entre ratones machos y hembras de la cepa Balb/c infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de *M. tuberculosis* vivo y virulento cepa H37Rv.
- Comparar la evolución de la enfermedad entre ratones machos y hembras castrados y no castrados
- Cuantificar las concentración de testosterona en el suero de ratones machos infectados a lo largo de la enfermedad

En pacientes

- En pacientes con TB pulmonar de distinta severidad, HIV negativos y que aún no han iniciado tratamiento antibacilar.
- Investigar en qué medida las variaciones en los niveles circulantes de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona y citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-6) se correlacionan entre sí y con la severidad de la enfermedad.
- Determinar si existen diferencias por sexo en cuanto a la presentación clínica de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Estudios experimentales en ratones:

Ciento diez ratones machos y el mismo número de ratones hembras de la cepa Balb/c con 8 semanas de edad serán divididos en 4 grupos. Al primer grupo de ratones machos simulados, se les practicará una incisión quirúrgica abdominal simulando la resección de los testículos, el segundo grupo corresponde al de machos castrados a los cuales se le extirparán quirúrgicamente los testículos, el tercer grupo será el de hembras simuladas y el cuarto grupo corresponde al de hembras con ooforectomía bilateral. A todas las jaulas de hembras se les colocará aserrín con orina de macho por tres días para sincronizar su ciclo hormonal. Después de una semana de recuperación de la cirugía, a todos los animales se les anestesiara con vapores de sevoflurano y en una campana de seguridad biológica nivel 3 se les infectará a través de una cánula intratraqueal de acero inoxidable, depositando 250,000 bacterias vivas de la cepa H37Rv suspendidas en 100 microlitros de PBS. Los animales infectados se confinarán en grupos de 10 por caja en un sistema de microaisladores conectados a un sistema de presión negativa y aire filtrado constante [98]. Las bacterias se crecen en medio líquido 7H9 hasta llegar a la fase logarítmica en las que se colectan y preparan para ser contadas y confirmada su viabilidad por citometría de flujo. Grupos de 6 ratones en cada uno de los grupos se sacrificarán en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días, el sacrificio se realiza bajo anestesia por exsanguinación, la sangre se colecta para posteriormente separar el suero, el tórax se abre inmediatamente para exponer los pulmones, el pulmón derecho o izquierdo de 4 animales se perfunde con alcohol etílico absoluto para posteriormente incluirlo en parafina y obtener cortes histológicos, los demás pulmones se extraen y congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Diez animales por grupo se dejan para determinar mortalidad espontánea y construir gráficas de supervivencia.

Se realizarán dos experimentos completos independientes.

Estudio morfométrico:

En los cortes histológicos de cada pulmón y ratón sacrificado se determinará por morfometría automatizada utilizando el equipo Leica Q/Win 500, el área de inflamación intersticial, perivascular y peribronquial, así como el tamaño de los granulomas y el porcentaje de área pulmonar afectado por neumonía.

Determinación de carga bacilar:

En 4 pulmones congelados por grupo se determinará la carga bacilar después de homogenizarlos con un politrón en tubos falcón estériles que contienen 1ml de PBS/Tween80 al 0.05%, cinco diluciones de cada homogenizado se siembran por duplicado en cajas de petri que tienen el medio BactoMiddlebrook 7H10 agar enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa. Las cajas se incuban a 37°C con 5% de CO₂. El número de unidades formadoras de colonias se cuenta después de 21 días.

Medición de la expresión genética de citocinas por RT-PCR en tiempo real:

De los 4 pulmones restantes por cada tiempo de sacrificio y de cada grupo experimental se purificará el RNA total usando el mini-kit RNeasy de Qiagen. Cada pulmón se sumerge en 2ml de medio RPMI-1640 con 0.5mg/ml de colagenasa tipo 2 y se incuba por 1hr a 37°C. Posteriormente el tejido se pasa a través de una malla de 70 micras, empujando el tejido con un pistilo y lavando con el medio. Las células así obtenidas se

centrifugan, el sobrenadante se elimina y los glóbulos rojos se eliminan con un buffer de lisis. Después de contar las células, se adicionan 350 microlitros del buffer de lisis tisular por cada 50 millones de células y el RNA se purifica usando el mini-kit RNeasy de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad del RNA se evalúa por espectrofotometría (260/289nm) y en geles de agarosa. La transcripción reversa del RNA se llevará a cabo con 5microgramos de RNA, oligo-dT y el kit Omniscript de Qiagen. El PCR en tiempo real se realizará utilizando el equipo 7500 real-time PCR de Applied Biosystems y el kit SYBR-Green. Se construirán curvas estándar del producto de PCR cuantificado y en diferentes diluciones, así como del control negativo. Los iniciadores (primers) específicos para cada citocina se diseñan con el programa Primer-Express, las secuencias son las siguientes: : gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH): 5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3', 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'; óxido nítrico sintetasa inducible: 5'-AGCGAGAGCAGGTGGAAG-3', 5'-CATTTTCGCTGTCTCCCCAA-3'; factor de necrosis tisular alfa: 5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3', 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'; interferon gama: 5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3', 5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3'; interleucina 4: 5'-CGTCCTCACAGCAACGGAGA-3', 5'-GCAGCTTATCGATGAATCCAGG-3'. Las condiciones del PCR son: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. Las cantidades específicas del RNA mensajero en cada muestra se determinarán de acuerdo a la curva estándar del gen específico correspondiente. El número de copias de RNAm de cada citocina se expresa en relación a un millón de copias del gen constitutivo G3PDH

Todo el trabajo experimental es realizado en conformidad con el comité local de ética en experimentación con animales, el cual se fundamenta en el artículo de la constitución mexicana NOM062-ZOO-1999 sobre reglas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El proyecto ha sido revisado y aprobado por el comité de investigación de animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" con la clave PAT-19-10-12-1.

