



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Ciudad de México a 16 de enero de 2020.

Dr. Gerardo Gamba Ayala
Presidente del CICUAL
Presente

Estimado Dr. Gamba:

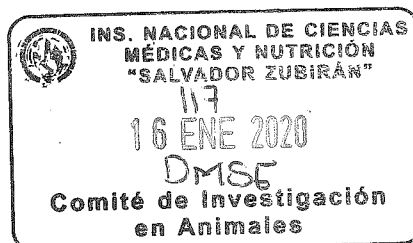
Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: **"Papel de la vasopresina en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar progresiva en un modelo de ratones machos BALB/c"**, con No. de Registro: **PAT-1861-16/20-1**, CINVA **1861** debido a que el protocolo ha concluido. Adjunto al presente productos obtenidos, portada de tesis, acta de examen para obtener grado de Doctor en Ciencias del Med. Mario Alberto Zetter Salmón, artículo publicado y congresos.

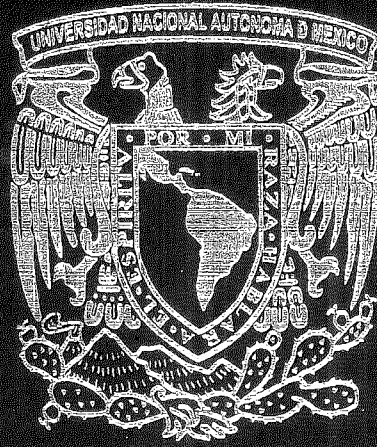
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

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

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

**PAPEL DE LA ARGININA-VASOPRESINA EN LA
INMUNOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS
PULMONAR EXPERIMENTAL.**

T E S I S

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

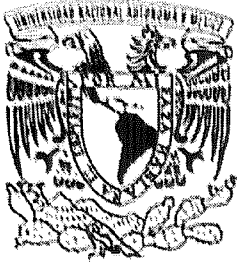
CE

Director de Tesis:
Rogelio Hernández Pando
Facultad de Medicina

Comité tutor
Raúl Mancilla Jiménez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Andrés Quintanar Stephano
Instituto de Neurobiología

Enero del 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

CERTIFICADO DE
EXAMEN

Dr. Rogelio Enrique Valdez Rando, secretario del jurado
que examinó a CE
para optar por el grado de Doctor
en Ciencias
hace constar que obtuvo la calificación de aprobado.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de enero de 2020

EL SECRETARIO DEL JURADO

Rogelio Enrique Valdez Rando

5143012220003

Al cabo de 50 días hábiles posteriores al Examen de Grado, en la página de internet de la Dirección General de Administración Escolar (DGAE) <http://www.escolar.unam.mx>, en el apartado **EGRESO**, seleccione **CONSULTA DE EGRESO** después selecciona **ALUMNOS UNAM** ingrese número de cuenta y NIP con el que ingresaba a SAEP, usted podrá dar seguimiento al trámite y le indicarán la fecha de emisión de su Grado, deberá presentarse en Tramitel para revisar y recibir su Título.
El edificio de la DGAE (tramitel), se encuentra ubicada en el Circuito de la Investigación Científica S/N (Entre el Metro Universidad y la Guardería del CENDI).



Involvement of Vasopressin in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: A New Therapeutic Target?

Mario Zetter¹, Jorge Barrios-Payán¹, Dulce Mata-Espinosa¹, Brenda Marquina-Castillo¹, Andrés Quintanar-Stephano² and Rogelio Hernández-Pando^{1*}

¹ Experimental Pathology Section, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ² Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

David Vaudry,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
(INSERM), France

Reviewed by:

Selvakumar Subblan,
Public Health Research Institute
(PHRI), United States
Gábor B. Makara,
Hungarian Academy of Sciences
(MTA), Hungary

*Correspondence:

Rogelio Hernández-Pando
rhzpando@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 27 February 2019

Accepted: 16 May 2019

Published: 06 June 2019

Citation:

Zetter M, Barrios-Payán J,
Mata-Espinosa D,
Marquina-Castillo B,
Quintanar-Stephano A and
Hernández-Pando R (2019)
Involvement of Vasopressin in the
Pathogenesis of Pulmonary
Tuberculosis: A New Therapeutic
Target? *Front. Endocrinol.* 10:351.
doi: 10.3389/fendo.2019.00351

Tuberculosis (TB) is a highly complex infectious disease caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). It is characterized by chronic granulomatous inflammation of the lung and systemic immune-neuroendocrine responses that have been associated with pathophysiology and disease outcome. Vasopressin (VP), a neurohypophysial hormone with immunomodulatory effects, is abnormally high in plasma of some patients with pulmonary TB, and is apparently produced ectopically. In this study, a BALB/c mouse model of progressive pulmonary TB was used to determine whether VP may play a role in TB pathophysiology. Our results show that VP gene is expressed in the lung since early infection, increasing as the infection progressed, and localized mainly in macrophages, which are key cells in mycobacterial elimination. Pharmacologic manipulation using agonist and antagonist compounds showed that high and sustained stimulation of VPR resulted in increased bacillary burdens and fibrosis at lungs, while blockade of VP receptors reduced bacterial loads. Accordingly, treatment of infected alveolar macrophages with VP in cell cultures resulted in high numbers of intracellular Mtb and impaired cytokine production. Thus, we show that VP is ectopically produced in the tuberculous lungs, with macrophages being its most possible target cell. Further, it seems that chronic vasopressinergic stimulation during active late disease causes anti-inflammatory and tissue reparative effects, which could be deleterious while its pharmacologic suppression reactivates protective immunity and contributes to shorten conventional chemotherapy, which could be a new possible form of immune-endocrine therapy.

Keywords: vasopressin, lung, tuberculosis, immunopathology, fibrosis, therapy

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death by a single infectious agent worldwide (1). It is caused by the intracellular bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that affects the lungs mainly and is characterized by chronic and excessive inflammation, in which innate and adaptive immune responses are profoundly affected (2, 3). Infection starts through inhalation of saliva droplets with

mycobacteria that reaches alveoli and is then engulfed by alveolar macrophages. Macrophages are key cells in bacilli elimination through different mechanisms (3). Nevertheless, Mtb has evolved several mechanisms to avoid immune responses, and eventually, phagocytic cells become incapable of bacilli clearance (4). Mycobacterial antigens are then processed by dendritic cells and presented to T lymphocytes in regional lymph nodes, and so, a type IV (delayed) hypersensitivity response is generated. Lymphocytes migrate to the lung and, together with fibroblasts, surround infected macrophages and form containment structures known as granulomas, which are the histopathological hallmark of TB (5). Thus, complex interactions between bacterium and host cells occur, determining the outcome of infection. In early stages of active infection, Th1 cellular immune responses are protective, as interferon gamma (IFN γ) and interleukin 12 (IL-12) induce macrophage activation, allowing bacterial growth control; nevertheless, during late active disease, extensive inflammation leads to a shift toward a Th-2 immune response in which IL-4, IL-10, and transforming growth factor- β (TGF- β) induce a local anti-inflammatory and immunosuppressive milieu resulting in poor containment of infection and progression of tissue damage, necrosis, and fibrosis, driving host to death (6). Besides these immunologic features, an intense neuroendocrine response during pulmonary mycobacterial infection creates a complex network of cytokines, hormones, and neurotransmitters that contribute to the outcome of TB pathogenesis (7, 8).

During pulmonary TB, different hormonal and neuroendocrine pathways are dysregulated, modifying the immune response to Mtb and influencing the outcome of infection. Neuroendocrine dysfunction and hormonal resistance have been found during human and experimental pulmonary TB (9). Further, the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis seems to be chronically activated, a situation that worsens immunopathology, allowing disease progression (10). The hypothalamus is indeed a central anatomical area in which neuroimmune responses are integrated. Frequently, it is also affected by peripheral inflammation, and noteworthy, after intense inflammatory stress such as caused by Mtb.

The inappropriate production of VP during TB has been extensively reported; in fact, evidence of altered water metabolism was observed more than half a century ago (11). Furthermore, an "antidiuretic principle" was found in lungs of patients with active pulmonary TB that appears to be independent from the hypothalamus (12, 13), suggesting a direct involvement of the vasopressinergic system (VS) in the pathophysiology of TB.

Vasopressin (VP) is a well-evolutionary-conserved cyclic peptide conformed by nine amino acid residues, produced physiologically in parvocellular and magnocellular neurons in the paraventricular and supraoptic nucleus of the hypothalamus. It is synthesized as a long precursor molecule (Neurophysin II-VP-copeptin) (14), which is cleaved by endoproteases and released to median eminence and general circulatory system as a response of different central and peripheral stressors including hypovolemia, hyperosmolarity, and dehydration (15–18). Furthermore,

it has been shown that a VP is released as a response to peripheral inflammation (19, 20) and that this response could result deleterious in different immune-mediated diseases. VP exerts biological effects via at least three G-protein-coupled receptors named V1a, V1b, and V2, which are ubiquitously distributed (21).

Immune modulatory effects of VP are required early during monocyte/lymphoid ontogeny, and it is necessary to homeostatic lymphoid and myeloid development, as seemed in VP-deficient rats (Brattleboro strain), which present subtle but basal immunodeficiency, particularly in macrophage function (22, 23). In the context of inflammatory challenges, vasopressinergic activity is required during early and late stages, as VP coactivates the HPA axis among corticotrophin-releasing factors (CRFs), inducing cortisol production (24, 25). Conversely, in chronic inflammation, VP appears to be the main cortisol secretagogue (26, 27). Besides, in endothelial cells, VP regulates the expression of chemokines responsible for leukocyte migration and modulates the production of inflammatory cytokines by fibroblasts and macrophages (28–30). Adaptive immunity is also influenced by VP as it replaces IL-2 requirement of T lymphocytes for cytokine production and acts like a mitogen (31–33). Basal vasopressinergic tone is required for antibody production while it down-regulates the expression of B cell receptor (34, 35). Immunomodulatory effects of VP are dose and time dependent and differ between organs and tissues. In the urinary tract, vasopressinergic activity results in an epithelial milieu that impairs immune response against pathogenic bacteria (36). Further, in lungs, it has been reported that VP inhibits the translocation of nuclear factor kappa B (NF- κ B), resulting in a decreased IL-6 production and reduced pulmonary inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) (37). VP is a pleiotropic molecule that participates in the maintenance of homeostasis, but also seems to contribute to the establishment of certain diseases characterized by excessive inflammation and tissue remodeling such as cancer and autoimmunity and probably in chronic infections like TB. Nevertheless, this last point has not been studied in detail.

Thus, the aim of this study was to determine the role of the VS in Mtb infection. Using a model of progressive pulmonary TB in BALB/c mice, the kinetics of gene expression and production of VP in the lungs during mycobacterial infection was determined. To study the VP contribution in the pathogenesis of the disease, infected mice were treated with VP agonist and antagonist during the early and late phase of the disease and cell culture bacterial killing assays were made.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statements

All the animal work was done according to the guidelines of the Mexican law NOM 061-Z00-1999 and approved by the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition in México (Protocol number PAT-1861-16/20).



13th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2019)

April 8-11
2019
Ein Gedi resort
the Dead Sea,
Israel

Certificate of Participation

We hereby confirm the participation of

CE

in the WCNH Conference , which took place at the Ein Gedi Hotel, in Kibbutz Ein Gedi, on April the 8th-11th , 2019.

We thank you for attending the conference.



XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

Latin American Immunologists Fighting Disease
May 14 -18, 2018

Certificate

This is to confirm that

CE

Marquina-Castillo Brenda, Mata-Espinosa Dulce, Barrios-Payan Jorge A, Quintanar-Stephano Andrés, Hernández Pando Rogelio

Delivered the Poster presentation:

The contribution of Vasopressin to pulmonary Tuberculosis Immunopathology

**XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI
XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI**

May 14 -18, 2018

Cancún, Quintana Roo


Dr. Leopoldo Santos Argumedo
ALAI President


Dr. Humberto Lanz
ALAI Secretary


Dr. Rosana Pelayo
SMI President


Dr. Gustavo Pedraza
SMI Secretary

Contribution of vasopressin to pulmonary tuberculosis immunopathology

Mario Zetter-Salmón¹, Brenda B. Marquina¹, Dulce A. Mata¹, Jorge A. Barrios-Payan¹, Andres Quintanar-Stephano² and Rogelio H. Pando^{1*}

¹ Experimental pathology section, department of pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico

² Departamento de Fisiología y farmacología, centro de ciencias básicas, Autonomous University of Aguascalientes, Mexico

Tuberculosis (TB), the highly prevalent human disease caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) threatens homeostasis at different levels, and besides its immunopathogenic hallmark, alterations in several hormones accompany and alters the course of infection. Thus, these endocrine changes have also an effect over innate and adaptive immune responses and, consequently, with the progression and fate of the disease. In this way, vasopressin (Avp) or antidiuretic hormone, an evolutionary well-conserved and stress-related nonapeptide produced mainly by hypothalamic neurons, is responsible of supporting some physiological phenomena related to inflammatory processes, like early changes in vascular permeability, macrophage activation and lymphocyte function, has also a role in tissue healing and has been related with inflammatory and autoimmune pathogenic processes. Moreover, vasopressinergic activity appears to be dysfunctional during human pulmonary TB.

The objective of this investigation is to determine whether Avp has a role in the pathogenesis of tuberculosis, using an experimental model of progressive pulmonary TB. Our results shown positive immunostaining to Avp in lung, particularly in macrophages with foamy morphology during the late phase of disease. Apparently these pulmonary macrophages are a source of the hormone. To study the possible contribution of this findings in pathogenesis, vasopressinergic activity was pharmacologically blocked during late stage of mice infection which resulted in less bacillary loads in lung of infected mice. Conversely, when a synthetic agonist was administered, more lung bacilli and fibrosis were noted.

Together, these results suggest that Avp could have an immunosuppressive/anti-inflammatory and profibrotic effect during late active TB. The specific effect of how Avp interferes with immune mechanisms, such as antigenic presentation and phagocytic capacity of macrophages as well as in adaptive immune function is currently under research. Additionally, the pharmacological manipulation of vasopressin-receptor system could represent a new endocrine-immunotherapeutic strategy in infectious and inflammatory chronic diseases, particularly in TB, and blocking Avp could contribute to shorten the long antibiotic treatment. This interesting issue is also currently under research.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;53:77–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.11.002>
2. Quintanar A, Campos-rodr R. Vasopressin and Immune Function. 2011;1:143–56.
3. Berezi I, Quintanar-Stephano A, Kovacs K. Neuroimmune regulation in immunocompetence, <https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmissionViewDetails.aspx?stage=100&articleid=359052&submissionid=371039>

Presentación de Poster, 22° Simposium Internacional de Péptidos Reguladores, Sociedad Internacional de Péptidos reguladores, Acapulco, 2018



RegPep2018

Biennial Meeting

22nd International Symposium on Regulatory Peptides
Acapulco Diamante, September 22-25, 2018

Certificate

recognizing

CE

for Poster Presentation, Ocean Exhibition Room at the Princess Mundo, Imperial Conference Center, Monday September 24, at RegPep2018 in Acapulco Diamante, Mexico, September 22-25, 2018

Lee E. Eiden

Limei Zhang

Co-Chairs *RegPep2018*





XXII CONGRESO NACIONAL DE INMUNOLOGÍA 2016

“International Meeting - New Trends in Immunology”

“40^o aniversario de la

Sociedad Mexicana de Inmunología”

Zacatecas, Zacatecas.

19-23 de abril de 2016.

A-L3

EL PAPEL INMUNOPATOGENICO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACION DE LOS MACROFAGOS (MIF) EN EL DESARROLLO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EXPERIMENTAL.

Autores

CE

1, 2, J Barrios-Payán 1, B Marquina 1, D Mata-Espinosa 1, R Hernández-Pando 1
1 Sección de patología experimental, departamento de anatomía patológica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Tlalpan, Ciudad de México.
2 Estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria crónica en la que han sido descritas diversas alteraciones neuroinmunoendócrinas; el balance entre la actividad del sistema inmune innato y la producción de citocinas proinflamatorias permiten el control de la enfermedad; durante la fase crónica, la producción de citocinas antiinflamatorias y de glucocorticoides, promueven la inmunosupresión permitiendo la progresión de la enfermedad. MIF, una citocina pleiotrópica con propiedades enzimáticas, neuroendócrinas e inmunorreguladoras ha sido relacionada con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas como la tuberculosis en donde se ha asociado con susceptibilidad a la enfermedad.

Objetivo

Analizar la participación de MIF como neuroinmunomodulador durante la tuberculosis pulmonar experimental.

Materiales y Métodos

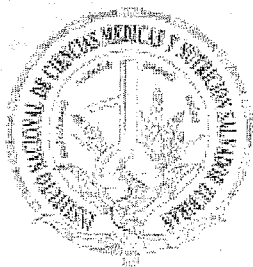
Ratones de la cepa Balb/c(WT) y ratones KO para MIF (-/-) fueron infectados con 250'000 UFC's de Mtb de la cepa H37Rv, se obtuvieron especímenes histológicos de la cinética de infección para análisis de biología molecular, histología y microbiología.

Resultados

En ratones MIF(-/-) se observa aumento en la carga bacilar en comparación con animales WT, sin embargo, el tamaño de granulomas y el infiltrado perivascular es menor. La transcripción del gen MIF en hipotálamo se observa aumentada durante la fase temprana de la enfermedad declinando durante la fase progresiva. En el pulmón, la inmunohistoquímica durante la fase crónica muestra presencia de MIF en granulomas.

Conclusiones

La producción hipotalámica de MIF se asocia con el control de la carga bacilar; durante la fase crónica, la producción pulmonar interviene en la formación de granulomas y el control de la enfermedad.



ACUSE

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 13 de Febrero de 2017.

Dr. ROGELIO ENRIQUE HERNANDEZ PANDO
INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
AV. VÁSICO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
MÉXICO, D.F., C.P. 14080
PRESENTE

Por este medio, nos permitimos informarle que La Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y dictaminado como **APROBADO** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN UN MODELO DE RATONES MACHOS BALB/c.

Con clave de protocolo **PAT-1861-16/20-1**

La vigencia de la aprobación termina el día **13-04-2020**. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

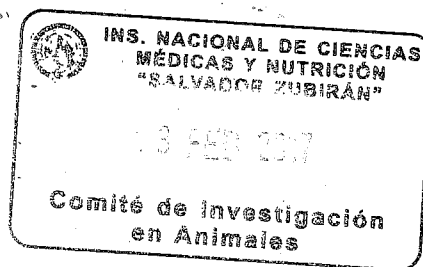
Comentarios:
Se autoriza el uso de 354 ratones machos BALB/c

Sin más por el momento quedamos de usted.