Lugar de Trabajo del Modelo Experimental:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", DF, México.

Estudios en pacientes (esta parte se realizara en la Universidad de Rosario Argentina)

Grupos de estudio

Enfermos. La muestra de pacientes será seleccionada entre enfermos adultos (18 a 60 años). Todos serán pacientes con serología negativa para HIV, y el diagnóstico de TB se realizará sobre la base de criterios clínicos y radiológicos sumado a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en los fluidos biológicos. Todas las muestras se obtendrán antes de la iniciación del tratamiento específico. En todos los pacientes con TB se tendrá en cuenta el grado de compromiso, el cual será clasificado según la extensión y tipo de lesión radiológica en: leve, pacientes con un único lóbulo involucrado sin cavidades visibles; moderado, pacientes con compromiso unilateral de 2 o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, que no excedan un diámetro total

de 4 cm; avanzada o severa, enfermedad bilateral con afectación masiva y cavidades múltiples.

Con el propósito de analizar potenciales factores de confusión sobre las variables de impacto se tomarán en cuenta datos en relación a edad y sexo como así también a los valores sanguíneos de glucosa, uremia, proteínas totales, antecedentes de alcoholismo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica vinculada al tabaquismo. Todos los pacientes deberán hallarse libres de compromiso directo de la glándula suprarrenal por el bacilo tuberculoso (la Enfermedad de Addison es muy poco frecuente en nuestro medio). La ficha clínica también recogerá información acerca de otras variables vinculadas a la TB como eritrosedimentación, síndrome de impregnación bacilar, frecuencia cardíaca y respiratoria. También se conformará un cuestionario para conocer el estado menstrual de las pacientes (o presencia de menopausia), ingesta de anti-conceptivos.

Controles. Este grupo se compondrá de voluntarios sanos similares en sexo y edad, que no registren contactos con pacientes TB, enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos. En buena parte de los casos las muestras de sangre se obtienen de personal de laboratorio. La incorporación de las personas se efectuará una vez que hayan otorgado su libre consentimiento a participar. Todos ellos serán previamente informados de los objetivos del estudio, el cual se ajustará a las normas éticas nacionales e internacionales que regulan la investigación en seres humanos. La identidad de los participantes no será revelada.

Cuantificación de citocinas:

Los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6 se determinarán en el plasma por enzimoimmunoensayos comerciales (ELISA, R&D o Pharmingen).

Cuantificación de hormonas:

Las concentraciones en plasma de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona se determinarán por enzimoimmunoensayos de competición comerciales (ELISA, DRG Systems, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadísticos:

El análisis estadístico se efectuará por medio del programa Stata Statistics Package. Se utilizará el método de Kolmogorov-Smirnov para analizar si las variables se distribuyen normalmente, en caso de no hacerlo se aplicarán las transformaciones necesarias. Las variables categóricas se analizarán por las pruebas de χ^2 o probabilidad exacta de Fisher, mientras que se aplicará el análisis de la variancia o la t de Student para las mediciones cuantitativas. Asimismo se empleará el modelo lineal generalizado a efectos de determinar si los factores concurrentes ligados a la condición clínica de los enfermos influyen sobre los diversos parámetros de interés. Dado las variaciones de las hormonas sexuales (LH, FSH, estradiol y progesterona) en función de la presencia o ausencia de menopausia, se pondrá un especial énfasis al análisis por separado de la población femenina en función de este factor. Los estudios de asociación entre los niveles circulantes de hormonas, citocinas y variables clínicas se efectuarán por medio de análisis multivariado. Se utilizará el método de Kaplan y Meier para comparar las curvas de supervivencia en los diferentes grupos de ratones y la prueba de los rangos logarítmicos. Se calcularán los coeficientes de correlación parciales. El significado estadístico será $P < 0.05$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Becedovsky H, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996; 17(1):64.
- 2- Schuurs AH, Verhuel HA. Effects of sex steroids on the immune response. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1990; 35(2):157.
- 3- Mann DR, Howie S, Paulsen DF, Akinbami MA, Lunn SF, Fraser HM. Changes in lymphoid tissue after treatment with a gonadotropin releasing hormone antagonist in the neonatal marmoset (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Reproductive Immunol.* 1998; 39(4):292.
- 4- Azad N, La Paglia N, Jurgens KA, Kirsteins L, Emanuele NV, Kelley MR, et al. Immunoactivation enhance the concentration of luteinizing hormone-releasing hormone peptide and its gene expression in human peripheral T-lymphocytes. *Endocrinology.* 1993; 133(1): 215.
- 5.- Azad N, LaPaglia N, Kirsteins L, Udin S, Steiner J, William DJ, et al. Jurkat cell proliferative activity is increased by luteinizing hormone- releasing hormone. *Journal of Endocrinology.* 1997; 153:241.
- 6.- Tanriverdi F, Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *Journal of Endocrinology.* 2003; 176:293.
- 7.- Morale MC, Batticane N, Bartoloni G, Guarcello V, Farinella Z, Galasso MG, et al. Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune response. *Endocrinology.* 1991; 128:1073.
- 8.- Jacobson JD, Nisula BC, Steinberg AD. Modulation of the expression of murine lupus by gonadotropin-releasing hormone analogs. *Endocrinology.* 1994; 134:2516-2523
- 9.- Federman, DD. The biology of human sex differences. *N Engl J Med.* 2006; 354:1507.
- 10.- Heinlein CA, Chang C. (2002) The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Molecular Endocrinology* 16: 2181-2187
- 11.- Díaz-Chico BN. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: biología y clínica del cáncer. *Biocáncer* 2, 2004.
- 12.- Kuiper, GG; Emmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sei USA.* 1996; 93:5925.
- 13.- Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews.* 2007; 28:521.
- 14.- Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett.* 2005; 97:107.
- 15.- Igarashi H, Kouro T, Yokota T, Comp PC, Kincade PW. Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:15131.
- 16.- Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science.* 1999; 283: 1277.

- 17.- Komi J, Lassila O. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2000; 95:2875.
- 18.- Härkönen PL, Väänänen HK. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1089:218.
- 19.- Mor G, Sapi E, Abrahams VM, Rutherford T, Song J, Hao XY, et al. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *J Immunol*. 2003; 170:114.
- 20.- Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest*. 2002; 109:1625.
- 21.- Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Lubahn DB, Estes DM. Estrogen receptor-alpha deficiency promotes increased TNF-alpha secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J Leukoc Biol*. 2004; 75:1166.
- 22.- Bagchi MK, Tsai SY, Weigel NL, Tsai MJ, O'Malley BW. Regulation of in vitro transcription by progesterone receptor. Characterization and kinetic studies. *J Biol Chem*. 1990; 265: 5129.
- 23.- Wehling M, Schultz A, Losel R. To be or not to be (a receptor). *Steroids*. 2007; 72:107.
24. Conneely OM, Sullivan WP, Toft DO, Birnbaumer M, Cook R G, Maxwell BL, et al. Molecular cloning of the chicken progesterone receptor. *Science*. 1986; 233:767.
25. Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, et al. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1987; 143:740.
- 26.- Wei LL, Gonzalez-Aller C, Wood WM, Miller LA, Horwitz K B. Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol. Endocrinol*. 1990; 4:1833.
- 27.- Gronemeyer, H., Meyer, M. E., Bocquel, M. T., Kastner, P., Turcotte, B., Chambon, P. Progestin receptors: isoforms and antihormone action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 1991; 40:271.
- 28.- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-Veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1216:289.
- 29.- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*. 1990; 9:1603.
- 30.- Ogle TF, Dai D, George P, Mahesh VB. Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy. *Biol. Reprod*. 1998; 58:1188.
- 31.- Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brein CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001; 104(5):719.
- 32.- Boonyaratankornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, et al. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell*. 2001; 8:269.
- 33.- Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *PNAS*. 1994; 91:1234.
- 36.- Butterworth M, McClellan B, Allansmith M. Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature*. 1967; 214:1224.
- [37] Eidinger D, Garrett TJ. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *JExp Med*. 1972; 136:1098.

- [38] Rhodes K, Scott A, Markham RL, Monk-Jones ME. Immunological sex differences: a study of patients with rheumatoid arthritis, their relatives, and controls. *Ann Rheum Dis.* 1969; 28:104.
- [39] London WT, Drew JS. Sex differences in response to hepatitis B infection among patients receiving chronic dialysis treatment. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 1977; 74:2561.
- [40] Hilgert IZ, Pokorná K, Singh J, Kolc H, Kristofová P, Málek P. Different efficiency of mercurascan in allograft survival prolongation in male and female mice. *Folia Biol.* 1981; 27:379
- [41] Enosawa S, Hirasawa K.. Sex-associated differences in the survival of skin grafts in rats: enhancement of cyclosporine immunosuppression in male compared with female recipients. *Transplantation* 1989; 47:933.
- [42] Liva SM, Voskuhl RR. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol.* 2001; 167:2060-7.
- [43] Wilcoxon SC, Kirkman E, Dowdell KC, Stohlman SA. Gender-Dependent IL-12 Secretion by APC Is Regulated by IL-10. *J Immunol.* 2000; 164:6237.
- [44] Cua DJ, Hinton DR, Stohlman SA. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice: Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol.* 1995; 155:4052.
- [45] Dalal M, Kim S, Voskuhl RR. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol.* 1997; 159:3.
- [46] Bebo Jr BF, Schuster JC, Vandenbark AA, Offner H. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *J Immunol.* 1999; 162:35.
- [47] Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod.* 2008; 78:432-7.
- [48] Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I . Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinol* 2009; 150:3877.
- [49] Cutolo M, Serio B, Villaggio B, Pizzorni C, Cravio C, Sulli A. Androgens and Estrogens modulate the Immune and Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 966:131.
- [50] Ansar Ahmed S, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. Gender and Risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environmental health perspectives.* 1999; 107, 5: 681.
- [51] Miyaura H, Iawata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by Progesterone and Glucocorticoids. *J Immunol.* 2002; 168:1087.
- [52] Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.* 1995; 155:128.
- [53] De León-Nava M, Morales-Montor J. Dimorfismo Sexual Inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Rev Invest Clin.* 2006; 58:161.
- [54] Henry L, Beverley JKA. Age and sex differences in the response of lymph node post-capillary venules in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Pathol.* 1976; 57:274.