ATENTAMENTE,


DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
COORDINADORA DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

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



INVEST. EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

13 FEB 2017

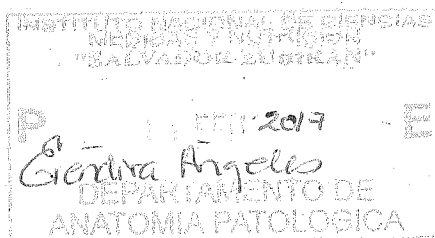
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS Y NUTRUCIÓN INCOMYN "S.Z."

1260

Recibi Original

Alexis

13-02-2017





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 25 de enero del 2017.

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

Protocolo CINVA: PAT-1861-16/20-1, "Papel de la vasopresina en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar progresiva en un modelo de ratones machos BALB/c."

Agradezco las correcciones realizadas a la presente propuesta, todas fueron atendidas para la mejoría de éste protocolo.

Las correcciones y respuestas a sus cuestionamientos se enlistan enseguida:

- a) En el formato del FAEP han sido incluidos los dos nombres de los investigadores principales: Dra. Brenda Noemí Marquina Castillo y Dra. Dulce Mata espinosa, encargadas de área de biología molecular y microbiología, respectivamente.
- b) Las hojas invertidas en el formato FAEP fue un error al escanear las mismas, ha sido corregido.
- c) En el punto 11 ha sido agregado el volumen de inoculación de solución salina conteniendo la carga bacteriana de infección; es decir, 100 μ L de solución salina fisiológica (0.9%)
- d) Se agregó, de igual forma, el volumen en el cual estarán diluidos los fármacos agonistas y antagonistas de vasopresina, el cual será de 100 μ L de agua inyectable.
- e) El formato de punto final humanitario ha sido anexado al documento.

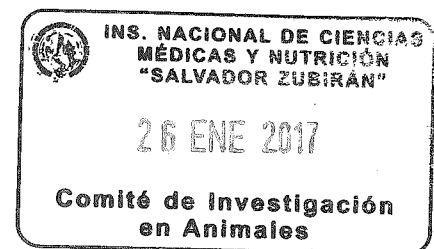
Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

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

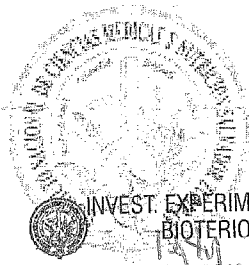
c.c.p. MVZ. Mariela Contreras Escamilla. Jefa del DIEB
c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala. Director de Investigación

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



ACUSE

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

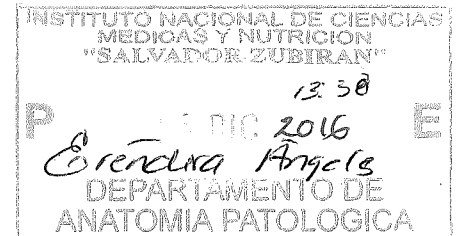


INVEST. EXPERIMENTAL Y BIOTERIO
15 DIC 2016
143
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

Ciudad de México, a 14 de Diciembre de 2016.

Dr. ROGELIO ENRIQUE HERNANDEZ PANDO
INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
AV. VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
MÉXICO, D.F., C.P. 14080
PRESENTE



Por este medio, nos permitimos informarle que La Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y dictaminado como **PENDIENTE** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN UN MODELO DE RATONES MACHOS BALB/c.

Con clave de protocolo **PAT-1861-16/20-1**

La Comisión decidió dejar pendiente la aprobación del proyecto hasta que se resuelvan los cuestionamientos siguientes:

Los investigadores respondieron adecuadamente a las inquietudes de esta Comisión.

Solo en el FAEP no se incluyeron los nombres de dos de los investigadores participantes.

La forma del FAEP contiene hojas invertidas

En el punto 11, tabla de procedimientos, mencionan que el agente infeccioso se inoculará en 10 mL de solución salina por vía intratraqueal, esto debe ser un error.

También falta el volumen de agua inyectable que se utilizará para DdAVP, Conivaptan y Tolvaptan.

En el punto K de la respuesta mencionan que anexan un formato de punto final humanitario adecuado a su línea de investigación; sin embargo, dicho anexo no pudo localizar dicho anexo.

En base a los puntos anteriores se solicita corregir cada uno de ellos y una vez que sean efectuados se emitirá la Carta de Aprobación con la autorización del uso de 778 ratones BALB/c machos.

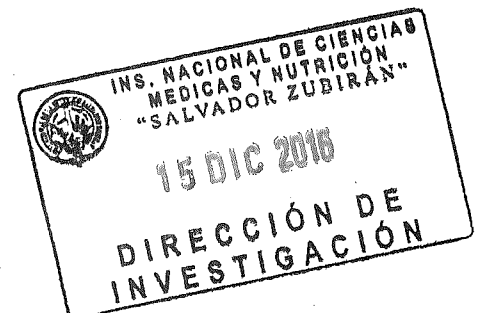
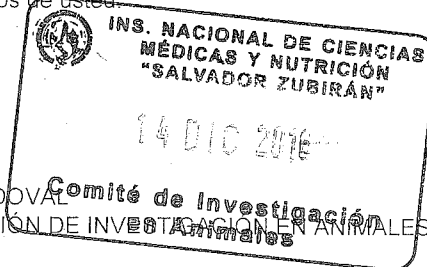
Cuando decida emitir la re-evaluación de este proyecto será necesario subir el sistema SERPI: la respuesta a cada punto de las observaciones hechas por el comité y las correcciones respectivas en el FAEP y en el proyecto en extenso. También se deberán entregar los nuevos documentos impresos a la Srita. Nayelli Ortega

Así mismo le recordamos que las modificaciones deben ser sobre este protocolo, no debe crear uno nuevo. Este lo encontrará como pendiente y podrá agregar los nuevos archivos en la sección Ver Detalles y volver a generar la forma única.

Sin más por el momento quedamos de usted.

ATENTAMENTE,

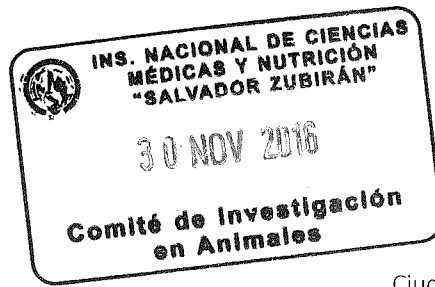

DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
COORDINADORA DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES



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



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



Ciudad de México, a 28 de noviembre de 2016

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales.
Presente.

Protocolo CINVA PAT-1861-16/20-1, "Papel de la vasopresina en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar progresiva en un modelo de ratones machos BALB/c". Segunda revisión.

Muchas gracias por las observaciones hechas al presente protocolo, todas las sugerencias enriquecen este trabajo y fueron atendidas en la medida de lo posible.

Las correcciones y respuestas a sus cuestionamientos se enlistan enseguida:

- a) **Objetivos:** En los objetivos se menciona que estudiarán tres tejidos y en la metodología incluye cerebro y timo, se requiere conciliar esta información.

Con respecto a los objetivos mencionados en el protocolo y su discrepancia con la descripción metodológica, se ha conciliado dicha información en el protocolo en extenso y el FAEP, se estudiarán cerebro, pulmones, timo, hígado, bazo y adrenales.

- b) **Falta describir cómo van a estudiar el patrón de expresión de los receptores de la vasopresina.**
La descripción acerca de la metodología para estudiar el patrón de expresión de los receptores se encontraba en conjunto con la descripción de la expresión del gen de la vasopresina, hemos separado ambas metodologías y completado la información solicitada. El patrón de expresión de dichos receptores será estudiado a través de: a) la cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real y b) por inmunohistoquímica para la determinación y análisis de la expresión de la proteína (receptor)
- c) **La clasificación del proyecto es errónea, el investigador marcó la opción C y debería ser al menos la categoría D.**
Como se menciona en la hoja de cuestionamientos, el protocolo estaba clasificado de manera incorrecta. La clasificación de acuerdo a los procedimientos a realizar (infección, tratamiento, eutanasia) así como el padecimiento de la enfermedad durante el tiempo del experimento es en la categoría D, ya ha sido corregido en el formato de FAEP.
- d) **En la página 12 del protocolo en extenso se menciona que la administración intratraqueal de Desmopresina será diario durante 7 días previos a la infección; sin embargo en el FAEP dice intratraqueal cada 3 días.**
En relación a la corrección acerca de la discrepancia en las dosis de desmopresina de la página 12 del protocolo en extenso (la cual, por las modificaciones realizadas ha quedado en la página 14 de dicho escrito): La administración intratraqueal de desmopresina (DdAVP) será 1 vez al día a una dosis de 2mg/Kg diluido en 100 uL agua inyectable desde siete días previos a la infección y durante los primeros 14 días de la enfermedad en el grupo 1 (DdAVP fase temprana) y diario a la misma dosis a partir del día 28 postinfección (DdAVP fase progresiva). Se ha corregido la discrepancia en ambos, el protocolo en extenso y el FAEP.



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

- e) En la tabla del punto 9 del FAEP, en el apartado de agentes biológicos debe especificar el tipo de agente biológico a administrar así como la frecuencia. Lo mismo para los fármacos bloqueadores de los receptores de vasopresina.

La tabla del punto 9 del FAEP (versión nueva, punto 11) ha sido corregida y se han agregado los requisitos solicitados acerca de la dosis de agentes biológicos, la dosis y frecuencia de los fármacos a administrar, así como la cantidad y la vía de administración.

- f) En el punto 3 del FAEP el investigador debe ser más explícito en lo referente a los procedimientos a realizar en los animales.

Con respecto a ésta observación (encontrada en el punto 5 de la versión actualizada del FAEP), se ha corregido y se han detallado explícitamente los procedimientos a realizar con los animales, también se ha justificado la importancia del experimento, se describió el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva y los procedimientos de infección, tratamiento y disposición de cadáveres.

- g) En el punto 10 del FAEP se deben describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación de toma de muestra.

En el punto 10 del FAEP (punto 12, versión actualizada) se han descrito los siguientes procedimientos a realizar con los animales: infección, administración farmacológica y eutanasia; el número de animales que había sido anotado en este punto ha sido aclarado en el inciso (h).

- h) Hay discrepancia entre el número de animales solicitados en el FAEP y en el proyecto en extenso. El número de animales ha sido corregido, dado que sólo se administrarán tres fármacos: desmopresina, Conivaptan y Tolvaptan el número de animales se redujo; sin embargo, el número de ratones que se solicita para cada grupo experimental aumentó en algunos casos en el siguiente número y la justificación puede encontrarse en el protocolo en extenso y en el FAEP.

Condición.	Número de ratones
Experimento.	354
Repetición.	354
Total para 2 experimentos.	708
Total + 10% aproximadamente.	778

- i) En el apartado 10 de FAEP, subtítulo por el investigador como "Microbiológica", se mencionan grupos experimentales a los previamente expuestos que consistían en agonistas y antagonistas de los receptores a vasopresina.

En el apartado 10 del FAEP hubo un error al transcribir la información puesto que los grupos experimentales del presente no incluyen el tratamiento con antibióticos. La discrepancia en el número de ratones a utilizar ha sido también corregida. Agradezco su observación.



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

- j) En el punto 11 del FAEP les falta agregar el pentobarbital con la dosis correspondiente que se utilizará para el sacrificio. No se menciona si el bazo, suprarrenales e hígado de los 9 animales se van a ocupar.

La dosis de pentobarbital fue agregada en el punto 11 (13 nueva versión del FAEP). Los tejidos a tomar y el número de ratones se han justificado anteriormente en el inciso (h).

11. Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.				
Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Sedación	Pentobarbital	210 mg/Kg peso	Intraperitoneal	Una vez, en la eutanasia.
Anestésico	Sevoflurano	100 µl	Inhalada	Una vez por cada administración intratraqueal

- k) Falta mencionar con qué periodicidad se observarán a los animales para determinar el punto final humanitario.

Los animales se observarán una vez al día donde se evaluarán las características propias de la progresión de la enfermedad, de la misma forma se determinará el punto final humanitario cuando los ratones cumplan los puntos redactados en el FAEP.

La combinación de estos criterios nos ayudaran a establecer el nivel de deterioro del grupo/animal, pudiendo identificar rápidamente cual animal debe ser retirado del experimento por punto final humanitario. Además se llevará registro de la condición general de cada grupo/animal utilizando un formato de punto final humanitario al cual se le han hecho algunas modificaciones que lo hacen más adecuado para nuestra línea de investigación (Archivo Anexo 1).

- l) Es importante NO alterar el machote del FAEP, con la finalidad de que se agilice la identificación de los puntos de revisión.

Entendemos la importancia de no modificar el formato del FAEP, la razón para la modificación fue que al escribir y transcribir al formato resumido, la numeración cambiaba al agregar texto y se volvía confuso, sin embargo hemos solucionado dicha observación, la numeración se mantiene como la original del FAEP.

- m) En el punto 18 del FAEP debe mencionar que los cadáveres se someterán al ciclo de esterilización y que el destino final será la incineración de los mismos.

Los cadáveres serán sometidos a ciclos de esterilización, en el protocolo resumido del FAEP se describe en el punto 18.

- n) e) La justificación del número de ratones descrita previamente y la discrepancia entre el extenso y el resumen FAEP fue un error durante la redacción.

Punto repetido, aclarado en el inciso h).



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

- o) Para la eutanasia se usará pentobarbital y exanguinación. Sería bueno aclarar que posteriormente se asegurará con dislocación cervical.
Durante el proceso de eutanasia además del uso de pentobarbital y de exanguinación a los ratones se procederá a realizar dislocación cervical, agradecemos la observación sobre dicho procedimiento el cual ha sido anotado, como lo sugieren, en el FAEP y en el protocolo en extenso; agradezco su observación.
- p) En el punto 11 del FAEP les falta agregar el pentobarbital con la dosis correspondiente que se utilizará para el sacrificio.
Se ha agregado la dosis de pentobarbital utilizada para los sacrificios.
- q) En el punto 18 del FAEP debe mencionar que los cadáveres se someterán al ciclo de esterilización y que el destino final será la incineración de los mismos.
Punto repetido, aclarado en el inciso j).
- r) No se incluyó el análisis estadístico.
El análisis estadístico se ha incluido; los datos obtenidos serán agrupados acorde a cada objetivo, el tratamiento de cada parámetro se hará a través del análisis de varianza ANOVA de 2 vías y factor de corrección para comparaciones múltiples por prueba de Bonferroni, utilizando el software Graphpad Prism versión 6.01. Se agregó el párrafo Análisis Estadístico en el FAEP y en el formato protocolo en extenso.

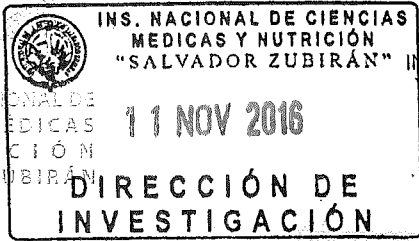
Sin más por el momento, quedo de usted.

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

ACUSE

1105
EXPERIMENTAL
BIOTERIO

11 NOV 2016

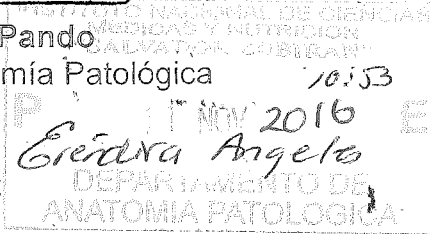


INS. NAL. CIENCIAS MED.
Y NUTRICIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F., a 10 de noviembre de 2016.

Dr. Rogelio Hernández Pando
Depto. Patología y Anatomía Patológica
Presente.



Estimado Dr. Hernández:

REF: CINVA-1861 PAT-1861-16/20-1

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Papel de la vasopresina en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar progresiva en un modelo de ratones machos BALB/c.”

La Comisión decidió dejar **Pendiente la Aprobación** del proyecto hasta que se resuelvan los cuestionamientos siguientes:

- Objetivos: en los objetivos se mencionan que estudiarán tres tejidos y en la metodología incluye además cerebro y timo. Se requiere conciliar esta información.
- Falta describir cómo van a estudiar el patrón de expresión de los receptores de la vasopresina.
- La clasificación del proyecto es errónea. El investigador marcó la opción C; sin embargo, los ratones serán sometidos a procedimientos con angustia y dolor severos, como lo son la inserción de sondas intratraqueales y gástricas con frecuencia, así como la inducción de tuberculosis y el padecimiento de la enfermedad durante periodos de hasta 120 días sin la administración de analgésicos o cuidados paliativos. Debería ser al menos categoría D.
- En la página 12 del protocolo en extenso se menciona que la administración intratraqueal de Desmopresina será diario durante 7 días previos a la infección; sin embargo, en el FAEP dice intratraqueal cada tres días. Aclarar la discrepancia.
- En la tabla del punto 9 del FAEP, en el apartado de agentes biológicos, debe especificar el tipo de agente biológico a administrar, así como la frecuencia. Lo mismo para los fármacos bloqueadores de los receptores de vasopresina; se solicita frecuencia, cantidad y vía.
- En el punto 3 del FAEP el investigador debe ser más explícito en lo referente a los procedimientos a realizar en los animales (modelo experimental, grupos experimentales, sacrificio, disposición de cadáveres, etc).
- En el punto 10 del FAEP se deben describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc. (i.e. infección, tratamientos, eutanasia).
- Hay discrepancia entre el número de animales solicitados en el FAEP y en el proyecto en extenso (920 y 1000, respectivamente).