- [55] Kittas C, Henry L. Effect of gonadectomy and oestrogen administration on the response of lymph-node post-sapillary venules to infection with *Toxoplasma gondii*. *J Pathol*. 1978; 127:129.
- [56] Kittas C, Henry L. Effect of sex hormones on the response of mice to infection with *Toxoplasma gondii*. *BJExp Pathol*. 1980; 61:590.
- [57] Walker W, Roberts CW, Ferguson DJP, Jebbari H, Alexander J. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect. Immun*. 1997; 65:1119.
- [58] Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J. Immunol*. 1991; 146:4362.
- [59] Chao TC, Vanalten PJ and Walter RJ. Steroid sex-hormones and macrophage function - modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. *Am J Reprod Immunol*. 1994; 32:43.
- 60.- del Rey A, Mahuad CV, Bozza VV, Bouge C, Farroni Mi, Bay ML, Bottasso OA, BesedovskyHO. Endocrine and cytokine in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behavior and Immunity*. 2007; 21:171.
- 61.- Yamamoto Y, Tomioka H, Sato K, Saito H, Yamada Y, Setogawa T. Sex differences in the susceptibility of mice to infection induced by *Mycobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142:430.
- 62.- Yamamoto Y, Saito H, Setogawa T, Tomioka H. Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun*. 1991; 59:4089.
- [98] Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, VelasquilloC, Larriva-Sahd J. Correlation between the kinetics of Th1/Th2cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*; 1996; 89:26.



Folio del registro: PAT-712-12/14-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

Título del proyecto: INMUNIDAD Y ESTEROIDES SEXUALES EN LA TUBERCULOSIS. ESTUDIOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES

Tipo de proyecto: Investigación Experimental

Antecedentes: Interrelaciones inmuno-endócrinas La demostración que las células integrantes de los sistemas inmune, endócrino y nervioso comparten receptores para citocinas, hormonas y neuropéptidos, proveyó una base molecular para entender las influencias de los mediadores producidos por respuestas generadas en alguno de estos sistemas sobre la actividad de los restantes [1]. El Hipotálamo es el responsable de coordinar el sistema endocrino, puesto que recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo a la vez que interpreta estímulos ambientales como temperatura e iluminación, y promueve importantes acciones regulatorias en periferia. En respuesta a variados estímulos y mediante la liberación de hormonas peptídicas, la dupla hipotálamo-hipófisis regula la actividad de componentes claves del sistema endócrino como la tiroidea, suprarrenales y gónadas. Nuestro análisis se concentrará en dos sistemas el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG). Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal Las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH ó LHRH), secretadas por el hipotálamo, estimulan la producción y liberación las gonadotropinas Foliculoestimulante (FSH) y Luteoestimulante (LH) a nivel hipofisario. Tales factores liberadores modulan la respuesta inmune [2, 3]. Está demostrada la presencia de sitios de unión específicos para GnRH en células T periféricas humanas (CD4+, CD8+) [4, 5], y de transcritos de mRNA de GnRh y su receptor (GnRH-R) en linfocitos periféricos [6]. La expresión del receptor de GnRH parece estar regulada por la GnRH nativa, lo que sugiere una función autócrina de esta hormona en las células inmunes. También se constató un efecto de GnRH sobre el desarrollo del sistema inmune, a través de una acción directa sobre la maduración del timo y el desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular. [7]. La GnRH tendría un rol exacerbador de desórdenes autoinmunes. Los estudios de Jacobson y col [8] en ratones de ambos sexos proclives al Lupus Sistémico Eritematoso (LES), castrados o no, indican que la administración de antagonistas de GnRH produce una reducción de los anticuerpos anti-DNA, y niveles séricos de IgG, y una disminución en la severidad de la enfermedad renal y aumento de la supervivencia. En cuanto a las hormonas FSH y LH las mismas son glucoproteínas producidas en respuesta a la acción de la GnRH hipotalámica, para actuar sobre las gónadas como reguladoras de los ciclos sexuales. La LH actúa sobre el folículo ya maduro generando una serie de eventos que desembocan en la ovulación. Es la responsable de la ovulación, la maduración del oocito y la luteinización del folículo. Bioquímicamente, la LH produce en primer lugar aumento de pregnenolona y secundariamente de testosterona y estradiol, vía de la progesterona. La LH estimula la producción de esteroides gonadales como el estradiol, progesterona y testosterona, a partir del colesterol. Los andrógenos y estrógenos rigen las diferencias entre sexos. Todos los estrógenos se sintetizan a partir de andrógenos, comenzando por colesterol o acetato. Los andrógenos como el androstenediol y testosterona se sintetizan en ovarios y testículos, y son parcialmente convertidos a estrógenos de tipo estrona y estradiol.