En el apartado 10 del FAEP, subtitulada por el investigador como “Microbiológica”, se mencionan grupos experimentales diferentes a los previamente expuestos que consistían en agonistas y antagonistas de los receptores a vasopresina, ya que aquí dicen que además de estos usarán grupos

tratados con antibióticos y antibióticos más los tratamientos a evaluar. Además, en este apartado dicen que usarán 10 ratones por cada grupo en lugar de los 9 que habían justificado previamente. Favor de esclarecer este punto.

j) En el punto 11 del FAEP les falta agregar el pentobarbital con la dosis correspondiente que se utilizará para el sacrificio. No se menciona si el bazo, las glándulas suprarrenales y el hígado de los 9 animales se va a ocupar. Para la obtención de los pulmones tampoco se justifican 9 animales, ya que de 5 animales se toma el pulmón derecho para unidades formadoras de colonias, 3 pulmones izquierdos para histología y otros 3 pulmones izquierdos para RT-qPCR, lo que daría 8 animales.

k) Falta mencionar con qué periodicidad se observarán a los animales para determinar el punto final humanitario.

l) Es importante NO alterar el machote del FAEP, con la finalidad de que se agilice la identificación de los puntos a revisión. Esto porque el investigador eliminó los números consecutivos del FAEP.

m) En el punto 18 del FAEP debe mencionar que los cadáveres se someterán al ciclo de esterilización y que el destino final será la incineración de los mismos.

e) Justificar bien el número de animales por grupo y de acuerdo a las muestras que se van a tomar. En el FAEP hablan de 10 ratones por grupo y en el extenso de 9.

n) Los procedimientos están bien descritos en el proyecto en extenso, pero no así en el FAEP.

o) Para la eutanasia se usará pentobarbital y exanguinación. Sería bueno aclarar que posteriormente se asegurará con dislocación cervical.

p) En el punto 11 del FAEP les falta agregar el pentobarbital con la dosis correspondiente que se utilizará para el sacrificio.

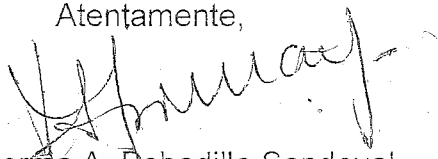
q) En el punto 18 del FAEP debe mencionar que los cadáveres se someterán al ciclo de esterilización y que el destino final será la incineración de los mismos.

r) No se incluyó el análisis estadístico.

Es importante señalar que las correcciones se deben realizar en el FAEP y en el protocolo en extenso, así como, enviar una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité, el FAEP y el protocolo modificado deberán subirse al SERPI y deberá entregarse en forma impresa. Así mismo le recordamos que las modificaciones deben ser sobre este protocolo, no debe crear uno nuevo.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,



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

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA: 1861

FOLIO DE REGISTRO: PAT-1861-16/20-1

Fecha de registro del Protocolo: 25-enero-2017

Título del Protocolo: Papel de la vasopresina en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar progresiva en un modelo de ratones machos BALB/c.

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión 3er revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Rogelio Hernández Pando
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Departamento de Patología y Anatomía Patológica, sección de Patología experimental.
Teléfono	54870900 ext. 2185, 2194 y 7126
Correo electrónico	

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Jorge Alberto Barrios Payán.	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	
Dra. Brenda Noemí Marquina Castillo	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	
Dra. Dulce Adriana Mata Espinoza	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
OE	Facultad de Medicina, UNAM.	Doctor en ciencias biomédicas.	4494962515	



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Describir brevemente las funciones de cada participante:

- Dra. en C. Dulce Adriana Mata Espinosa. Encargada del área de microbiología, cultivo de micobacterias y preparación del inóculo bacteriano para la infección; cultivo de bacterias de tejidos y cuantificación de UFC's y ensayos *in vitro*.
- Dra. en C. Brenda N. Marquina Castillo. Área de biología molecular, extracción de ácidos nucleicos, diseño de oligonucleótidos para análisis por PCR, análisis de transcritos y determinación de proteínas por Western Blot, Inmunohistoquímica, ELISA.
- Dr. en C. Jorge Alberto Barrios Payán. Infección de ratones y aplicación de tratamientos intragástrico e intratraqueal, encargado del Bioterio bioseguridad nivel III, diseño de estrategias de tratamiento.
- Mario Alberto Zetter Salmón. Médico cirujano, estudiante de doctorado en ciencias biomédicas, UNAM. Participación en todos los procesos técnicos y teóricos de los experimentos, así como en la planeación y diseño de protocolo y escritura de tesis doctoral, publicación de artículo en revista científica.

Vigencia del Protocolo.

Fecha estimada de inicio del protocolo	01	12	2016
Fecha tentativa de finalización.	31	01	2020

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Instituciones en donde se realizará el proyecto.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

- 2) En que Institución se llevará a cabo mayoritariamente el proyecto:
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

- 3) Hipótesis del proyecto
La infección pulmonar por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* induce disfunción en la respuesta del sistema vasopresinérgico, dicha disfunción contribuye a la inmunopatología y el establecimiento de la enfermedad activa.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

4) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo general. Demostrar la relación entre la disfunción del sistema vasopresinérgico y la inmunopatogenia de la TB pulmonar progresiva.

Objetivos específicos.

1. Analizar y describir la cinética de producción central y periférica (pulmón) de AVP en el modelo de TB pulmonar progresiva.
2. Estudiar el patrón de expresión de los receptores de vasopresina en cerebro, pulmón, timo, glándula suprarrenal, bazo e hígado.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de vasopresina en el desarrollo de la respuesta inmune en la fase temprana y en la fase progresiva de la TB pulmonar.
4. Estudiar el efecto *In vitro* de la vasopresina sobre macrófagos en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* (producción de citocinas, capacidad fagocítica y bactericida, producción de especies reactivas de oxígeno).

5) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Alrededor del 55% de los sujetos con tuberculosis pulmonar activa desarrollan hiponatremia, probablemente secundaria a secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH) o vasopresina. Existe evidencia que sugiere que la sobreproducción de esta hormona puede tener un origen extrahipotalámico; sin embargo, ésta situación patogénica no se ha demostrado experimentalmente.

El modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c permitirá explorar la relación entre la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y la disfunción vasopresinérgica, así como su asociación con los cambios en el sistema inmune y neuroendocrino, contribuyendo al conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos de la inflamación crónica granulomatosa.

Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.

El modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c de nuestro laboratorio permite el estudio de las interacciones inmunopatogénicas de la enfermedad activa pues representa, en el ratón, lo que sucede en el humano (expresión de citocinas, hormonas, crecimiento bacteriano y de características anatomopatológicas). En dicho modelo de infección, se inoculan a cada ratón por vía intratraqueal la cantidad de 2.5×10^5 micobacterias vivas y virulentas de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para inducir una enfermedad pulmonar activa. En ésta, se ha caracterizado la cinética de producción de citocinas, quimiocinas y hormonas correlacionada con los cambios anatomopatológicos característicos en pulmón distinguiéndose dos etapas en la progresión de la enfermedad: la fase temprana (día 1 a día 28 posinfección), en la que un gran número de células inflamatorias migran al sitio de infección a través de la extravasación por capilares y vénulas, y también a través de su migración a través del epitelio bronquioalveolar. En dicha fase hay engrosamiento de los espacios intersticiales y aproximadamente al día 14 inicia la formación de cúmulos organizados de células inflamatorias representando los granulomas de la enfermedad humana. Predomina la producción de citocinas proinflamatorias



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

(i.e. IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) las cuales promueven una respuesta celular de tipo Th1 cuyos efectos son benéficos para el control de la infección, de hecho, el crecimiento bacteriano en ésta fase se encuentra hasta cierto punto inhibido. A partir de entonces (a partir del día 28 postinfección), y como mecanismo de protección, la producción sostenida de glucocorticoides induce un cambio de la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2, con una gran producción de citocinas como IL-4, IL-10, TGF- β (factor transformador del crecimiento beta); en ésta fase crónica, el sistema inmune no es capaz de contener el crecimiento bacilar permitiendo su diseminación y caracterizándose por un intenso infiltrado leucocitario, áreas de neumonitis y neumonía causando la muerte del animal.

De ésta manera el modelo experimental está constituido por ratones infectados los cuales son seguidos durante la infección realizando eutanasia a grupos de ratones de los cuales se toman muestras de diferentes órganos para analizar los cambios histopatológicos, microbiológicos y moleculares correlacionándolos con la progresión de la enfermedad.

Grupos experimentales.

Para el presente trabajo experimental se plantean los siguientes grupos experimentales.

1. **Animales no infectados.** Este primer grupo, sin tratamiento ni inoculación del agente biológico, servirá como grupo control para caracterizar los niveles séricos normales así como la producción de AVP y la expresión sus receptores, en condiciones fisiológicas. Dichos ratones serán sacrificados a la par de los infectados, en grupos de 6 ratones los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120.
2. **Animales Infectados.** Éste grupo tendrá como objetivo caracterizar la respuesta del sistema vasopresinérgico en condiciones de enfermedad, comparándolo con el grupo control. Estará constituido por grupos de 9 ratones infectados y sacrificados en los días descritos previamente, las muestras que se obtendrán se especificarán más adelante en éste documento.
3. **Animales Infectados tratados con DdAVP.** En éste grupo existirán dos subgrupos experimentales:
 - a.- El primero será tratado con DdAVP durante siete días previos a la infección (día 0), y monitoreado durante la fase temprana realizando sacrificios los días 14, 21, 28, 45, 60 y 120.
 - b.- En el segundo subgrupo los animales serán infectados el día 0 y tratados hasta el día 21, serán sacrificados los días 35, 40, 60, 90 y 120. Se solicitan 9 ratones por tiempo de sacrificio para cada uno de los dos subgrupos experimentales.
4. **Animales Infectados tratados con Conivaptan.** En este grupo los ratones serán tratados a partir del día 1 post-infección y sacrificados los días 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120, se solicitan 9 ratones por tiempo de sacrificio.
5. **Animales Infectados tratados con Tolvaptan.** Este grupo recibirá tratamiento a partir del día 1 post-infección y serán sacrificados los días 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120, se solicitan 9 ratones por tiempo de sacrificio.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

*Se incluye la siguiente tabla tomada de protocolo en extenso.

Caracterización de la respuesta vasopresinérgica en el curso de la Tb pulmonar.					
Grupo	Cepa	Número de ratones.	Tiempos de sacrificio	Subtotal de ratones.	Total de ratones.
Control (sin infección).	No aplica.	6 ratones por tiempo de sacrificio.	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	48	354
Infectados.	H37Rv	9 ratones por tiempo.	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	72	
Desmopresina			14, 21, 28, 45, 60, 90 y 120.	63	
Desmopresina			35, 45, 60, 90, 120.	45	
Conivaptan.			7, 14, 21, 28, 60, 90, 120.	63	
Tolvaptan.			28, 60, 90, 120.	63	

Infección, sacrificio y disposición de cadáveres.

Para el procedimiento de infección, ratones machos de la cepa BALB/c de 3 a 4 semanas de edad y 22-25 gr de peso, serán proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ y anestesiados con vapor de sevoflurano (100 uL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm. Posteriormente, para la inoculación intratraqueal (v.it.) de micobacterias los animales se colocaran sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetaran los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea y se infectara con 250,000 UFC de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, suspendidas en un volumen de 100 µl de buffer de fosfatos salino (PBS). Los animales infectados con micobacterias serán alojados en microaisladores en un sistema de presión positiva/negativa, con aire suministrado a través de filtros HEPA y un cambio de 32 atmosferas/hr. Serán manipulados bajo estrictos protocolos de Bioseguridad Animal Nivel 3. Para la obtención de muestras, se practicará la eutanasia, para lo cual los ratones serán anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (v.ip.) a una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. Todo el material, así como los productos de desecho (que no sean cadáveres) generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán inactivados con Clidox™ por 15min.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

6) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C:	D: X	E:
------------	----	----	----	-------------	----

7) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

La solicitud de 9 ratones por tiempo en los grupos experimentales de infección y de administración farmacológica es la siguiente: Se obtendrán encéfalos, bazo, timo e hígados para el análisis por biología molecular (n=3), cuantificación de carga bacilar (n=3) e inmunohistoquímica (n=3) los cuales por ser órganos impares vuelve necesario el número de animales; el cerebro será dividido en hipotálamo, hipocampo y cerebelo para el análisis por biología molecular. Los pulmones serán utilizados para la determinación de la carga bacilar, extracción de ácidos nucleicos y análisis histológico.



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

- 8)** Describir cómo se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del DIEB, en caso de ser necesario.
No aplica.

- 9)** Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Mus musculus	778	22-25 gr	3 a 4 semanas.	Machos
No. de Grupos experimentales:		6		
No. de animales por grupo:		6 o 9 ratones por tiempo de sacrificio (éste número depende del grupo contemplado).		
No. TOTAL DE ANIMALES:		778 (Contemplando repetición de experimento y pérdidas de animales por enfermedad o tratamiento).		

- 10)** Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
Los animales permanecerán en el DIEB durante toda la cinética de infección del modelo, esto es, 4 meses.

- 11)** Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	En cada día de sacrificio se tomarán las muestras que comprenden: Suero, cerebro, pulmón, timo, bazo, glándula suprarrenal.
Colocación de cánulas y sondas.		X	Cánula de punta roma por vía intratraqueal e intragástrica: Una vez para la infección con el agente <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y una vez al día para el tratamiento con el análogo de vasopresina, desmopresina.
Técnica para observación y modificación de	X		



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

conducta.			
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos:		X	<p>Agente: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de la cepa H37Rv. Cantidad: 100 µl de solución salina conteniendo 2.5x10⁵ UFC's. Vía y frecuencia: intratraqueal, 1 sola vez al inicio del experimento para infectar a los ratones.</p> <p>Agente: Desmopresina (DdAVP). Cantidad: 2mg/Kg diluido en 100 µL de Agua inyectable Vía y frecuencia: Intratraqueal, 1 vez al día, todos los días.</p> <p>Agente: Conivaptan. Cantidad: 1mg/Kg diluido en 100 Agua inyectable µL Vía y frecuencia: Intragástrica, 1 vez al día, todos los días.</p> <p>Agente: Tolvaptan. Cantidad: 1 mg/Kg de peso diluido en 100 µL de agua inyectable Vía y frecuencia: Intragástrica, 1 vez al día.</p>
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Cada grupo de ratones se mantendrá en microaisladores de acrílico conectados a una matriz de ultrafiltración de aire, con alimento y bebida <i>ad libitum</i> . Con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotóxicos.	X		
Otros:			



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- 12) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

INFECCION: Para infectar a los ratones se utilizara una cánula de calibre 22Gx1" y punta roma, el ratón es anestesiado con Sevoflurano (100uL por ratón) dentro de una cámara de 20x20x20cm, una vez anestesiado se sujetará sobre una placa de aluminio utilizando una liga de caucho, sobre los incisivos del animal, se localizará la tráquea apoyándose con el tacto y la cánula, una vez localizada se inyectaran 250,000 UFC de *M. tuberculosis*/100ul de solución salina isotónica (SSI), este procedimiento solo se realizara una vez al inicio del experimento y se hará bajo condiciones de bioseguridad animal nivel III.

Administración farmacológica: Los tratamientos planteados para cada grupo experimental serán administrados de la siguiente manera: los ratones serán anestesiados con sevoflurano y sujetos como se describió previamente. El tratamiento con desmopresina (dDAVP) será por vía intratraqueal, se administrará el fármaco diluido en 100 microlitros de agua inyectable, posterior al tratamiento, cada ratón será colocado nuevamente dentro del microaislador y se mantendrá en observación hasta que se encuentre totalmente recuperado.

Para la administración intragástrica, se sujetara al ratón por la cola y la parte posterior de las orejas para poner el esófago en posición recta y poder deslizar la cánula descrita previamente a través de la garganta y depositar los fármacos directamente en el estómago del ratón. Los fármacos se administrarán diariamente. Las dosis de administración de los fármacos a utilizar se encuentran determinadas de acuerdo a la literatura científica, las dosis utilizadas para este experimento de cada fármaco serán: Desmopresina (2 mg/Kg de peso); Conivaptan (1mg/kg de peso) 1 vez al día; Tolvaptan (1 mg/Kg).

EUTANASIA: Los animales serán inyectados con Pentobarbital 210 mg/kg intraperitoneal (IP). Se sacrificarán por exanguinación y se realizará dislocación cervical para asegurar la muerte del animal, posteriormente se expondrá la cavidad peritoneal de donde colectamos el hígado, bazo y suprarrenales, posteriormente acceder a la cavidad torácica para recolectar los pulmones y el timo, las muestras se colocaran dentro de criotubos de 2 ml. Finalmente, para tomar el encéfalo, se realiza decapitación del cadáver, con tijeras de disección se abre la piel de la parte superior de la bóveda craneana y se disecciona hasta el cráneo, en éste, se corta la región interciliar y se hace un corte en la sutura formada por ambos huesos parietales, después, con pinzas de disección se procede a quitar y separar los huesos del cráneo. El encéfalo será almacenado para la extracción de ácidos nucleicos, análisis microbiológico y para inclusión en parafina.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

13) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Sedación	Pentobarbital	210 mg/Kg peso	Intraperitoneal.	Una vez, en la eutanasia.
Anestésico	Sevoflurano	100 µl	Inhalada	Una vez por cada administración intratraqueal

14) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Relajación muscular, pérdida de reflejo ocular, pérdida de reflejos motores (equilibrio).

15) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

Todo el material, así como los productos de desecho (que no sean cadáveres) generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán inactivados con Clidox™ por 15min. Nuestro grupo de trabajo tiene una amplia experiencia en el manejo, infección y sacrificio de animales para la obtención de muestras, además de contar con las instalaciones necesarias para poder manejar patógenos del Grupo de Riesgo 3 como *M. tuberculosis*.

El material de cama que esté en contacto con los ratones infectados se maneja dentro de gabinetes de flujo laminar con nivel de bioseguridad III, la cama sucia se deposita en bolsas rojas resistentes al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min), marcadas con la leyenda RPBI's. Los cadáveres de los ratones sacrificados durante el desarrollo del protocolo, se colocarán en una bolsa de iguales características, etiquetada con la fecha y número de ratones, para el mismo proceso de esterilización, una vez finalizado el ciclo la bolsa roja se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla marcada con la leyenda "RPBI's", la cual será trasladada al depósito temporal del instituto e incinerado posteriormente por una empresa especializada en el ramo.

16) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad,



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

cambios en comportamiento social... - Respuesta a estímulos externos - Signos clínicos: <ul style="list-style-type: none"> i. Respiración: normal, laboriosa... ii. Temperatura iii. Temblores iv. Convulsiones v. Descarga nasal, salivación 				
Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.				
Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			x	
b) Apariencia			x	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				x
d) Conducta espontánea.		x		
e) Conducta provocada.			x	

17) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Los animales se observarán una vez al día donde se evaluarán las características propias de la progresión de la enfermedad, de la misma forma se determinará el punto final humanitario cuando los ratones cumplan los puntos redactados en el FAEP; esto es:

Los animales se inspeccionarán todos los días de manera individual durante las administraciones farmacológicas. Los signos de deterioro de la enfermedad son muy evidentes y aunque la población de ratones que se maneja es grande, esta se encuentra alojada en microaisladores en grupos de 5 animales por lo que en caso de que algún ratón reúna varios de los siguientes criterios este pueda ser identificado inmediatamente, si se presenta el caso, el ratón será anestesiado con 210 mg/kg por vía intraperitoneal de pentobarbital y sacrificado por exanguinación, los criterios son:

Pérdida de peso, en nuestro modelo se presenta en etapas muy avanzadas de la enfermedad, cuando es severa se presenta de manera muy evidente de acuerdo a nuestra experiencia por lo que no hay necesidad de pesar a los animales, ya que la manipulación requerida para este procedimiento es otro factor estresante.

Apariencia, los animales pueden presentar piloerección desde los primeros días de infección.

Postura, si el animal enferma severamente el lomo del animal se ira encorvando, por lo que este signo también es un criterio para establecer un punto final humanitario.

Frecuencia respiratoria se acelera dado que esta es una enfermedad que afecta al pulmón y genera inflamación, infiltrados, granulomas y en etapas avanzadas neumonía, si esta situación se agrava al grado de no permitir el movimiento del animal, este será sacrificado.

Falta de movimiento del animal, es decir si este se encuentra todo el tiempo en un



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

mismo sitio y es evidente que está perdiendo peso, tiene respiración acelerada y postura encorvada, será sacrificado.

La combinación de estos criterios nos ayudaran a establecer el nivel de deterioro del grupo/animal, pudiendo identificar rápidamente cual animal debe ser retirado del experimento por punto final humanitario. Además se llevará registro de la condición general de cada grupo/animal utilizando un formato de punto final humanitario al cual se le han hecho algunas modificaciones que lo hacen más adecuado para nuestra línea de investigación (Archivo Anexo 1).

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

18) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Se realizará eutanasia por medio de la inyección intraperitoneal de Pentobarbital a dosis de 210 mg/Kg y exanguinación; además, posteriormente se asegurará con dislocación cervical.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

19) ¿El protocolo representa riesgo biológico?

a) No b) Si

Si la repuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.

Todos los métodos y protocolos a seguir en el presente trabajo serán llevados a cabo con un nivel de bioseguridad nivel III (BSL-III).

http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_sect_V.pdf



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- 20) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?
Los cadáveres de los animales sacrificados serán almacenados en bolsas rojas especiales para residuos biológicos y serán sometidos a esterilización; el destino final de dichos cadáveres será la incineración.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Investigador en Ciencias Médicas F
Departamento de Patología y Anatomía Patológica
Unidad de Patología Experimental

Formato para medir los criterios de punto final para la Unidad de Patología Experimental.

Animal/Grupo: _____ Especie: _____ Edad: _____ Sexo: _____

Protocolo: _____

Fecha de inoculación 1 (inmunización/infección): _____ Fecha inoculación 2 (reto): _____

Parámetro		Calificación	Fecha											
Apariencia física	Normal													
	Falta general de acicalamiento													
	Pelo erizado													
	Postura encorvada, pupilas dilatadas													
Peso	Normal													
	Pérdida de peso > 20%													
	Otro:													
Hidratación	Normal													
	Prueba de pellizco de la piel anormal.													
Comportamiento no provocado	Normal													
	Cambios menores													
	Movilidad reducida, asilado pero alerta													
	Otro:													
Respuestas de comportamiento a los estímulos externos	Normal													
	Depresión menor o exageración de la respuesta													
	Reacciones violentas													
	Otro:													
Signos clínicos	Frecuencia respiratoria normal													
	Cambios leves en el ritmo de la respiración													
	Aumento de la frecuencia respiratoria abdominal													
	Cianosis													
*Total (0-18)														

* 0-4 = Notificar al veterinario; 5-9 = Monitorear cuidadosamente; 10-18 = Eutanasia. Calificar en una escala de 0-3, donde 0 es normal y 3 es una alteración severa.

Criterios de punto final:

Adicional a la escala de punto final, los animales deben ser eutanasiados si:

- Piloerección, postura encorvada, adinamia, taquipnea.

Referencias:

- Practical use of distress scoring systems in the application of human endpoints. Pag. 48-53
- Guía para el punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. 2005, 8; 5-12
- IACUC Guideline Humane Intervention and Endpoints for Laboratory Animal Species
- Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook.
- Canadian Council on Animal Care. Guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. 1998.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA: 1861

FOLIO DE REGISTRO: PAT-1861-16/20-1

Fecha de registro del Protocolo: 28-noviembre-2016

Título del Protocolo: Papel de la vasopresina en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar progresiva en un modelo de ratones machos BALB/c.

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.

Nombre del Investigador Titular	Rogelio Hernández Pando
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Departamento de Patología y Anatomía Patológica, sección de Patología experimental.
Teléfono	54870900 ext. 2185, 2194 y 7126
Correo electrónico	Ø

Investigadores que Participaran en el Protocolo

Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Jorge Alberto Barrios Payán.	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	Ø
	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	
	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	

Estudiantes

Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Ø	Facultad de Medicina,	Doctor en ciencias	4494962515	Ø



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

UNAM.	biomédicas.		
-------	-------------	--	--

Describir brevemente las funciones de cada participante:

- Dra. en C. Dulce Adriana Mata Espinosa. Encargada del área de microbiología, cultivo de micobacterias y preparación del inóculo bacteriano para la infección; cultivo de bacterias de tejidos y cuantificación de UFC's y ensayos *in vitro*.
- Dra. en C. Brenda N. Marquina Castillo. Área de biología molecular, extracción de ácidos nucleicos, diseño de oligonucleótidos para análisis por PCR, análisis de transcritos y determinación de proteínas por Inmunohistoquímica, ELISA.
- Dr. en C. Jorge Alberto Barrios Payán. Infección de ratones y aplicación de tratamientos intragástrico e intratraqueal, encargado del Bioterio bioseguridad nivel III, diseño de estrategias de tratamiento.
- Mario Alberto Zetter Salmón. Médico cirujano, estudiante de doctorado en ciencias biomédicas, UNAM. Participación en todos los procesos técnicos y teóricos de los experimentos, así como en la planeación y diseño de protocolo y escritura de tesis doctoral, publicación de artículo en revista científica.

Vigencia del Protocolo.

Fecha estimada de inicio del protocolo	01	12	2016
Fecha tentativa de finalización.	31.	01	2020

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Instituciones en donde se realizará el proyecto.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

- 2) En que Institución se llevará a cabo mayoritariamente el proyecto:
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

- 3) Hipótesis del proyecto
La infección pulmonar por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* induce disfunción en la respuesta del sistema vasopresinérgico, dicha disfunción contribuye a la inmunopatología y el establecimiento de la enfermedad activa.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

4) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo general. Demostrar la relación entre la disfunción del sistema vasopresinérgico y la inmunopatogenia de la TB pulmonar progresiva.

Objetivos específicos.

1. Analizar y describir la cinética de producción central y periférica (pulmón) de AVP en el modelo de TB pulmonar progresiva.
2. Estudiar el patrón de expresión de los receptores de vasopresina en cerebro, pulmón, timo, glándula suprarrenal, bazo e hígado.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de vasopresina en el desarrollo de la respuesta inmune en la fase temprana y en la fase progresiva de la TB pulmonar.
4. Estudiar el efecto *In vitro* de la vasopresina sobre macrófagos en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* (producción de citocinas, capacidad fagocítica y bactericida, producción de especies reactivas de oxígeno).

5) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Alrededor del 55% de los sujetos con tuberculosis pulmonar activa desarrollan hiponatremia, probablemente secundaria a secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH) o vasopresina. Existe evidencia que sugiere que la sobreproducción de esta hormona puede tener un origen extrahipotalámico; sin embargo, ésta situación patogénica no se ha demostrado experimentalmente.

El modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c permitirá explorar la relación entre la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y la disfunción vasopresinérgica, así como su asociación con los cambios en los sistema inmune y neuroendocrino, contribuyendo al conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos de la inflamación crónica granulomatosa.

Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.

El modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c de nuestro laboratorio permite el estudio de las interacciones inmunopatogénicas de la enfermedad activa pues representa, en el ratón, lo que sucede en el humano (expresión de citocinas, hormonas, crecimiento bacteriano y de características anatomopatológicas). En dicho modelo de infección, se inoculan a cada ratón por vía intratraqueal la cantidad de 2.5×10^5 micobacterias vivas y virulentas de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para inducir una enfermedad pulmonar activa. En ésta, se ha caracterizado la cinética de producción de citocinas, quimiocinas y hormonas correlacionada con los cambios anatomopatológicos característicos en pulmón distinguiéndose dos etapas en la progresión de la enfermedad: la fase temprana (día 1 a día 28 posinfección), en la que un gran número de células inflamatorias migran al sitio de infección a través de la extravasación por capilares y vénulas, y también a través de su migración a través del epitelio bronquio-alveolar. En dicha fase hay engrosamiento de los espacios intersticiales y aproximadamente al día 14 inicia la formación de cúmulos organizados de células inflamatorias representando los granulomas de la enfermedad humana. Predomina la producción de citocinas proinflamatorias (i.e. IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) las cuales promueven una respuesta celular de tipo Th1 cuyos efectos son benéficos para el control de la infección, de hecho, el crecimiento bacteriano en ésta fase se encuentra hasta cierto punto inhibido. A partir de entonces (a partir del día 28



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

postinfección), y como mecanismo de protección, la producción sostenida de glucocorticoides induce un cambio de la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2, con una gran producción de citocinas como IL-4, IL-10, TGF- β (factor transformador del crecimiento beta); en ésta fase crónica, el sistema inmune no es capaz de contener el crecimiento bacilar permitiendo su diseminación y caracterizándose por un intenso infiltrado leucocitario, áreas de neumonitis y neumonía causando la muerte del animal.

De ésta manera el modelo experimental está constituido por ratones infectados los cuales son seguidos durante la infección realizando eutanasia a grupos de ratones de los cuales se toman muestras de diferentes órganos para analizar los cambios histopatológicos, microbiológicos y moleculares correlacionándolos con la progresión de la enfermedad.

Grupos experimentales.

Para el presente trabajo experimental se plantean los siguientes grupos experimentales.

1. **Animales no infectados.** Este primer grupo, sin tratamiento ni inoculación del agente biológico, servirá como grupo control para caracterizar los niveles séricos normales así como la producción de AVP y la expresión sus receptores, en condiciones fisiológicas. Dichos ratones serán sacrificados a la par de los infectados, en grupos de 6 ratones los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120.
2. **Animales Infectados.** Éste grupo tendrá como objetivo caracterizar la respuesta del sistema vasopresinérgico en condiciones de enfermedad, comparándolo con el grupo control. Estará constituido por grupos de 9 ratones infectados y sacrificados en los días descritos previamente, las muestras que se obtendrán se especificarán más adelante en éste documento.
3. **Animales Infectados tratados con DdAVP.** En éste grupo existirán dos subgrupos experimentales:
 - a.- El primero será tratado con DdAVP durante siete días previos a la infección (día 0), y monitoreado durante la fase temprana realizando sacrificios los días 14, 21, 28, 45, 60 y 120.
 - b.- En el segundo subgrupo los animales serán infectados el día 0 y tratados hasta el día 21, serán sacrificados los días 35, 40, 60, 90 y 120. Se solicitan 9 ratones por tiempo de sacrificio para cada uno de los dos subgrupos experimentales.
4. **Animales Infectados tratados con Conivaptan.** En este grupo los ratones serán tratados a partir del día 1 post-infección y sacrificados los días 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120, se solicitan 9 ratones por tiempo de sacrificio.
5. **Animales Infectados tratados con Tolvaptan.** Este grupo recibirá tratamiento a partir del día 1 post-infección y serán sacrificados los días 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120, se solicitan 9 ratones por tiempo de sacrificio.

*Se incluye la siguiente tabla tomada de protocolo en extenso.

Grupo	Caracterización de la respuesta vasopresinérgica en el curso de la Tb pulmonar.				
	Cepa	Número de ratones.	Tiempos de sacrificio	Subtotal de ratones.	Total de ratones.
Control (sin infección).	No aplica.	6 ratones por tiempo de sacrificio.	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	48	354
Infectados.			1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	72	



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

	H37Rv	9 ratones por tiempo.			
Desmopresina			14, 21, 28, 45, 60, 90 y 120.	63	
Desmopresina			35, 45, 60, 90, 120.	45	
Conivaptan.			7, 14, 21,	63	
Tolvaptan.			28, 60, 90, 120.	63	

Infección, sacrificio y disposición de cadáveres.

Para el procedimiento de infección, ratones machos de la cepa BALB/c de 3 a 4 semanas de edad y 22-25 gr de peso, serán proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ y anestesiados con vapor de sevoflurano (100 uL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm. Posteriormente, para la inoculación intratraqueal (v.it.) de micobacterias los animales se colocaran sobre una placa de unícel revestida con aluminio y se les sujetaran los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea y se infectara con 250,000 UFC de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, suspendidas en un volumen de 100 µl de buffer de fosfatos salino (PBS). Los animales infectados con micobacterias serán alojados en microaisladores en un sistema de presión positiva/negativa, con aire suministrado a través de filtros HEPA y un cambio de 32 atmosferas/hr. Serán manipulados bajo estrictos protocolos de Bioseguridad Animal Nivel 3. Para la obtención de muestras, se practicará la eutanasia, para lo cual los ratones serán anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (v.ip.) a una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. Todo el material, así como los productos de desecho (que no sean cadáveres) generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán inactivados con Clidox™ por 15min.

6) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucren infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C:	D: X	E:
------------	----	----	----	-------------	----

- 7) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

La solicitud de 9 ratones por tiempo en los grupos experimentales de infección y de administración farmacológica es la siguiente: Se obtendrán encéfalos, bazo, timo e hígados para el análisis por biología molecular (n=3), cuantificación de carga bacilar (n=3) e inmunohistoquímica (n=3) los cuales por ser órganos impares vuelve necesario el número de animales; el cerebro será dividido en hipotálamo, hipocampo y cerebelo para el análisis por biología molecular. Los pulmones serán utilizados para la determinación de la carga bacilar, extracción de ácidos nucleicos y análisis histológico.

- 8) Describir cómo se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del DIEB, en caso de ser necesario.
No aplica.

- 9) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Fondo genético				
Mus musculus	778	22-25 gr	3 a 4 semanas.	Machos
No. de Grupos experimentales:		6		



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

No. de animales por grupo:	6 o 9 ratones por tiempo de sacrificio (éste número depende del grupo contemplado).
No. TOTAL DE ANIMALES:	778 (Contemplando repetición de experimento y pérdidas de animales por enfermedad o tratamiento).

**10) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
Los animales permanecerán en el DIEB durante toda la cinética de infección del modelo, esto es, 4 meses.**

11) Procedimientos que se realizarán con los animales.			
Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	En cada día de sacrificio se tomarán las muestras que comprenden: Suero, cerebro, pulmón, timo, bazo, glándula suprarrenal.
Colocación de cánulas y sondas.		X	Cánula de punta roma por vía Intratraqueal e intragástrica. Una vez para la infección con el agente <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y una vez al día para el tratamiento con el análogo de vasopresina, desmopresina.
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Agente: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de la cepa H37Rv. Cantidad: 10 ml de solución salina conteniendo 2.5×10^5 UFC's. Vía y frecuencia: intratraqueal, 1 sola vez al inicio del experimento para infectar a los ratones. Agente: Desmopresina (DdAVP). Cantidad: 2mg/Kg diluido en 100 de Agua inyectable Vía y frecuencia: Intratraqueal, 1 vez al día, todos los días. Agente: Conivaptan. Cantidad: 1mg/Kg diluido en Agua inyectable Vía y frecuencia: Intragástrica, 1



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

			vez al día, todos los días. Agente: Tolvaptan. Cantidad: 1 mg/Kg de peso diluido en agua inyectable Vía y frecuencia: Intragástrica, 1 vez al día.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Cada grupo de ratones se mantendrá en microaisladores de acrílico conectados a una matriz de ultrafiltración de aire, con alimento y bebida <i>ad libitum</i> . Con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

12) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

INFECCION: Para infectar a los ratones se utilizara una cánula de calibre 22Gx1" y punta roma, el ratón es anestesiado con Sevoflurano (100uL por ratón) dentro de una cámara de 20x20x20cm, una vez anestesiado se sujetará sobre una placa de aluminio utilizando una liga de caucho sobre los incisivos del animal, se localizará la tráquea apoyándose con el tacto y la cánula, una vez localizada se inyectaran 250,000 UFC de *M. tuberculosis*/100ul de solución salina isotónica (SSI), este procedimiento solo se realizara una vez al inicio del experimento y se hará bajo condiciones de bioseguridad animal nivel III.

Administración farmacológica: Los tratamientos planteados para cada grupo experimental serán administrados de la siguiente manera: los ratones serán anestesiados con sevoflurano y sujetados como se describió previamente. El tratamiento con desmopresina (dDAVP) será por vía intratraqueal, se administrará el fármaco diluido en 100 microlitros de agua inyectable, posterior al tratamiento, cada ratón será colocado nuevamente dentro del microaislador y se mantendrá en



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

observación hasta que se encuentre totalmente recuperado.

Para la administración intragástrica, se sujetara al ratón por la cola y la parte posterior de las orejas para poner el esófago en posición recta y poder deslizar la cánula descrita previamente a través de la garganta y depositar los fármacos directamente en el estómago del ratón. Los fármacos se administrarán diariamente. Las dosis de administración de los fármacos a utilizar se encuentran determinadas de acuerdo a la literatura científica, las dosis utilizadas para este experimento de cada fármaco serán: Desmopresina (2 mg/Kg de peso); Conivaptan (1mg/kg de peso) 1 vez al día; Tolvaptan (1 mg/Kg).

EUTANASIA: Los animales serán inyectados con Pentobarbital 210 mg/kg intraperitoneal (IP). Se sacrificarán por exanguinación y se realizará dislocación cervical para asegurar la muerte del animal, posteriormente se expondrá la cavidad peritoneal de donde colectamos el hígado, bazo y suprarrenales, posteriormente acceder a la cavidad torácica para recolectar los pulmones y el timo, las muestras se colocaran dentro de criotubos de 2 ml. Finalmente, para tomar el encéfalo, se realiza decapitación del cadáver, con tijeras de disección se abre la piel de la parte superior de la bóveda craneana y se disecciona hasta el cráneo, en éste, se corta la región interciliar y se hace un corte en la sutura formada por ambos huesos parietales, después, con pinzas de disección se procede a quitar y separar los huesos del cráneo. El encéfalo será almacenado para la extracción de ácidos nucleicos, análisis microbiológico y para inclusión en parafina.

13) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Sedación	Pentobarbital	210 mg/Kg peso	Intraperitoneal	Una vez, en la eutanasia.
Anestésico	Sevoflurano	100 µl	Inhalada	Una vez por cada administración intratraqueal

14) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
Relajación muscular, pérdida de reflejo ocular, pérdida de reflejos motores (equilibrio).

15) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Todo el material, así como los productos de desecho (que no sean cadáveres) generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán inactivados con Clidox™ por 15min. Nuestro grupo de trabajo tiene una amplia experiencia en el manejo, infección y sacrificio de animales para la obtención de muestras, además de contar con las instalaciones necesarias para poder manejar patógenos del Grupo de Riesgo 3 como *M. tuberculosis*.

El material de cama que esté en contacto con los ratones infectados se maneja dentro de gabinetes de flujo laminar con nivel de bioseguridad III, la cama sucia se deposita en bolsas rojas resistentes al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min), marcadas con la leyenda RPBI's. Los cadáveres de los ratones sacrificados durante el desarrollo del protocolo, se colocarán en una bolsa de iguales características, etiquetada con la fecha y número de ratones, para el mismo proceso de esterilización, una vez finalizado el ciclo la bolsa roja se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla marcada con la leyenda "RPBI's", la cual será trasladada al depósito temporal del instituto e incinerado posteriormente por una empresa especializada en el ramo.

16) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos*
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			x	
b) Apariencia			x	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				x
d) Conducta espontánea.		x		
e) Conducta provocada.			x	

17) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Los animales se observarán una vez al día donde se evaluarán las características propias de la progresión de la enfermedad, de la misma forma se determinará el punto final humanitario cuando los ratones cumplan los puntos redactados en el FAEP; esto es:

Los animales se inspeccionarán todos los días de manera individual durante las



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

administraciones farmacológicas. Los signos de deterioro de la enfermedad son muy evidentes y aunque la población de ratones que se maneja es grande, esta se encuentra alojada en microaisladores en grupos de 5 animales por lo que en caso de que algún ratón reúna varios de los siguientes criterios este pueda ser identificado inmediatamente, si se presenta el caso, el ratón será anestesiado con 210 mg/kg por vía intraperitoneal de pentobarbital y sacrificado por exanguinación, los criterios son:

Pérdida de peso, en nuestro modelo se presenta en etapas muy avanzadas de la enfermedad, cuando es severa se presenta de manera muy evidente de acuerdo a nuestra experiencia por lo que no hay necesidad de pesar a los animales, ya que la manipulación requerida para este procedimiento es otro factor estresante.

Apariencia, los animales pueden presentar piloerección desde los primeros días de infección.

Postura, si el animal enferma severamente el lomo del animal se ira encorvando, por lo que este signo también es un criterio para establecer un punto final humanitario.

Frecuencia respiratoria se acelera dado que esta es una enfermedad que afecta al pulmón y genera inflamación, infiltrados, granulomas y en etapas avanzadas neumonía, si esta situación se agrava al grado de no permitir el movimiento del animal, este será sacrificado.

Falta de movimiento del animal, es decir si este se encuentra todo el tiempo en un mismo sitio y es evidente que está perdiendo peso, tiene respiración acelerada y postura encorvada, será sacrificado.

La combinación de estos criterios nos ayudaran a establecer el nivel de deterioro del grupo/animal, pudiendo identificar rápidamente cuál animal debe ser retirado del experimento por punto final humanitario. Además se llevará registro de la condición general de cada grupo/animal utilizando un formato de punto final humanitario al cual se le han hecho algunas modificaciones que lo hacen más adecuado para nuestra línea de investigación (Archivo Anexo 1).

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

18) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Se realizará eutanasia por medio de la inyección intraperitoneal de Pentobarbital a dosis de 210 mg/Kg y exanguinación; además, posteriormente se asegurará con dislocación cervical.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.

Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo* Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

19) ¿El protocolo representa riesgo biológico?

a) No b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.

Todos los métodos y protocolos a seguir en el presente trabajo serán llevados a cabo con un nivel de bioseguridad nivel III (BSL-III).

http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf

20) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

Los cadáveres de los animales sacrificados serán almacenados en bolsas rojas especiales para residuos biológicos y serán sometidos a esterilización; el destino final de dichos cadáveres será la incineración.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

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

PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN UN MODELO DE RATONES MACHOS BALB/c.

Responsable: Dr. Rogelio Hernández Pando

Unidad de adscripción: Sección de Patología Experimental, departamento de Patología y Anatomía Patológica. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Participantes:

- Dra. en C. Dulce Adriana Mata Espinosa. Encargada del área de microbiología, cultivo de micobacterias y preparación del inóculo bacteriano para la infección; cultivo de bacterias de tejidos y cuantificación de UFC's y ensayos *in vitro*.
- Dra. en C. Brenda N. Marquina Castillo. Área de biología molecular, extracción de ácidos nucleicos, diseño de oligonucleótidos para análisis por PCR, análisis de transcritos y determinación de proteínas por Inmunohistoquímica, ELISA.
- Dr. en C. Jorge Alberto Barrios Payán. Infección de ratones y aplicación de tratamientos intragástrico e intratraqueal, encargado del Bioterio bioseguridad nivel III, diseño de estrategias de tratamiento. Mario Alberto Zetter Salmón. Médico cirujano, estudiante de doctorado en ciencias biomédicas, UNAM. Participación en todos los procesos técnicos y teóricos de los experimentos, así como en la planeación y diseño de protocolo y escritura de tesis doctoral, publicación de artículo en revista científica.

Introducción.

La transferencia de señales entre los sistemas inmune y neuroendocrino permite que los organismos mantengan la homeostasis y de ser necesario, que establezcan una serie de respuestas adaptativas hacia los diferentes estímulos nocivos provenientes del medio interno (p.ej. autoantígenos) o del medio externo (microorganismos). Éste diálogo es posible debido a la presencia de un gran número de mediadores solubles y sus receptores (citocinas, quimiocinas, neurohormonas y neuropéptidos), los cuales son compartidos en términos funcionales por estos sistemas, formando un *supersistema* neuroinmunoendocrino(1,2). En condiciones de inflamación, la activación de este sistema es fundamental para la recuperación (carga alostática) del estado de salud. Por el contrario, si la respuesta montada ante un agente agresor es inapropiada, estos mecanismos protectores pueden volverse dañinos y causar enfermedad.

Uno de estos mediadores hormonales es la arginina vasopresina (AVP), un péptido con actividad osmorreguladora y vasoactiva que ejerce un importante efecto inmunomodulador debido a su capacidad dual de estimular la respuesta inmune innata y adaptativa, además de intervenir en el proceso de recuperación de la inmunocompetencia(3). La vasopresina en conjunto con sus receptores constituye el sistema vasopresinérgico, uno de los sistemas de respuesta al stress cuya disfunción se ha asociado a enfermedades de origen infeccioso, autoinmune e inflamatorio crónico(4).

Estructura, síntesis y secreción de AVP.

La AVP es un péptido de 9 aminoácidos con un peso de 1.08 KDa con un residuo terminal de arginina, que lo diferencia estructuralmente de su homólogo oxitocina (OT). Es codificado a partir de un gen localizado en el cromosoma 2 en el ratón y 20 en el humano el cual está constituido por tres exones que transcriben una pre-pro hormona (pre-pro vasopresina) la cual es almacenada dentro de vesículas intracitoplásmicas en los axones de las neuronas magnocelulares y parvocelulares de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo; principalmente. Dentro de estas vesículas, el pre-pro péptido es procesado por endoproteasas que lo dividen en el péptido maduro (8-Arginina-vasopresina), una proteína "acarreadora" (neurofisina II) y un glucopéptido señal, la coceptina. Las vesículas de éstas neuronas, al ser estimuladas, secretan su contenido y la hormona madura, junto con los péptidos acarreadores son liberados en la terminal sináptica hacia la circulación en cantidades equimolares, la neurofisina es degradada por proteasas, la coceptina se mantiene en circulación y la hormona circula y se une a sus diferentes receptores ejerciendo su actividad(5). Existe evidencia de que otros tipos celulares como los linfocitos, timocitos y las células de la corteza suprarrenal pueden producir AVP de manera fisiológica, y, en determinadas condiciones de manera patológica (tumor neuroendocrino (de células pequeñas) de pulmón, enfermedad inflamatoria intestinal), sin embargo, el mecanismo de secreción en estas células no ha sido descrito(6-8).

Receptores y mecanismo de acción.

AVP ejerce sus efectos biológicos a través de al menos tres tipos de receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) denominados genéricamente V1a, V1b (antes V3) y V2, los cuales se encuentran distribuidos ampliamente en diferentes órganos y tejidos entre los que se encuentran el músculo liso, los hepatocitos, macrófagos, linfocitos B y corteza suprarrenal (V1aR); en adenohipófisis, médula suprarrenal, islotes de Langerhans y linfocitos (V1bR); y finalmente, en cerebro, endotelio, pulmón y túbulos colectores del riñón (V2R). (9) Los receptores V1a y V1b desencadenan actividad intracelular a través de la activación de la vía de la fosfolipasa C aumentando la concentración de calcio intracelular (citoplasma) e intranuclear. El receptor V2 al activarse, coactiva a la adenil-ciclase aumentando la concentración del segundo mensajero monofosfato cíclico de Adenosina (AMPc) para ejercer sus efectos intracelulares. Además de estos receptores, la vasopresina puede activar receptores de OT y también se ha descrito que puede producir efectos biológicos a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), sin embargo el mecanismo no se ha dilucidado(10).

Vasopresina y sistema inmune.

Citocinas producidas en los sitios inflamación (p.ej. IL1b, IL-6 y TNF-a) inducen la secreción de AVP por las neuronas del PVN (la activación los receptores de estas citocinas, presentes en las terminaciones nerviosas libres, envía señales excitatorias ascendentes a través del nervio vago alcanzan el tronco encefálico y se proyectan a diferentes regiones del sistema nervioso central como el hipocampo, el núcleo basal de la estría terminal (BNST) y las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo) en donde estas señales estimulan a las neuronas del PVN para la secretar AVP y factor liberador de corticotropina (CRF, *Corticotropin Releasing Factor*) hacia la eminencia media del hipotálamo, en donde a través del sistema porta-hipofisario, llegan a la adenohipófisis(11). En las células corticotropas, AVP y CRF actúan sinérgicamente induciendo la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) cuya función principal es la de estimular la secreción de los glucocorticoides (GC's) cortisona y cortisol por la corteza suprarrenal. Los glucocorticoides (GC's), tienen efectos directos sobre la actividad del sistema inmune: esto es que durante las fases tempranas de la inflamación amplifican la intensidad de la respuesta inmune innata y disminuyen la respuesta adaptativa. Al mismo tiempo, la secreción directa de AVP por la neurohipófisis hacia la circulación general tiene efectos directos sobre macrófagos y linfocitos. La evidencia sugiere que a través del receptor V1a, vasopresina regula la producción de citocinas por parte de los macrófagos, por un mecanismo que involucra al factor nuclear kappa-B (NF-kB)(12). En los linfocitos B, el receptor V1b promueve la maduración de los mismos para la producción de inmunoglobulinas(13). Además la presencia de AVP es necesaria para la respuesta proliferativa de células NK y la generación de respuestas linfocitarias. AVP es un inductor positivo de la producción de interferón gamma (IFN- γ)(14). Además, induce la secreción de prolactina (PRL) por la adenohipófisis, que junto con la hormona del crecimiento (GH) promueve la proliferación de timocitos y su diferenciación a linfocitos T maduros restaurando la inmunocompetencia adaptativa(15). En la inflamación crónica, el aumento en la actividad glucocorticoide inhibe la producción de CRF por un mecanismo de retroalimentación negativo. Se ha propuesto que a largo plazo, AVP tiene efectos antiinflamatorios estimulando la producción de cortisol por la glándula suprarrenal. En algunos órganos como el pulmón, AVP tiene efectos antiinflamatorios a través del receptor V2, además de participar en el aclaramiento del edema pulmonar(16,17).

Existe evidencia que indica que los sujetos con enfermedades inflamatorias e infecciosas crónicas (Lupus eritematoso sistémico, legionelosis, leishmaniosis, neumonía) desarrollan hiponatremia secundaria a secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH), entidad causada por la inadecuada producción de AVP o bien por la inadecuada expresión de sus receptores(4,18). La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades en las que se presenta ésta situación clínica. Alrededor del 55% de los sujetos con enfermedad activa desarrollan hiponatremia secundaria a SIADH la cual mejora con el tratamiento antifímico. Hay algunas publicaciones que sugieren la producción extrahipotálamica de la hormona durante esta enfermedad(19,20).

Interacciones neuroinmunoendocrinas en la tuberculosis.

Actualmente, más de un tercio de la población mundial se encuentra infectada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sin presentar manifestaciones clínicas de enfermedad (tuberculosis latente) y cada año mueren alrededor de 1.5 millones de humanos por la enfermedad activa. Mtb afecta principalmente a los pulmones, sin embargo, la presencia del bacilo produce profundas alteraciones en el sistema inmune y en el sistema endocrino. En éste provoca diversos cambios en la respuesta hormonal al stress, como son el aumento en los niveles de PRL y GH, la disminución en los niveles séricos de dehidroepiandrosterona (DHEA) los cuales tienen efecto sobre el sistema inmune(21). Además, el aumento en la producción de algunas citocinas (p.ej. factor transformante del crecimiento beta (TGF- β)) inhibe la producción de hormonas muy importantes en la respuesta protectora hacia el bacilo como la DHEA, causando de esta forma la perpetuación del estado inflamatorio, permitiéndole al bacilo evadir los mecanismos de protección del huésped, provocando enfermedad. Estas alteraciones se han explorado en humanos y en modelos murinos y existe fuerte evidencia que indica que las alteraciones metabólicas durante la TB son resultado de la disregulación de la respuesta neuroinmunoendocrina(22). En este sentido, es el interés de nuestro grupo de investigación estudiar y comprender los mecanismos que subyacen al desarrollo de la enfermedad integrando las bases patogénicas de la respuesta inmune con la disregulación de los sistemas nervioso y endocrino buscando obtener explicaciones sobre la fisiopatología, para desarrollar posibles estrategias de prevención, diagnóstico y terapéutica de éste importante problema de salud.

Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

El modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c de nuestro laboratorio permite el estudio de las interacciones inmunopatogénicas de la enfermedad activa pues representa en el ratón lo que sucede en el humano (expresión de citocinas, hormonas, crecimiento bacteriano y de características anatomopatológicas). En dicho modelo de infección, se inoculan a cada ratón por vía intratraqueal la cantidad de 2.5×10^5 bacterias de la cepa prototipo de mediana virulencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, induciendo enfermedad pulmonar activa. En ésta, se ha caracterizado la cinética de producción de citocinas, quimiocinas y hormonas correlacionada con los cambios anatomopatológicos característicos en pulmón distinguiéndose dos etapas en la progresión de la enfermedad(23): la fase temprana (día 1 a día 28 posinfección), en la que un gran número de células inflamatorias migran al sitio de infección a través de la extravasación por capilares y vénulas, y también a través de su migración a través del epitelio bronquioalveolar. En dicha fase hay engrosamiento de los espacios intersticiales y aproximadamente al día 14 inicia la formación de cúmulos organizados de células inflamatorias representando

los granulomas de la enfermedad humana. Predomina la producción de citocinas proinflamatorias (i.e. IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) las cuales promueven una respuesta celular de tipo Th1 cuyos efectos son benéficos para el control de la infección, de hecho, el crecimiento bacteriano en ésta fase se encuentra hasta cierto punto inhibido. A partir de entonces (a partir del día 28 postinfección), y como mecanismo de protección, la producción sostenida de glucocorticoides induce un cambio de la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2, con una gran producción de citocinas como IL-4, IL-10, TGF- β (factor transformador del crecimiento beta); en ésta fase crónica, el sistema inmune no es capaz de contener a la bacteria permitiendo su diseminación y caracterizándose por un intenso infiltrado leucocitario, áreas de neumonitis y neumonía causando la muerte del animal.

De ésta manera el modelo experimental está constituido por ratones infectados los cuales son seguidos durante la infección realizando eutanasia a grupos de ratones de los cuales se toman muestras de diferentes órganos para analizar los cambios histopatológicos, microbiológicos y moleculares correlacionándolos con la progresión de la enfermedad.

Resultados preliminares.

Algunos resultados que hemos obtenido a partir del análisis de la transcripción del gen de AVP en hipotálamo y pulmón sugieren que la producción de vasopresina durante la fase progresiva es de origen extrahipotalámico. Podría concluirse de ésta manera que la síntesis y secreción central de AVP durante la fase temprana promueve la actividad de la respuesta inmune celular de tipo Th1, sin embargo en la fase progresiva, se pierde el control central del sistema vasopresinérgico y el "relevo" de síntesis de vasopresina se encuentra en la periferia, en el pulmón.

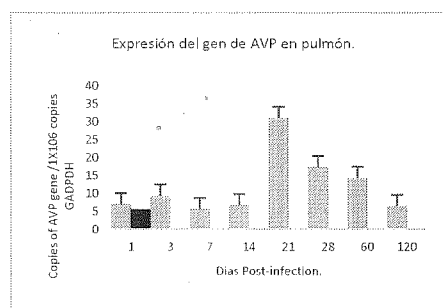
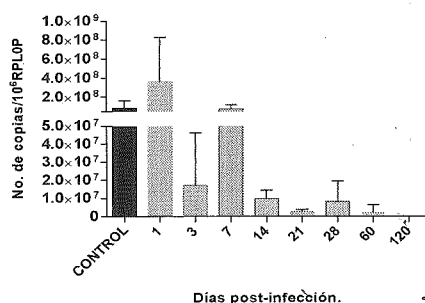


Fig. 1 Cuantificación de mRNA del gen de vasopresina. La cantidad de transcritos del gen de AVP en hipotálamo (izq.) disminuye a medida que avanza la enfermedad con respecto a los ratones control (sanos) y con respecto al día 1 post-infección. En el pulmón (der.) la cantidad de transcritos de RNA del gen de AVP se encuentra aumentada en la fase progresiva, a partir del día 21 post-infección, sugiriendo la producción ectópica (pulmonar) de vasopresina durante la tuberculosis activa.