Ambos sexos producen las mismas hormonas esteroideas y las diferencias fisiológicas entre los mismos son cuantitativas, en función de la cantidad de andrógeno producido y del porcentaje que termina convirtiéndose en estrógeno [9]. La respuesta celular a una hormona requiere la interacción con un receptor presente en la membrana o bien en su interior [10]. Los receptores de hormonas sexuales son mayoritariamente nucleares, aunque también se encuentran en citoplasma, donde son difíciles de visualizar. Se supone que todos ellos se hallan en equilibrio dinámico entre ambos compartimentos, facilitado por su escasa avidez a unirse a estructuras celulares en ausencia de hormona. Los receptores estrogénicos poseen un dominio de unión a la hormona con distintas funciones: una parte de la molécula le confiere función de factor activador de la transcripción; otra región participa en la dimerización del receptor, indispensable para el reconocimiento de genes dependientes de la hormona; y una región de interacción con otras proteínas, como la hsp90 y p59. Cuando la hormona se une al dominio correspondiente del receptor, el receptor cambia su conformación pierde su afinidad por la hsp90, se libera de ella, y puede así dimerizar para favorecer la transcripción génica [11]. Los estrógenos señalizan a través de dos receptores, ER α y ER β [12]. Es muy importante considerar que la preponderancia de uno de los subtipos de receptores sobre el otro puede producir cambios en los efectos estrogénicos [13]. Tanto el ER α como el ER β se expresan en órganos linfoides y en progenitores hematopoyéticos en la médula ósea [14-16]. Además el ER α , y en algunos casos el ER β se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) y monocitos [17-22]. Para la progesterona se han descrito receptores citosólicos (PRs), pertenecientes a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares [22], y receptores asociados a membrana (mPRs) [23]. Se conocen tres isoformas de PRs: PR-A, PR-B y PR-C [24-26] con patrones de expresión específicos del tejido, que pueden ser modificados tras la exposición hormonal [27-29]. En ratones predominan las formas PR-A y PR-B [30,31]. En el hombre, los receptores para andrógenos pertenecen a una superfamilia de receptores esteroideos, vitamina D, rhodopsina y otros ligandos. Poseen la capacidad de unirse a regiones específicas del DNA y favorecer la transcripción de los genes codificados en ellas actuando como factores de transcripción toda vez que se unen a su ligando [31]. Además de esta actividad genómica el complejo hormona receptor tiene una actividad no genómica reflejada en la capacidad de inducir la activación de cascadas enzimáticas (como las MAPK, PKA y PKC) en el citoplasma [32-34]. El AR está codificado por un único gen y presenta dos isoformas (A y B), que podrían desempeñar diferentes roles en la regulación de la transcripción génica [35].

Efectos de los esteroideos sexuales sobre componentes del sistema inmune

Las hembras poseen un sistema inmune con diferente capacidad de respuesta respecto de los machos. Los niveles séricos de anticuerpos son más altos [36] y sus respuestas tras la inmunización [37-39] son más robustas, con una mejor respuesta humoral. Las hembras también rechazan los aloinjertos de piel más rápidamente, indicador de una mayor inmunidad celular [40, 41]. Estas diferencias de género, verificadas tanto en humanos como en modelos animales, serían las responsables de la mayor susceptibilidad de las hembras al desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoidea (AR), LES y Encefalomicelitis Autoinmune Experimental. En los machos la testosterona parece ejercer un efecto protector que disminuiría su susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes [42]. El dimorfismo sexual en cuanto a la respuesta inmune podría estar relacionado con acciones de los esteroideos sexuales sobre la producción de citocinas. Comparando los perfiles de citocinas secretadas por CPA de machos y hembras se observa que las CPA de machos secretan mayores niveles de IL-10 mientras que las CPA de las hembras producen niveles superiores de IL-12 [43]. Esto favorecería una mayor respuesta de tipo Th2 en machos [44-46]. Ello está avalado por diferencias en cuanto a la presencia de receptores específicos para estas hormonas en distintos tipos de células inmunocompetentes. Los estudios sobre los efectos de la testosterona en ratones indican que la castración aumenta la susceptibilidad al shock endotóxico acompañada de una mayor expresión de TLR4 sobre la superficie celular de sus macrófagos, por lo que la testosterona reduciría la expresión de TLR4 en estas células [47]. Los mismos autores demostraron además que estrógenos como el 17- β estradiol aumentan la expresión de TLR4 y de CD14 en macrófagos y regulan la susceptibilidad a la sepsis experimental. Al privar del estrógeno endógeno la producción de citocinas pro y antiinflamatorias decrecía, a la par de una reducción de TLR4 en dichas células. Se desprende que mientras los andrógenos suprimen la respuesta ante el desafío con una endotoxina bacteriana, los estrógenos promueven un aumento de tal reactividad [48]. Tomados en su conjunto, los andrógenos parecen ejercer efectos supresores en la respuesta inmune celular y humoral, y se comportan como hormonas anti-inflamatorias naturales. [49]. Por su parte, los estrógenos producen un incremento en los mediadores de la respuesta humoral y afectan el balance entre células T y B, ya que disminuyen la actividad de las primeras mientras que favorecen una hiperactividad de las segundas [50]. Por su parte, la progesterona, hormona clave para el mantenimiento del embarazo, interviene en la supresión de la inmunidad materna contra el feto debido a su importante acción antiinflamatoria, como así también al inhibir el desarrollo de respuestas Th1 y favorecer la actividad Th2 [51, 52]. Durante la fase lútea del ciclo menstrual de las mujeres, en que las concentraciones de progesterona y estradiol se encuentran elevadas se produce un aumento en la síntesis de IL-4 la cual influye para que predomine la respuesta Th2 [53]. Los

andrógenos también tienen efecto en la secreción de citocinas, pero su influencia sobre las mismas puede depender no sólo de la concentración del esteroide, sino también del estatus hormonal del individuo, del rango social, o del momento estacional [53]. Los esteroides sexuales también influyen sobre la respuesta inmune anti-infecciosa. La primera demostración que los esteroides sexuales influían directamente sobre la respuesta inmune surgió del trabajo de Henry y Beverly quienes observaron diferencias en dicha respuesta en machos y hembras infectados con *Toxoplasma gondii* [54]. Esto fue corroborado por otros estudios donde se constató que la exacerbación de la enfermedad por parte de los estrógenos, resultaba contrarrestada por la gonadectomía lo cual implicaba un buen grado de resistencia [55, 56]. En estudios más recientes y en consonancia con los hallazgos señalados, pudo comprobarse que la mayor resistencia de los machos al protozoario coincide con una producción más rápida y elevada de IL-12 e IFN γ respecto de las hembras [57]. Entre las explicaciones sobre la mayor susceptibilidad de las hembras a la infección por *T. gondii* se sugiere una inhibición de los estrógenos sobre el promotor de IFN- γ [58], como así también los efectos inhibitorios de estrógenos y progesterona sobre los macrófagos y la producción de óxido nítrico [59].