Hipótesis.

La infección pulmonar por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* induce disfunción en la respuesta del sistema vasopresinérgico, dicha disfunción contribuye a la inmunopatología y el establecimiento de la enfermedad activa.

Objetivo general. Demostrar la relación entre la disfunción del sistema vasopresinérgico y la inmunopatogenia de la TB pulmonar progresiva experimental.

Objetivos específicos.

1. Analizar y describir la cinética de producción central y periférica (pulmón) de AVP en el modelo de TB pulmonar progresiva.
2. Estudiar el patrón de expresión de los receptores de vasopresina en cerebro, pulmón, timo, glándula suprarrenal, bazo e hígado.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de vasopresina en el desarrollo de la respuesta inmune en la fase temprana y en la fase progresiva de la enfermedad. Se analizará también el efecto sobre la diseminación bacteriana a otros órganos (Cerebro, hígado y bazo).
4. Estudiar el efecto *In vitro* de la vasopresina sobre macrófagos en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* (producción de citocinas, capacidad fagocítica y bactericida, producción de especies reactivas de oxígeno).

Estrategia Experimental.

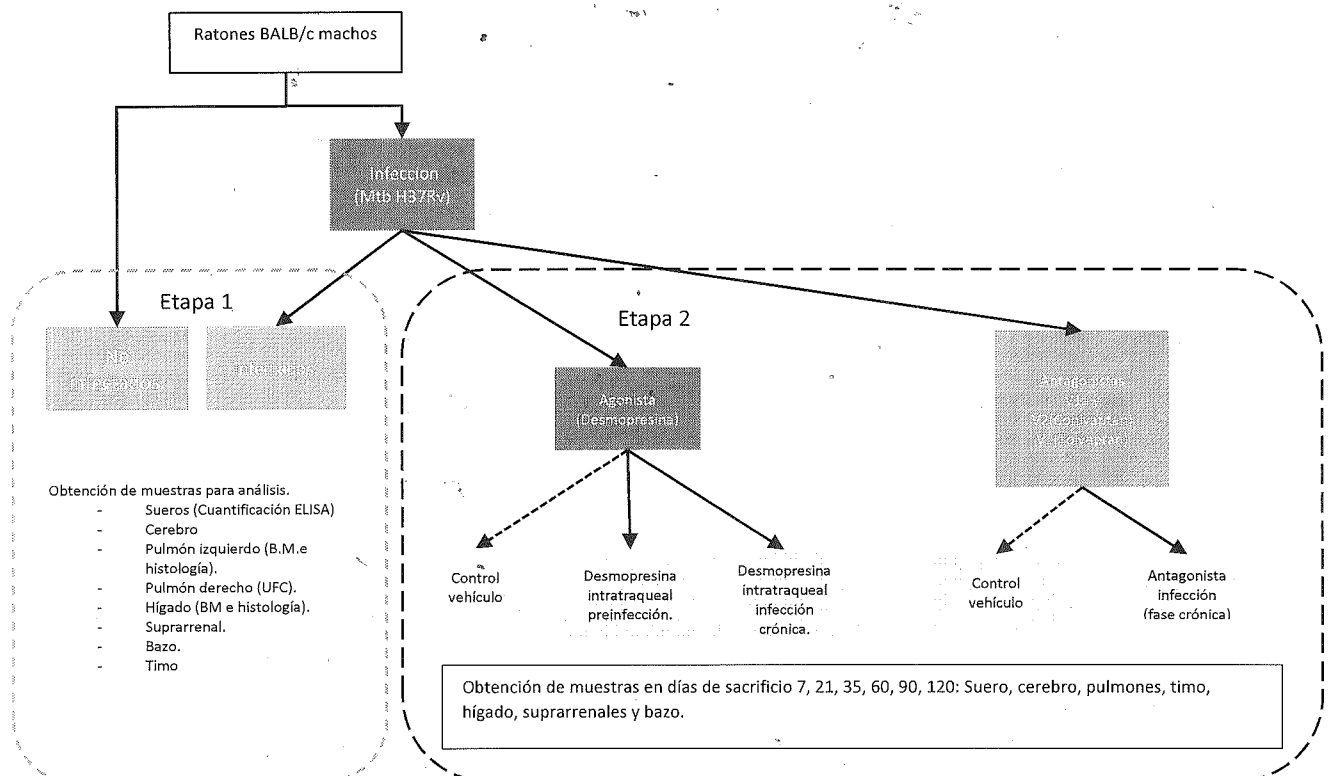


Fig. 2. Distribución y planeación de las dos fases del experimento. En la primera, con el objetivo de comparar la respuesta vasopresinérgica durante la tb pulmonar se tomarán muestras de cerebro (hipotálamo), pulmones, bazo, timo, suprarrenales e hígado de cada ratón, de ambos grupos (infectados y sanos). En la segunda fase del experimento, el uso de bloqueadores específicos de los receptores de AVP serán administrados para evaluar la relación entre el sistema vasopresinérgico y la respuesta del sistema inmune a la infección por Mtb.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo de Micobacterias y preparación del inóculo..

Para la serie de experimentos planeados, se utilizará *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa de mediana virulencia H37Rv, la cual será cultivada en medio Middlebrook 7H9 con glicerol enriquecido con ADC (Albumina, dextrosa, catalasa) en incubación con agitación a 37°C durante 4 semanas. Posteriormente se tomarán alícuotas de manera aleatoria para determinar la densidad óptica de determinar la alícuota que en el cultivo se encuentre en fase exponencial de crecimiento bacteriano. Para comprobar la pureza se realizará tinción de Ziehl-Neelsen y la alícuota se suspenderá en un volumen de 30 ml de buffer Fosfato-salino (PBS) en un tubo con perlas de cristal y se mantendrá en agitación en intervalos de 1 min y 1 min de reposo, hasta completar diez minutos para la disgregación de grumos de bacterias. Posteriormente será centrifugado y almacenado en alícuotas a -70°C en el cepario de nuestro laboratorio.

Todos los procedimientos para la generación y utilización de micobacterias se realizarán dentro de una campana (gabinete) de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones de la sección de patología experimental del INCMNSZ. Al final de cada procedimiento, la superficies de trabajo, todo el material y los desechos que tuvieran contacto con micobacterias serán inactivados con Clidox™ 1:1:18 partes de agua/15minutos, estos organismos son susceptibles a la acción del cloro y se recomienda que las superficies de trabajo se limpien con cloro al 10% por 10 minutos dentro del gabinete de bioseguridad, para su desecho, se sacarán del gabinete colocándose en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min) marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS (RPBI's)".

Para el transporte de las micobacterias del laboratorio en la sección de patología experimental a las instalaciones en el DIEB, los viales se colocan en bolsa burbuja rodeada de material absorbente, así como también un refrigerante dentro de un contenedor plástico diseñado para llevar muestras biológicas de forma segura para todos los modos de transporte (Bio-Bottle, tapa anaranjada de altura 23cm por 12cm de diámetro, con capacidad de 2.5L) etiquetado con el símbolo de sustancia infecciosa y el nombre del patógeno.

Infección de ratones y modelo de tb pulmonar.

Para el procedimiento de infección, ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 uL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm. Posteriormente, para la inoculación intratraqueal (v.it.) de micobacterias los animales se colocaran sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetaran los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea y se infectara con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, suspendidas en un volumen de 100 µl de buffer de fosfatos salino (PBS). Los animales utilizados para los estudios relacionados con micobacterias serán alojados en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA y manipulados bajo Bioseguridad Animal Nivel 3.

Para la obtención de muestras, se practicara eutanasia a grupos de ratones por cada día de sacrificio de la cinética. Serán anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (v.ip.) a una dosis letal de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. En el modelo experimental de TB pulmonar progresiva, se toman muestras de estos tiempos pues son los días en los que pueden evidenciarse los cambios histopatológicos característicos de la enfermedad. Para la evaluación del tratamiento con agonistas y antagonistas de AVP del objetivo 3 de este protocolo, se seguirá el mismo procedimiento excepto por los tiempos de sacrificio que serán a los días 7, 14, 28, 60, 90, y 120 post-tratamiento. Todo el material, así como los productos de desecho (que no sean cadáveres) generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán inactivados con Clidox™ por 15min.

Nuestro grupo de trabajo tiene una amplia experiencia en el manejo, infección y sacrificio de animales para la obtención de muestras, además de contar con las instalaciones necesarias para poder manejar patógenos del Grupo de Riesgo 3 como *M. tuberculosis*.

El material de cama que esté en contacto con los ratones infectados se maneja dentro de gabinetes de flujo laminar con nivel de bioseguridad III, la cama sucia se depositara en bolsas rojas resistentes al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min), marcadas con la leyenda RPBI's. Los cadáveres de los ratones sacrificados durante el desarrollo del protocolo, se colocarán en una bolsa de iguales características, etiquetada con la fecha y número de ratones, para el mismo proceso de esterilización, una vez finalizado el ciclo la bolsa roja se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla marcada con la leyenda "RPBI's", la cual será trasladada al depósito temporal del instituto e incinerado posteriormente por una empresa especializada en el ramo.

Determinación de carga bacilar (unidades formadoras de colonias, UFC).

Se obtendrán los pulmones derechos de 5 ratones de cada grupo en los tiempos de sacrificio mencionados previamente, los cuales se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido, y almacenados a -70°C hasta su procesamiento. Además, muestras de cerebro e hígado serán obtenidas con los objetivos ya mencionados. Para determinar la carga bacilar por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), brevemente: se descongelan los pulmones y se agrega 500 μL de PBS-tween 0.05%. Se homogeniza el tejido con el sistema FastPrep24 y se lleva la mezcla a un volumen final de 1mL con PBS-Tween 0.05%. En una placa de 96 pozos, se agregan 270 μL de PBS-Tween 0.05% en cada pozo a utilizar (para cada pulmón se realizarán 4 diluciones seriadas que van de la -1 a la -4), y se tomarán 30 μL del concentrado de cada muestra (antes de tomar las muestras se deben sonicar por cuarenta y cinco segundos, se aplica vortex inmediatamente después) y se mezclarán por pipeteo 5 veces/cada dilución. Posteriormente se divide una caja petri con medio 7H10, enriquecido con OADC en 8 partes iguales y se sembrarán 10 microlitros de cada dilución en cada una de las partes. Todo el material y los desechos que tuvieron contacto con los tejidos infectados serán inactivados con Clidox™ y tratados como se describió previamente y los procedimientos se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

Análisis histológico e inmunohistoquímica.

Con el objetivo de confirmar los cambios característicos de la enfermedad pulmonar progresiva, de cada grupo de animales sacrificados se obtendrá el pulmón izquierdo de 3 de ellos, cada pulmón será perfundido con 3 ml de etanol absoluto durante la necropsia y fijado en alcohol absoluto. Una vez fijado se incluirá en bloques de parafina de los que se obtendrán cortes histológicos de 4 micrómetros de grosor y serán teñidos con Hematoxilina y Eosina (HE). En estas preparaciones se realizará el análisis histológico y morfométrico por medio de la determinación del área de inflamación perivascular, peribronquial e intersticial, así como el tamaño de granulomas y el porcentaje de afección neumónica en micrómetros cuadrados usando un software para análisis morfométrico (Leica ApplicationSuite v4.3).

Distribución de ratones en las diferentes etapas del protocolo.

Caracterización de la respuesta vasopresinérgica en el curso de la Tb pulmonar.					
Grupo	Cepa	Número de ratones.	Tiempos de sacrificio	Subtotal de ratones.	Total de ratones.
Control (sin infección).	No aplica.	6 ratones por tiempo de sacrificio.	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	48	354
Infectados.	H37Rv	9 ratones por tiempo.	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	72	
Desmopresina			14, 21, 28, 45, 60, 90 y 120.	63	
Desmopresina			35, 45, 60, 90, 120.	45	
Conivaptan.			7, 14, 21, 28, 60, 90, 120.	63	
Tolvaptan.			63		

Tabla 1.- En este experimento se pretende estudiar el efecto de los fármacos agonistas de vasopresina y antagonistas de receptores V1a, y V2 sobre el curso y la progresión de la enfermedad (sobrevida, carga bacilar en pulmón así como la carga bacilar en otros órganos como cerebro, bazo e hígado), extensión de daño tisular y expresión de citocinas para conocer el efecto de la vasopresina sobre las mismas.

Justificación del número de animales.

La solicitud de 9 ratones por tiempo en los grupos experimentales de infección y de administración farmacológica es la siguiente: Se obtendrán encéfalos, bazos, timo e hígados para el análisis por biología molecular (n=3), cuantificación de carga bacilar (n=3) e inmunohistoquímica (n=3) los cuales por ser órganos impares vuelve necesario el número de animales; el cerebro será dividido en hipotálamo, hipocampo y cerebelo para el análisis por biología molecular. Los pulmones serán utilizados para la determinación de la carga bacilar, extracción de ácidos nucleicos y análisis histológico.

Condición.	Número de ratones
Experimento.	354
Repetición.	354
Total para 2 experimentos.	708
Total + 10% aproximadamente.	778

Tabla 2.- Animales necesarios para hacer los experimentos descritos (programados para los próximos 3 años) pronosticando que los fármacos bloqueadores podrían tener un efecto positivo sobre el desarrollo de la enfermedad, este número podría variar.

El cálculo del número de ratones fue determinado usando la fórmula descrita por Amigo, et al. La cual está basada en incidencias seriadas de los procedimientos.

$X = N / ((A/100) \times (B/100) \times (C/100) \dots) =$ Mínimo de 6 ratones por grupo.

Donde:

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual se parte.

N= Número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos en el proyecto.

A= 100 - % de incidencia 1.

B= 100- % de incidencia 2.

C= 100- % de incidencia 3 y así sucesivamente.

*Como incidencias se tomaron, de acuerdo a la experiencia de nuestro grupo de trabajo el número de animales perdidos por muerte por enfermedad, muerte por aplicación del tratamiento, muerte por anestesia.

Métodos.

En relación a los objetivos planteados previamente, se realizarán las siguientes metodologías.

1. Estudio cinético de producción central y periférica de Vasopresina.

Análisis de expresión y producción central y periférica de AVP.

Con el objetivo de buscar y determinar la expresión y producción de vasopresina, se aplicarán las siguientes dos técnicas: 1. Para conocer la presencia del péptido en los diferentes órganos, por inmunohistoquímica (IHQ) de los bloques en parafina obtenidos, se realizarán cortes de 4 micrómetros de grosor que serán montados en laminillas electrocargadas y serán utilizados para la detección de AVP por medio de un anticuerpo policlonal dirigido hacia dicho péptido de la marca Genetex (USA). Para ello, las laminillas con cortes obtenidos del bloque de parafina, serán desparafinadas por incubación a 60°C durante 25 minutos, e hidratadas gradualmente en baños de Xilol, xilol-alcohol, etanol 96°, etanol al 70% y finalmente en agua destilada. Posterior a la hidratación se bloqueará la actividad interna de la peroxidasa y se incubará el corte tejido con el anticuerpo primario

durante la noche. Seguido por lavados con PBS-Tween20 e incubación con anticuerpo secundario marcado con biotina. Para la detección se usará el sistema biotina-streptavidina-peroxidasa; posteriormente se realizará contratincción con hematoxilina. El análisis de células positivas en el epitelio bronquial, infiltrado inflamatorio perivascular, peribronquial, intersticial, en los granulomas y áreas neumónicas se hará con el software mencionado previamente. Se obtendrán muestras en cortes de cerebro, bazo, timo y adrenales para las cuales se aplicará el mismo procedimiento para la detección por IHQ de la hormona, así como el análisis cinético de la expresión de AVP.

Cuantificación de transcritos del gen de AVP.

Las muestras de tejido (Cerebro, pulmón, timo, bazo, hígado y suprarrenales) de los ratones de cada grupo serán obtenidos y almacenados en tubos MP, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente a -70°C hasta su uso. Para la extracción de ácidos nucleicos, se seguirá la siguiente metodología: A cada tubo conteniendo un pulmón, será agregada una cantidad de 500 microlitros del compuesto RLT Plus. Posteriormente, el tejido es homogenizado con perlas de sílice y zirconia, usando el sistema MP fast prep24; se obtendrá el RNA total con ayuda del kit de extracción RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Mexico). La Calidad y cantidad de RNA será evaluada mediante un espectrofotómetro de placas EPOCH (BioTek instruments, USA) a (260/280). Después mediante PCR de punto final en gel de agarosa se analizará la expresión de un gen constitutivo (GADPH) con la secuencia CATTGTGGAAGGGCTCATGA y GGAAGGCCATGCCAGTGAGC para confirmar la integridad del RNA. Se realizará la retrotranscripción del RNAm utilizando 5 ug de RNA, oligo-dT y Omniscript Kit (Qiagen, México). La PCR en Tiempo Real se realizara empleando el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) y se cuantificara utilizando la tecnología Quantitech Sybr Green Master Mix (Qiagen). Se utilizará el método de cuantificación absoluta para lo cual se realizará una curva estándar (1×10^9 hasta 1×10^2) para cuantificar el número de copias. Se usarán oligonucleótidos específicos diseñados con el programa Primer-Express (Applied Biosystem) para AVP y sus tres receptores. Se utilizarán los siguientes oligonucleótidos: (GCTGCCAGGAGGAGAACTAC y AAAAACCGTCGTGGCACTCG) para AVP. La PCR en tiempo real (*Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR) se realizará bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. El número de copias de AVP y cada uno de sus receptores se comparará con un millón de copias de RNAm de un gen constitutivo (GADPDH).

Cuantificación sérica de vasopresina (Copeptina).

Con el fin de comparar la cantidad de hormona circulante en ratones con tuberculosis y ratones sanos, se utilizará la metodología de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

competitivo, dirigido hacia el péptido C-terminal de AVP, la coceptina(24). El motivo de la cuantificación de coceptina es que la vasopresina, al secretarse a la circulación es rápidamente degradada por proteasas plasmáticas (vasopresinasas) y además, se une a receptores en plaquetas y endotelio lo cual altera la cantidad de la hormona circulante en el plasma siendo un método de detección poco confiable; por el contrario, la coceptina ha mostrado ser un marcador eficiente de la cantidad de vasopresina en circulación pues refleja de manera indirecta la producción de este péptido ya que se secretan de manera equimolar y, a diferencia de AVP, la coceptina no es degradada por proteasas plasmáticas, su vida media es más prolongada y no tiene efectos biológicos conocidos. Para realizar el ELISA, brevemente, las muestras de suero obtenidas durante el proceso de eutanasia serán colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, centrifugadas a 4°C en el Bioterio de tipo BSL3. Los sueros obtenidos serán almacenados en tubos de 0.6ml e inmediatamente congelados a -80°C hasta su uso. Para dicho ensayo se utilizará el kit de ELISA de la marca LifeSpan Biosciences (USA), con placas previamente sensibilizadas en las que serán cargados 50 microlitros (ul) de suero, obtenido durante el proceso de sacrificio de cada ratón; cada muestra será colocada por duplicado. El protocolo de activación de anticuerpos e incubación del método serán realizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se analizará la absorbancia a una densidad óptica de 450 nm en un espectrofotómetro de placas de la marca EPOCH. Los límites de detección de este kit comprenden un rango entre 24.69-2000 pg/ml.

Objetivo 2. Estudio del patrón de expresión de los receptores de vasopresina en cerebro, pulmón, timo, glándula suprarrenal, bazo e hígado

a. Cuantificación de transcritos.

Para esta etapa del experimento, los pulmones izquierdos, cerebros, timo, suprarrenales y bazo de 3 ratones de cada grupo serán obtenidos y almacenados en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente a -70°C hasta su uso. Para la extracción de ácidos nucleicos, brevemente: se agregaran 500 µL de RLT Plus (Qiagen, México), el tejido será homogenizado con perlas de sílice y zirconia, usando el sistema MP FastPrep24™; se obtendrá el RNA_{total} con ayuda del kit de extracción RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Mexico). La calidad y cantidad de RNA será evaluada por espectrofotometría a 260/280 (EPOCH, BioTek instruments, USA). La retrotranscripción del RNA_m se hará utilizando 5 ug de RNA, oligo -dT y Omniscript Kit (Qiagen, México) necesitando poner las condiciones de rtPCR. Finalmente, se hará PCR de punto final para detectar la expresión del gen constitutivo que codifica para GADPH.

La PCR en Tiempo Real (del inglés: *Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*, qPCR-RT) se realizará empleando el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) y se cuantificará utilizando la tecnología Quantitech Sybr Green Master Mix (Qiagen) con el método de cuantificación absoluta a través una curva estándar (1x10⁹ hasta 1x10²) para establecer el número de copias. Se usarán oligonucleótidos específicos diseñados con el programa Primer-Express (Applied Biosystem, USA) para los tres receptores de AVP. Se utilizarán los siguientes oligonucleótidos: (AATGAATTCATGAGTTTCCCGCGAGGC y TCCGGATCCAGTGGAGACAGGGTAAA) para V1a; (CAAGAATTCATGGATTCTGAGCCTTCT y AACGGATCCAGAGATGCTGGTCTCCAT) para V1b y para V2

(ATGATCCTGGTGTCTACCAC y TAGAAAGAGCCCAGTAGCTAC). La qPCR-RT se realizará bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. El número de copias de cada uno de los genes de estos receptores se comparará con un millón de copias de RNAm de un gen constitutivo.

El mismo procedimiento será realizado con el resto de los tejidos mencionados anteriormente. Todo el material y los desechos que tuvieron contacto con los tejidos infectados serán inactivados con Clidox™ y tratados como se describió previamente, los procedimientos se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III.

b. Inmunohistoquímica (IHQ).

Para analizar la expresión de la proteína madura de dichos receptores, se realizará IHQ de cortes de tejido con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los receptores V1a, V1b y V2 de vasopresina. La descripción de la técnica realizada ha sido descrita previamente.

El mismo procedimiento será realizado con el resto de los tejidos mencionados anteriormente.

Objetivo 3. Evaluar el efecto del tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de AVP sobre el desarrollo de la respuesta inmune y la progresión de la enfermedad.

Administración de fármacos agonistas y antagonistas de receptores de AVP.

Los fármacos serán administrados durante toda la infección en algunos casos, o bien, en la fase progresiva de la TB en otros. En el caso de la Desmopresina (dDAVP), un análogo del receptor V2, se administrará por vía intratraqueal **cada día a una dosis de 2 mg/kg, 7 días previos a la infección con Mtb y durante los primeros 21 días de la infección** para conocer los efectos del tratamiento con dDAVP durante la fase temprana de la enfermedad. **En un segundo grupo experimental, se administrará este fármaco en la misma dosis y frecuencia durante la fase progresiva de la enfermedad (a partir del día 28)**, para evaluar su efecto sobre la respuesta inmune y el estado patológico característico de esta etapa (neumonía, alveolitis, etc). Los demás fármacos se administrarán por vía intragástrica (i.g.) siguiendo la siguiente técnica: Se sujetará al ratón por la cola y la parte superior de la cabeza para poner en posición recta el esófago; se introduce la cánula mencionada anteriormente con punta roma y se vierte el contenido a la cavidad gástrica; las dosis utilizadas para este experimento de cada fármaco serán: Conivaptan (1mg/kg de peso) 1 vez al día; Tolvaptan (1 mg/Kg de peso) 1 vez al día.

De los animales de cada grupo y subgrupo experimental, tratados con agonistas o antagonistas de los receptores de AVP, se obtendrán muestras de necropsia de diferentes órganos con el fin de analizar el papel del sistema vasopresinérgico sobre la respuesta inmune al patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Los encéfalos de ratones infectados y tratados con alguno de estos fármacos serán usados para análisis por biología molecular, microbiología e inmunohistoquímica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos serán agrupados acorde a cada objetivo, el tratamiento de cada parámetro se hará a través del análisis de varianza ANOVA de 2 vías y factor de corrección para comparaciones múltiples por prueba de Bonferroni, utilizando el software Graphpad Prism versión 6.01.

Referencias.

1. Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2014;
2. Di Comite G, Grazia Sabbadini M, Corti A, Rovere-Querini P, Manfredi A a. Conversation galante: How the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmun Rev*. 2007;7(1):23–9.
3. Quintanar A, Campos-rodr R. Vasopressin and Immune Function. 2011;1:143–56.
4. Chikanza IC, Grossman a S. Hypothalamic-pituitary-mediated immunomodulation: arginine vasopressin is a neuroendocrine immune mediator. *Br J Rheumatol*. 1998;37(2):131–6.
5. Kochman K. Neurohormones : oxytocin , vasopressin and related peptides – structure , genes , receptors , and evolution. 2013;283–94.
6. Ekman R, Gobom J, Persson R, Mecocci P, Nilsson CL. Arginine vasopressin in the cytoplasm and nuclear fraction of lymphocytes from healthy donors and patients with depression or schizophrenia. *Peptides*. 2001;22(1):67–72.
7. Chowdrey HS, Lightman SL, Harbuz MS, Larsen PJ, Jessop DS. Contents of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin immunoreactivity in the spleen and thymus during a chronic inflammatory stress. *J Neuroimmunol*. 1994;53(1):17–21.
8. Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, et al. Vasopressin : a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res*. 1998;24(3-4):703–10.
9. Koshimizu T -a., Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue a. Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1813–64.
10. Maybauer MO, Maybauer DM, Enkhbaatar P, Traber DL. Physiology of the vasopressin receptors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2008;22(2):253–63.

11. Palin K, Moreau ML, Sauvant J, Orcel H, Nadjar A, Duvoid-Guillou A, et al. Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6):E1289–99.
12. Peng TC, Huang CJ. Vasopressin inhibits endotoxin-induced upregulation of inflammatory mediators in activated macrophages. *Tzu Chi Med J. Elsevier Taiwan LLC*; 2013;25(3):150–4.
13. Khagai II, Gulyaeva M a., Popova N a., Zakharova L a., Ivanova LN. Immune system in vasopressin-deficient rats during ontogeny. *Bull Exp Biol Med*. 2003;136(5):448–50.
14. Torres B a, Johnson HM. Arginine vasopressin (AVP) replacement of helper cell requirement in IFN-gamma production. Evidence for a novel AVP receptor on mouse lymphocytes. *J Immunol*. 1988;140(7):2179–83.
15. Berczi I, Quintanar-Stephanò A, Kovacs K. Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1153:220–39.
16. Guetta J, Klorin G, Tal R, Berger G, Ismael-Badarneh R, Bishara B, et al. Vasopressin-2 receptor antagonist attenuates the ability of the lungs to clear edema in an experimental model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):583–8.
17. Boyd JH, Holmes CL, Wang Y, Roberts H, Walley KR. Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R. *Resuscitation*. 2008;79(2):325–31.
18. Esposito P, Piotti G, Bianzina S, Malul Y, Dal Canton A. The syndrome of inappropriate antidiuresis: Pathophysiology, clinical management and new therapeutic options. *Nephron - Clin Pract*. 2011;119(1).
19. Lee P, Ho KKY. Hyponatremia in pulmonary TB: Evidence of ectopic antidiuretic hormone production. *Chest*. 2010;137(1):207–8.
20. Jafari NJ, Izadi M, Sarrafzadeh F, Heidari A, Ranjbar R, Saburi A. Hyponatremia due to pulmonary tuberculosis: Review of 200 cases. *Nephrourol Mon*. 2013;5(1):687–91.
21. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, Del Rey A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):68–77.
22. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci. Elsevier Inc.*; 2013;53:77–85.
23. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri a, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J,

et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996;89(1):26–33.

24. Łukaszyk E, Małyszko J. Copeptin: Pathophysiology and potential clinical impact. *Adv Med Sci. Medical University of Białystok*; 2015;60(2):335–41.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA: 1861

FOLIO DE REGISTRO: PAT-1861-16/20-1

Fecha de registro del Protocolo: 11-octubre-2016.

Título del Protocolo: PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN UN MODELO DE RATONES MACHOS BALB/c.

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.

Nombre del Investigador Titular	Rogelio Hernández Pando
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Departamento de Adscripción	Departamento de Patología y Anatomía Patológica, sección de Patología experimental.
Teléfono	54870900 ext. 2185, 2194 y 7126
Correo electrónico	○

Investigadores que Participaran en el Protocolo

Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Jorge Alberto Barrios Payán.	INCMNSZ	Doctor en ciencias	54870900 ext. 2185 y 2194	○
Brenda Marquina Castillo	INCMNSZ	Doctor en ciencias.	54870900 ext. 2185 y 2194	
Dulce Mata Espinosa	INCMNSZ	Doctor en ciencias.	54870900 ext. 2185 y 2194	

Estudiantes

Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
○	Facultad de Medicina, UNAM.	Doctor en ciencias Biomédicas.	4494962515	○

Vigencia del Protocolo.

Fecha estimada de inicio del protocolo	01	12	2016
Fecha tentativa de finalización.	31	01	2020



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- Institución en donde se realizará el proyecto:
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Objetivo principal. Demostrar la relación entre la disfunción del sistema vasopresinérgico y la inmunopatogenia de la TB pulmonar progresiva experimental.

Objetivos específicos.

- Analizar y describir la cinética de producción central y periférica de la AVP en el modelo de TB pulmonar progresiva.
- Estudiar el patrón de expresión de los receptores de vasopresina en pulmón, glándula suprarrenal, bazo e hígado.
- Evaluar el efecto del tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de vasopresina en el desarrollo de la respuesta inmune tanto en la fase temprana como en la fase progresiva de la TB pulmonar.
- Estudiar el efecto *In vitro* de la vasopresina sobre macrófagos en contacto con *Mycobacterium tuberculosis*.

Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Alrededor del 55% de los sujetos con tuberculosis pulmonar activa desarrollan hiponatremia, probablemente secundaria a secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH) o vasopresina. Existe evidencia que sugiere que la sobreproducción de esta hormona puede tener un origen extrahipotalámico; sin embargo, ésta situación patológica no se ha demostrado experimentalmente. El uso del modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva permitirá explorar la relación entre la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y la disfunción vasopresinérgica, así como su asociación con los cambios en los sistema inmune y neuroendocrino, contribuyendo al conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos de la inflamación crónica granulomatosa.

Estrategia Experimental

Ratones singénicos machos de 6 a 8 semanas de edad se les inyectará intratraquealmente 10^6 micobacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv. Posteriormente, se dividirán en grupos que recibirán cualquiera de los dos ya sea agonistas o antagonistas de los receptores de vasopresina, los grupos establecidos y uno final recibirá solución salina. Se extraerán los pulmones, el bazo, el timo, glándulas suprarrenales y encéfalo y el suero por exanguinación después de la anestesia con pentobarbital sódico en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 posterior a la administración de los tratamientos con el fin de analizar los efectos de las diversas



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

terapias administradas.

- Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C: x	D:	E:
------------	----	----	------	----	----

- Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R" s, remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Para la determinación de la carga bacilar, el análisis histológico y los estudios por biología molecular utilizaremos 9 animales por tiempo de sacrificio. Este es el número mínimo de animales que se requiere no solo para obtener las muestras necesarias y poder obtener una diferencia estadísticamente significativa, sino también es el mínimo requerido para poder publicar los resultados.

Además se solicita un 10% más de animales para el caso de las incidencias y pérdidas durante el experimento.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

No aplica

- Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
<i>Mus musculus</i>	920			Macho
No. de Grupos experimentales:		7		
No. de animales por grupo:		9 animales por tiempo de sacrificio.		
No. TOTAL DE ANIMALES:		920		

- Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
4 Meses desde la infección.

- Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	Posterior a la eutanasia (necropsia)
Colocación de cánulas y sondas.		X	Vía intratraqueal cada 3 días, vía intragástrica diario.
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Administración de fármacos bloqueadores de receptores de vasopresina.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)			
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Durante todo el experimento los ratones se encontrarán en microaisladores de acrílico conectados a una matriz de inyección de aire.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

- Procedimientos a realizar.

Metodología.

Manipulación Bacteriana:

Los animales serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 uL por raton) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm, para su inoculación por vía intratraqueal (v.it.) los animales se colocaran sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetaran los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una canula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la traquea y se inyectaran 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de Mycobacterium tuberculosis, extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 a longitud de onda de 600 nm se corroborará pureza con tinción de Ziehl-Neelsen, y se suspenderán en un volumen de 100 µl de buffer de fosfatos salino (PBS).

Administración farmacológica.

Los tratamientos serán administrados en un volumen final de 100 µl de agua bidestilada tres veces por semana a partir del día 1 postinfección hasta el día de sacrificio. Para los tratamientos intragástricos (v.ig.), se utilizara la canula previamente descrita y se introducirá por el esófago. Las dosis de administración de los farmacos a utilizar se encuentran determinadas de acuerdo a la literatura científica: las dosis utilizadas para este experimento de cada fármaco serán: Conivaptan (1mg/kg de peso) 1 vez al día; Tolvaptan (1 mg/Kg); Relcovaptan (2 mg/Kg). Por vía intratraqueal Desmopresina 2mg/Kg

Microbiológica.

Cada experimento evaluando un tratamiento farmacológico, tendrá tres grupos controles, uno recibirá antibióticos, otro solución salina y un tercero antibióticos más el tratamiento a evaluar. Cada grupo estará conformado por 10 ratones sacrificados en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postratamiento (por exsanguineación después de ser anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (v.ip.). Cada experimento se realizará por duplicado.

- Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Anestésico	Sevoflurano	100 µl	Inhalada	Una vez por cada administración intratraqueal



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar? Relajación muscular, pérdida de reflejo ocular.

- Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No aplica.

- Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia			X	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				X
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.			X	

- ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?
Pérdida substancial del peso corporal (peso menor a 18 gramos)

Piloerección
Adinamia
Taquipnea

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 - Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 - Moderada del 10-20%
 - Substancial > al 20% (criterio de punto final).
 - a. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 - 0 si es normal.
 - 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 - 2 si está afectado
 - 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

- ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
 Pentobarbital 210mg/kg intraperitoneal.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.

Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo* Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

- El protocolo representa riesgo biológico?
 Sí, el nivel de bioseguridad será el clasificado como BSL-III

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5_sect_V.pdf



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?
Los cadáveres serán colocados dentro de una bolsa de plástico de color rojo resistente a un ciclo de esterilización por vapor (121°C/20lb/in²/30 min), una vez terminado el ciclo la bolsa se colocará dentro de una bolsa de plástico de color amarillo, impermeable con la leyenda "PELIGRO, RESIDUOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS". Se trasladarán al depósito del INCMNSZ.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Investigador Responsable

Integrantes	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	
MVZ. Mariela Contreras Escamilla	Vocal	
Dra. Gabriela Alemán Escondrillas	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dr. José Carlos Crispín Acuña	Vocal	

PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN UN MODELO DE RATONES MACHOS BALB/c.

Responsable: Dr. Rogelio Hernández Pando

Unidad de adscripción: Sección de Patología Experimental, departamento de Patología y Anatomía Patológica. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Participantes:

- Dra. en C. Dulce Adriana Mata Espinosa. Encargada del área de microbiología y ensayos in vitro, cultivo de micobacterias y mantenimiento del cepario.
- Dra. en C. Brenda N. Marquina Castillo. Área de biología molecular, diseño de oligonucleótidos para PCR, análisis de transcritos y determinación de proteínas por Western Blot, Inmunohistoquímica, ELISA.
- Dr. en C. Jorge Alberto Barrios Payán. Infección de ratones y aplicación de tratamiento, encargado del Bioterio con bioseguridad nivel III, diseño de estrategias terapéuticas y de tratamiento.
- Mario Alberto Zetter Salmón. Médico cirujano, estudiante de doctorado en ciencias biomédicas, UNAM. Participación en todos los procesos técnicos y teóricos de los experimentos, así como en la planeación y diseño de protocolo y escritura de tesis doctoral, publicación de artículo en revista científica.

Introducción.

La transferencia de señales entre los sistemas inmune y neuroendocrino permite que los organismos mantengan la homeostasis y de ser necesario, que establezcan una serie de respuestas adaptativas hacia los diferentes estímulos nocivos provenientes del medio interno (p.ej. autoantígenos) o del medio externo (microorganismos). Éste diálogo es posible debido a la presencia de un gran número de mediadores solubles y sus receptores (citocinas, quimiocinas, neurohormonas y neuropéptidos), los cuales son compartidos en términos funcionales por estos sistemas, formando un *supersistema* neuroinmunoendocrino(1,2). En condiciones de inflamación, la activación de este sistema es fundamental para la recuperación (carga alostática) del estado de salud. Por el contrario, si la respuesta montada ante un agente agresor es inapropiada, estos mecanismos protectores pueden volverse dañinos y causar enfermedad.