Tuberculosis La Tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha venido afligiendo a la humanidad desde tiempos remotos. Aproximadamente se presentan 8.8 millones de nuevos casos por año mientras que 1.6 millones de personas fallecen a causa de la misma durante el mismo período. La enfermedad esta ocasionada por un agente de vida intracelular, el *Mycobacterium tuberculosis*, el cual afecta esencialmente al pulmón donde puede producir desde algunas pocas lesiones mínimas hasta un cuadro de intensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Dicho espectro de afectación orgánica parece estar relacionado con la respuesta inmune celular hacia la micobacteria, habida cuenta que puede mediar tanto protección como patología. Los elementos esenciales que participan de esta respuesta comprenden a los macrófagos y a las células T. Los primeros fagocitan a la micobacteria, promoviendo la producción de diferentes citocinas y la presentación de antígenos a células CD4+, las que a su vez sintetizan mediadores tipo Th1, como el IFN- γ y la IL-2, capaces de potenciar la acción bacteriostática-bactericida de los macrófagos y promover la proliferación de los linfocitos respondedores, respectivamente. Como fuera señalado más arriba las células T también pueden diferenciarse hacia el tipo Th2 para sintetizar citocinas estimuladoras de la inmunidad humoral como la IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Estudios en pacientes con Tuberculosis pulmonar (TB) de distintas geografías concuerdan en observar alteraciones en la producción de citocinas Th1 y Th2 con un predominio de las primeras en las formas leves, no así en los casos avanzados donde prevalece la síntesis de citocinas Th2. Los factores por lo cuales se produce esta alteración involucran no sólo a mediadores inmunológicos sino también a componentes del sistema neuroendócrino dado su estrecha interconexión. Es sabido que las citocinas inflamatorias estimulan el eje HHA con la consecuente secreción de cortisol y DHEA. Ambas hormonas pueden afectar, a su vez el desarrollo de la respuesta inmune. Así, los glucocorticoides facilitan la actividad Th2 en parte a través de una inhibición de las células Th1, mientras que la DHEA y la DHEAs contrarrestan los efectos de los GC favoreciendo respuestas Th1. Un trabajo reciente sobre la relación entre los niveles de cortisol y DHEA en pacientes tuberculosos varones con distinto grado de lesión pulmonar puso de manifiesto que todos ellos presentaban un aumento en los valores de cortisol, no así la DHEA cuyas concentraciones se ubicaron muy por debajo de los controles, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos [60]. Estudios simultáneos apuntan asimismo que este desequilibrio entre ambos esteroides pueden favorecer un desbalance Th1/Th2 lo cual tendría una repercusión desfavorable para la TB puesto que el control de la replicación del patógeno depende fundamentalmente de una respuesta Th1 apropiada. Del Rey et al también reportaron una disminución en los niveles de testosterona en presencia de mayores concentraciones de estradiol lo que en su conjunto podría favorecer la persistencia de las reacciones inflamatorias como así también el corrimiento hacia el perfil Th2 en la enfermedad progresiva, habida cuenta de las acciones de ambas hormonas sobre estas respuestas. Muy pocos estudios han tenido en cuenta la participación de los esteroides sexuales en la resistencia/susceptibilidad a la TB tanto en humanos como modelos experimentales. Un par de trabajos señalan que los ratones hembras son más resistentes a la infección con micobacterias no tuberculosas, y que el tratamiento con testosterona eleva la susceptibilidad a la infección con *Mycobacterium marinum* [61, 62]. En función de todo lo expuesto resulta de sumo interés analizar la influencia de las hormonas sexuales en la enfermedad tuberculosa. Para una aproximación más mecánica el estudio de centrará inicialmente en un modelo muy bien caracterizado de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* cepa H37Rv. En un paso posterior se abordará el estudio de los perfiles para hormonas sexuales en pacientes con TB pulmonar

Definición del problema:

Estudios epidemiológicos diversos han mostrado una mayor frecuencia de TB en hombres que en mujeres, lo cual inicialmente fue atribuido a situaciones sociales, laborales o de asistencia a consulta médica, sin embargo en estudios recientes con pacientes la contribución de estos factores se ha descartado y actualmente se considera que ser de género masculino es un factor de riesgo para padecer TB. Es interesante que esto no se haya constatado en modelos experimentales

Justificación: Debido a su importancia fisiopatológica, es importante confirmar en modelos experimentales murinos que la TB es influida por hormonas sexuales y que esta es la base de las diferencias en frecuencia y capacidad de control entre mujeres y hombres

Hipótesis: La TB es más grave en términos de su evolución (más rápida y mortal), carga bacteriana pulmonar y extensión de daño tisular en el género masculino que en el femenino y esto se debe a la acción promotora de la respuesta inmunológica que tienen los estrógenos y a la actividad anti-inflamatoria de la testosterona

Fecha estimada de inicio: 03/09/2012

Fecha estimada de término: 29/08/2014

Comisión a la que somete 5

¿Incluye documentos anexos?: Si

Investigadores participantes

(0) Comentarios

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Hernandez Pando, Rogelio	Investigador responsable	1	Sí

Población vulnerable

(0) Comentarios

Población vulnerable vinculado al protocolo 5

Otra población:: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Objetivos

(0) Comentarios

Objetivo: Objetivos específicos: En el modelo experimental (ESTA PARTE SE REALIZARÁ EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION) 1.-Establecer las diferencias en el curso de la enfermedad (mortalidad, carga bacilar pulmonar, extensión de daño histológico, expresión de citocinas de tipo Th-1 y Th-2) entre ratones machos y hembras de la cepa Balb/c infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de M. tuberculosis vivo y virulento cepa H37Rv. 2.-Comparar la evolución de la enfermedad entre ratones machos y hembras castrados y no castrados. 3.-Cuantificar las concentración de testosterona en el suero de ratones machos infectados a lo largo de la enfermedad. Estudios en pacientes (ESTA PARTE SE

REALIZARÁ EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA) 1.- En pacientes con TB pulmonar de distinta severidad, HIV negativos y que aún no han iniciado tratamiento antibacilar. 2.- Investigar en qué medida las variaciones en los niveles circulantes de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona y citocinas (IFN-GAMMA, TNF-ALFA e IL-6) se correlacionan entre sí y con la severidad de la enfermedad. 3.-Determinar si existen diferencias por sexo en cuanto a la presentación clínica de la enfermedad.

Tipo de objetivo:

General

Metodología: Diseño general

(0) Comentarios

Metodología gral:

Estudios experimentales en ratones: Ciento diez ratones machos y el mismo número de ratones hembras de la cepa Balb/c con 8 semanas de edad serán divididos en 4 grupos. Al primer grupo de ratones machos simulados, se les practicará una incisión quirúrgica abdominal simulando la resección de los testículos, el segundo grupo corresponde al de machos castrados a los cuales se le extirparán quirúrgicamente los testículos, el tercer grupo será el de hembras simuladas y el cuarto grupo corresponde al de hembras con ooforectomía bilateral. A todas las jaulas de hembras se les colocará aserrín con orina de macho por tres días para sincronizar su ciclo hormonal. Después de una semana de recuperación de la cirugía, a todos los animales se les anestesiará con vapores de sevoflurano y en una campana de seguridad biológica nivel 3 se les infectará a través de una cánula intratraqueal de acero inoxidable, depositando 250,000 bacterias vivas de la cepa H37Rv suspendidas en 100 microlitros de PBS. Los animales infectados se confinarán en grupos de 10 por caja en un sistema de microaisladores conectados a un sistema de presión negativa y aire filtrado constante [98]. Las bacterias se crecen en medio líquido 7H9 hasta llegar a la fase logarítmica en las que se colectan y preparan para ser contadas y confirmada su viabilidad por citometría de flujo. Grupos de 6 ratones en cada uno de los grupos se sacrificarán en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días, el sacrificio se realiza bajo anestesia por exsanguinación, la sangre se colecta para posteriormente separar el suero, el tórax se abre inmediatamente para exponer los pulmones, el pulmón derecho o izquierdo de 4 animales se perfunde con alcohol etílico absoluto para posteriormente incluirlo en parafina y obtener cortes histológicos, los demás pulmones se extraen y congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Diez animales por grupo se dejan para determinar mortalidad espontánea y construir gráficas de supervivencia. Se realizarán dos experimentos completos independientes. Estudio morfométrico: En los cortes histológicos de cada pulmón y ratón sacrificado se determinará por morfometría automatizada utilizando el equipo Leica Q/Win 500, el área de inflamación intersticial, perivascular y peribronquial, así como el tamaño de los granulomas y el porcentaje de área pulmonar afectado por neumonía. Determinación de carga bacilar: En 4 pulmones congelados por grupo se determinará la carga bacilar después de homogenizarlos con un politrón en tubos falcon estériles que contienen 1ml de PBS/ Tween80 al 0.05%, cinco diluciones de cada homogenizado se siembran por duplicado en cajas de petri que tienen el medio BactoMiddlebrook 7H10 agar enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa. Las cajas se incuban a 37°C con 5% de CO₂. El número de unidades formadoras de colonias se cuenta después de 21 días. Medición de la expresión génica de citocinas por RT-PCR en tiempo real: De los 4 pulmones restantes por cada tiempo de sacrificio y de cada grupo experimental se purificará el RNA total usando el mini-kit RNeasy de Qiagen. Cada pulmón se sumerge en 2ml de medio RPMI-1640 con 0.5mg/ml de colagenasa tipo 2 y se incuba por 1hr a 37°C. Posteriormente el tejido se pasa a través de una malla de 70 micras, empujando el tejido con un pistilo y lavando con el medio. Las células así obtenidas se centrifugan, el sobrenadante se elimina y los glóbulos rojos se eliminan con un buffer de lisis. Después de contar las células, se adicionan 350 microlitros del buffer de lisis tisular por cada 50 millones de células y el RNA se purifica usando el mini-kit RNeasy de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad del RNA se evalúa por espectrofotometría (260/289nm) y en geles de agarosa. La transcripción reversa del RNA se llevará a cabo con 5microgramos de RNA, oligo-dT y el kit Omniscript de Qiagen. El PCR en tiempo real se realizará utilizando el equipo 7500 real-time PCR de Applied Biosystems y el kit SYBR-Green. Se construirán curvas estándar del producto de PCR cuantificado y en diferentes diluciones, así como del control negativo. Los iniciadores (primers) específicos para cada citocina se diseñan con el programa Primer-Express, las secuencias son las siguientes: : gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH): 5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3', 5'-GGAAGCCATGCCAGTGAGC-3'; óxido nítrico sintetasa inducible: 5'-AGCGAGAGCAGGTGGAAG-3', 5'-CATTTCGCTGTCTCCCAA-3'; factor de necrosis tisular alfa: 5'-

TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3', 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'; interferon gama: 5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3', 5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3'; interleucina 4: 5'-CGTCCTCACAGCAACGGAGA-3', 5'-GCAGCTTATCGATGAATCCAGG-3'. Las condiciones del PCR son: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. Las cantidades específicas del RNA mensajero en cada muestra se determinarán de acuerdo a la curva estándar del gen específico correspondiente. El número de copias de RNAm de cada citocina se expresa en relación a un millón de copias del gen constitutivo G3PDH. Todo el trabajo experimental es realizado en conformidad con el comité local de ética en experimentación con animales, el cual se fundamenta en el artículo de la constitución mexicana NOM062-ZOO-1999 sobre reglas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El proyecto ha sido revisado y aprobado por el comité de investigación de animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" con la clave PAT-19-10-12-1. Lugar de Trabajo del Modelo Experimental: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", DF, México. Estudios en pacientes (esta parte se realizara en la Universidad de Rosario Argentina) Grupos de estudio Enfermos. La muestra de pacientes será seleccionada entre enfermos adultos (18 a 60 años). Todos serán pacientes con serología negativa para HIV, y el diagnóstico de TB se realizará sobre la base de criterios clínicos y radiológicos sumado a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en los fluidos biológicos. Todas las muestras se obtendrán antes de la iniciación del tratamiento específico. En todos los pacientes con TB se tendrá en cuenta el grado de compromiso, el cual será clasificado según la extensión y tipo de lesión radiológica en: leve, pacientes con un único lóbulo involucrado sin cavidades visibles; moderado, pacientes con compromiso unilateral de 2 o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, que no excedan un diámetro total de 4 cm; avanzada o severa, enfermedad bilateral con afectación masiva y cavidades múltiples. Con el propósito de analizar potenciales factores de confusión sobre las variables de impacto se tomarán en cuenta datos en relación a edad y sexo como así también a los valores sanguíneos de glucosa, uremia, proteínas totales, antecedentes de alcoholismo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica vinculada al tabaquismo. Todos los pacientes deberán hallarse libres de compromiso directo de la glándula suprarrenal por el bacilo tuberculoso (la Enfermedad de Addison es muy poco frecuente en nuestro medio). La ficha clínica también recogerá información acerca de otras variables vinculadas a la TB como eritrosedimentación, síndrome de impregnación bacilar, frecuencia cardíaca y respiratoria. También se conformará un cuestionario para conocer el estado menstrual de las pacientes (o presencia de menopausia), ingesta de anti-conceptivos. Controles. Este grupo se compondrá de voluntarios sanos similares en sexo y edad, que no registren contactos con pacientes TB, enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos. En buena parte de los casos las muestras de sangre se obtienen de personal de laboratorio. La incorporación de las personas se efectuará una vez que hayan otorgado su libre consentimiento a participar. Todos ellos serán previamente informados de los objetivos del estudio, el cual se ajustará a las normas éticas nacionales e internacionales que regulan la investigación en seres humanos. La identidad de los participantes no será revelada. Cuantificación de citocinas: Los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6 se determinarán en el plasma por enzimo inmunoensayos comerciales (ELISA, R&D o Pharmingen). Cuantificación de hormonas: Las concentraciones en plasma de estradiol (E2), cortisol, DHEA, LH, FSH, progesterona y testosterona se determinarán por enzimo inmunoensayos de competición comerciales (ELISA, DRG Systems, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Análisis estadísticos: El análisis estadístico se efectuará por medio del programa Stata Statistics Package. Se utilizara el método de Kolmogorov-Smirnov para analizar si las variables se distribuyen normalmente, en caso de no hacerlo se aplicarán las transformaciones necesarias. Las variables categóricas se analizarán por las pruebas de χ^2 o probabilidad exacta de Fisher, mientras que se aplicara el análisis de la variancia o la t de Student para las mediciones cuantitativas. Asimismo se empleará el modelo lineal generalizado a efectos de determinar si los factores concurrentes ligados a la condición clínica de los enfermos influyen sobre los diversos parámetros de interés. Dado las variaciones de las hormonas sexuales (LH, FSH, estradiol y progesterona) en función de la presencia o ausencia de menopausia, se pondrá un especial énfasis al análisis por separado de la población femenina en función de este factor. Los estudios de asociación entre los niveles circulantes de hormonas, citocinas y variables clínicas se efectuarán por medio de análisis multivariado. Se utilizará el método de Kaplan y Meier para comparar las curvas de sobrevida en los diferentes grupos de ratones y la prueba de los rangos logarítmicos. Se calcularán los coeficientes de correlación parciales. El significado estadístico será $P < 0.05$.

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

Beneficio: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Tipo de beneficio:

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Manejo de confidencialidad

(0) Comentarios

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto

(0) Comentarios

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Riesgo (s) del estudio

(0) Comentarios

Molestias generadas por el estudio:

NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Complicaciones del procedimiento: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten: NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LA PARTE CLINICA (ESTUDIOS EN PACIENTES) SE REALIZARA EN LA UNIVERSIDAD DE ROSARIO ARGENTINA.

Otro tipo de riesgo:

Consentimiento informado

(0) Comentarios

Hoja de informe al paciente: [CONSENTIMIENTO INFORMADO.pdf](#)

Carta de consentimiento informado: [CONSENTIMIENTO INFORMADO.pdf](#)

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de investigadores: [DECLARACION DE LOS INVESTIGADORES.pdf](#)