Uno de estos mediadores hormonales es la arginina vasopresina (AVP), un péptido con actividad osmorreguladora y vasoactiva que ejerce un importante efecto inmunomodulador debido a su capacidad dual de estimular la respuesta inmune innata y adaptativa, además de intervenir en el proceso de recuperación de la inmunocompetencia(3). La vasopresina en conjunto con sus receptores constituye el sistema vasopresinérgico, uno de los sistemas de respuesta al stress cuya disfunción se ha asociado a enfermedades de origen infeccioso, autoinmune e inflamatorio crónico(4).

Estructura, síntesis y secreción de AVP.

La AVP es un péptido de 9 aminoácidos con un peso de 1.08 KDa con un residuo terminal de arginina, que lo diferencia estructuralmente de su homólogo oxitocina (OT). Es codificado a partir de un gen localizado en el cromosoma 2 en el ratón y 20 en el humano el cual está constituido por tres exones que transcriben una pre-pro hormona (pre-pro vasopresina) la cual es almacenada dentro de vesículas intracitoplásmicas en los axones de las neuronas magnocelulares y parvocelulares de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo, principalmente. Dentro de estas vesículas, el pre-pro péptido es procesado por endoproteasas que lo dividen en el péptido maduro (8-Arginina-vasopresina), una proteína "acarreadora" (neurofisina II) y un glucopéptido señal, la coceptina. Las vesículas de éstas neuronas, al ser estimuladas, secretan su contenido y la hormona madura, junto con los péptidos acarreadores son liberados en la terminal sináptica hacia la circulación en cantidades equimolares, la neurofisina es degradada por proteasas, la coceptina se mantiene en circulación y la hormona circula y se une a sus diferentes receptores ejerciendo su actividad(5). Existe evidencia de que otros tipos celulares como los linfocitos, timocitos y las células de la corteza suprarrenal pueden producir AVP de manera fisiológica, y, en determinadas condiciones de manera patológica (tumor neuroendocrino (de células pequeñas) de pulmón, enfermedad inflamatoria intestinal), sin embargo, el mecanismo de secreción en estas células no ha sido descrito(6-8).

Receptores y mecanismo de acción.

AVP ejerce sus efectos biológicos a través de al menos tres tipos de receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) denominados genéricamente V1a, V1b (antes V3) y V2, los cuales se encuentran distribuidos ampliamente en diferentes órganos y tejidos entre los que se encuentran el músculo liso, los hepatocitos, macrófagos, linfocitos B y corteza suprarrenal (V1aR); en adenohipófisis, médula suprarrenal, islotes de Langerhans y linfocitos (V1bR); y finalmente, en cerebro, endotelio, pulmón y túbulos colectores del riñón (V2R). (9) Los receptores V1a y V1b desencadenan actividad intracelular a través de la activación de la vía de la fosfolipasa C aumentando la concentración de calcio intracelular (citoplasma) e intranuclear. El receptor V2 al activarse, coactiva a la adenil-ciclase aumentando la concentración del segundo mensajero monofosfato cíclico de Adenosina (AMPC) para ejercer sus efectos intracelulares. Además de estos receptores, la vasopresina puede activar receptores de OT y también se ha descrito que puede producir efectos biológicos a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), sin embargo el mecanismo no se ha dilucidado(10).

Vasopresina y sistema inmune.

Citocinas producidas en los sitios inflamación (p.ej. IL1b, IL-6 y TNF-a) inducen la secreción de AVP por las neuronas del PVN (la activación los receptores de estas citocinas, presentes en las terminaciones nerviosas libres, envía señales excitatorias ascendentes a través del nervio vago alcanzan el tronco encefálico y se proyectan a diferentes regiones del sistema nervioso central como el hipocampo, el núcleo basal de la estría terminal (BNST) y las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo) en donde estas señales estimulan a las neuronas del PVN para la secretar AVP y factor liberador de corticotropina (CRF, *Corticotropin Releasing Factor*) hacia la eminencia media del hipotálamo, en donde a través del sistema porta-hipofisario, llegan a la adenohipófisis(11). En las células corticotropas, AVP y CRF actúan sinérgicamente induciendo la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) cuya función principal es la de estimular la secreción de los glucocorticoides (GC's) cortisona y cortisol por la corteza suprarrenal. Los glucocorticoides (GC's), tienen efectos directos sobre la actividad del sistema inmune: esto es que durante las fases tempranas de la inflamación amplifican la intensidad de la respuesta inmune innata y disminuyen la respuesta adaptativa. Al mismo tiempo, la secreción directa de AVP por la neurohipófisis hacia la circulación general tiene efectos directos sobre macrófagos y linfocitos. La evidencia sugiere que a través del receptor V1a, vasopresina regula la producción de citocinas por parte de los macrófagos, por un mecanismo que involucra al factor nuclear kappa-B (NF-kB)(12). En los linfocitos B, el receptor V1b promueve la maduración de los mismos para la producción de inmunoglobulinas(13). Además la presencia de AVP es necesaria para la respuesta proliferativa de células NK y la generación de respuestas linfocitarias. AVP es un inductor positivo de la producción de interferón gamma (IFN- γ)(14). Además, induce la secreción de prolactina (PRL) por la adenohipófisis, que junto con la hormona del crecimiento (GH) promueve la proliferación de timocitos y su diferenciación a linfocitos T maduros restaurando la inmunocompetencia adaptativa(15). En la inflamación crónica, el aumento en la actividad glucocorticoide inhibe la producción de CRF por un mecanismo de retroalimentación negativo. Se ha propuesto que a largo plazo, AVP tiene efectos antiinflamatorios estimulando la producción de cortisol por la glándula suprarrenal. En algunos órganos como el pulmón, AVP tiene efectos antiinflamatorios a través del receptor V2, además de participar en el aclaramiento del edema pulmonar(16,17).

Existe evidencia que indica que los sujetos con enfermedades inflamatorias e infecciosas crónicas (Lupus eritematoso sistémico, legionelosis, leishmaniosis, neumonía) desarrollan hiponatremia secundaria a secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH), entidad causada por la inadecuada producción de AVP o bien por la inadecuada expresión de sus receptores(4,18). La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades en las que se presenta ésta situación clínica. Alrededor del 55% de los sujetos con enfermedad activa desarrollan hiponatremia secundaria a SIADH la cual mejora con el tratamiento antifímico. Hay algunas publicaciones que sugieren la producción extrahipotálamica de la hormona durante esta enfermedad(19,20).

Interacciones neuroinmunoendocrinas en la tuberculosis.

Actualmente, más de un tercio de la población mundial se encuentra infectada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sin presentar manifestaciones clínicas de enfermedad (tuberculosis latente) y cada año mueren alrededor de 1.5 millones de humanos por la enfermedad activa. Mtb afecta principalmente a los pulmones, sin embargo, la presencia del bacilo produce profundas alteraciones en el sistema inmune y en el sistema endocrino. En éste provoca diversos cambios en la respuesta hormonal al stress, como son el aumento en los niveles de PRL y GH, la disminución en los niveles séricos de dehidroepiandrosterona (DHEA) los cuales tienen efecto sobre el sistema inmune(21). Además, el aumento en la producción de algunas citocinas (p.ej. factor transformante del crecimiento beta (TGF- β)) inhibe la producción de hormonas muy importantes en la respuesta protectora hacia el bacilo como la DHEA, causando de esta forma la perpetuación del estado inflamatorio, permitiéndole al bacilo evadir los mecanismos de protección del huésped, provocando enfermedad. Estas alteraciones se han explorado en humanos y en modelos murinos y existe fuerte evidencia que indica que las alteraciones metabólicas durante la TB son resultado de la disregulación de la respuesta neuroinmunoendocrina(22). En este sentido, es el interés de nuestro grupo de investigación estudiar y comprender los mecanismos que subyacen al desarrollo de la enfermedad integrando las bases patogénicas de la respuesta inmune con la disregulación de los sistemas nervioso y endocrino buscando obtener explicaciones sobre la fisiopatogénea, para desarrollar posibles estrategias de prevención, diagnóstico y terapéutica de éste importante problema de salud.

Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

El modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c de nuestro laboratorio permite el estudio de las interacciones inmunopatogénicas de la enfermedad activa pues representa en el ratón lo que sucede en el humano (expresión de citocinas, hormonas, crecimiento bacteriano y de características anatomopatológicas). En dicho modelo de infección, se inoculan a cada ratón por vía intratraqueal la cantidad de 2.5×10^5 bacterias de la cepa prototipo de mediana virulencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, induciendo enfermedad pulmonar activa. En ésta, se ha caracterizado la cinética de producción de citocinas, quimiocinas y hormonas correlacionada con los cambios anatomopatológicos característicos en pulmón distinguiéndose dos etapas en la progresión de la enfermedad(23): la fase temprana (día 1 a día 28 posinfección), en la que un gran número de células inflamatorias migran al sitio de infección a través de la extravasación por capilares y vénulas, y también a través de su migración a través del epitelio bronquio-alveolar. En dicha fase hay engrosamiento de los espacios intersticiales y aproximadamente al día 14 inicia la formación de cúmulos organizados de células inflamatorias representando

los granulomas de la enfermedad humana. Predomina la producción de citocinas proinflamatorias (i.e. IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) las cuales promueven una respuesta celular de tipo Th1 cuyos efectos son benéficos para el control de la infección, de hecho, el crecimiento bacteriano en ésta fase se encuentra hasta cierto punto inhibido. A partir de entonces (a partir del día 28 postinfección), y como mecanismo de protección, la producción sostenida de glucocorticoides induce un cambio de la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2, con una gran producción de citocinas como IL-4, IL-10, TGF- β (factor transformador del crecimiento beta); en ésta fase crónica, el sistema inmune no es capaz de contener a la bacteria permitiendo su diseminación y caracterizándose por un intenso infiltrado leucocitario, áreas de neumonitis y neumonía causando la muerte del animal.

Resultados preliminares.

Algunos resultados que hemos obtenido a partir del análisis de la transcripción del gen de AVP en hipotálamo y pulmón sugieren que la producción de vasopresina durante la fase progresiva es de origen extrahipotalámico. Podría concluirse de ésta manera que la síntesis y secreción central de AVP durante la fase temprana promueve la actividad de la respuesta inmune celular de tipo Th1, sin embargo en la fase progresiva, se pierde el control central del sistema vasopresinérgico y el "relevo" de síntesis de vasopresina se encuentra en la periferia, en el pulmón.

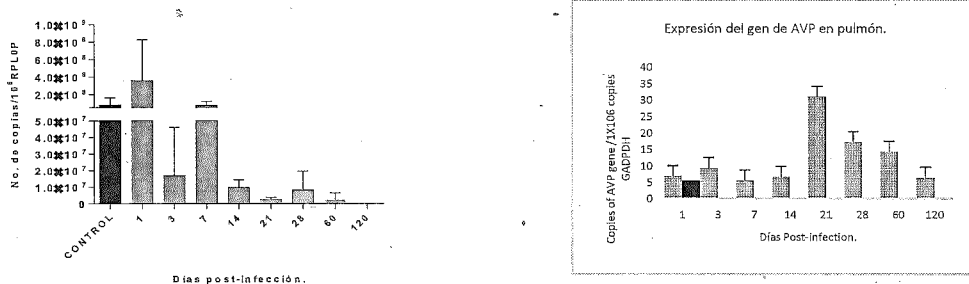


Fig. 1 Cuantificación de mRNA del gen de vasopresina. La cantidad de transcritos del gen de AVP en hipotálamo (izq.) disminuye a medida que avanza la enfermedad con respecto a los ratones control (sanos) y con respecto al día 1 post-infección. En el pulmón (der.) la cantidad de transcritos de RNA del gen de AVP se encuentra aumentada en la fase progresiva, a partir del día 21 post-infección, sugiriendo la producción ectópica (pulmonar) de vasopresina durante la tuberculosis activa.

Hipótesis.

El funcionamiento adecuado del sistema vasopresinérgico es trascendental para el establecimiento de la respuesta inmune hacia el agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivo principal. Demostrar la relación entre la disfunción del sistema vasopresinérgico y la inmunopatogenia de la TB pulmonar progresiva experimental.

Objetivos específicos.

1. Analizar y describir la cinética de producción central y periférica de la AVP en el modelo de TB pulmonar progresiva.
2. Estudiar el patrón de expresión de los receptores de vasopresina en pulmón, glándula suprarrenal, bazo e hígado.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de vasopresina en el desarrollo de la respuesta inmune tanto en la fase temprana como en la fase progresiva de la TB pulmonar.
4. Estudiar el efecto *In vitro* de la vasopresina sobre macrófagos en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* (producción de citocinas, capacidad fagocítica y bactericida, producción de especies reactivas de oxígeno).

Estrategia Experimental.

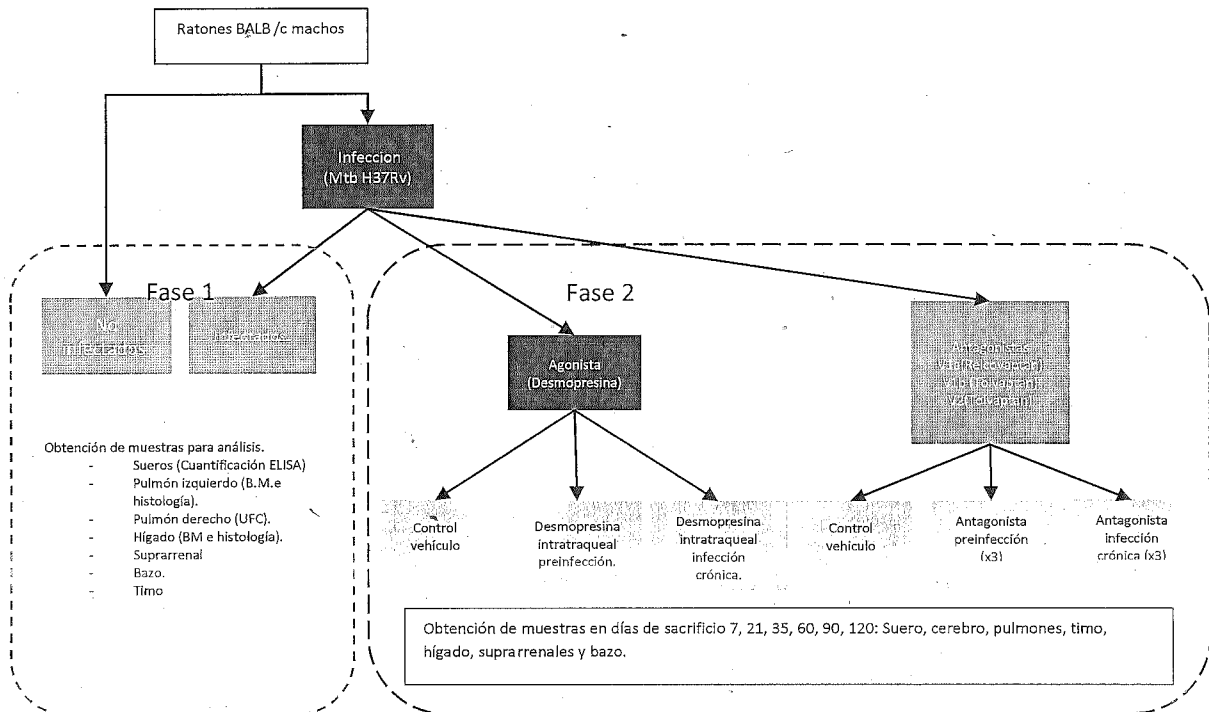


Fig. 2. Distribución y planeación de las dos fases del experimento. En la primera fase, con el objetivo de caracterizar la respuesta vasopresinérgica durante la tb pulmonar se tomarán muestras de cerebro (hipotálamo), pulmones, bazo, timo, suprarrenales e hígado de cada ratón de ambos grupos infectados y sanos, para comparar dicha respuesta. En la fase 2 del experimento, el uso de bloqueadores específicos de los receptores de AVP serán administrados para comparar el efecto del sistema vasopresinérgico sobre la respuesta del sistema inmune a la infección por Mtb.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Cultivo de Micobacterias e infección de ratones.

Para la serie de experimentos planeados, se utilizará *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa de mediana virulencia H37Rv, la cual será cultivada en medio Middlebrook 7H9 con glicerol enriquecido con ADC (Albumina, dextrosa, catalasa) en incubación con agitación a 37°C durante 4 semanas. Posteriormente se tomarán alícuotas de manera aleatoria para determinar la densidad óptica de determinar la alícuota que en el cultivo se encuentre en fase exponencial de crecimiento bacteriano. Para comprobar la pureza se realizará tinción de Ziehl-Neelsen y la alícuota se suspenderá en un volumen de 30 ml de buffer Fosfato-salino (PBS) en un tubo con perlas de cristal y se mantendrá en agitación en intervalos de 1 min y 1 min de reposo, hasta completar diez minutos para la disgregación de grumos de bacterias. Posteriormente será centrifugado y almacenado en alícuotas a -70°C en el cepario de nuestro laboratorio.

Todos los procedimientos para la generación y utilización de micobacterias se realizarán dentro de una campana (gabinete) de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones de la sección de patología experimental del INCMNSZ. Al final de cada procedimiento, la superficies de trabajo, todo el material y los desechos que tuvieron contacto con micobacterias serán inactivados con Clidox™ 1:1:18 partes de agua/15 minutos, estos organismos son susceptibles a la acción del cloro y se recomienda que las superficies de trabajo se limpien con cloro al 10% por 10 minutos dentro del gabinete de bioseguridad, para su desecho, se sacarán del gabinete colocándose en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min) marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS (RPBI's)".

Para el transporte de las micobacterias del laboratorio en la sección de patología experimental a las instalaciones en el DIEB, los viales se colocan en bolsa burbuja rodeada de material absorbente, así como también un refrigerante dentro de un contenedor plástico diseñado para llevar muestras biológicas de forma segura para todos los modos de transporte (Bio-Bottle, tapa anaranjada de altura 23cm por 12cm de diámetro, con capacidad de 2.5L) etiquetado con el símbolo de sustancia infecciosa y el nombre del patógeno.

Infección de ratones y modelo de tb pulmonar.

Para el procedimiento de infección, ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 uL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm. Posteriormente, para la inoculación intratraqueal (v.it.) de micobacterias los animales se colocaran sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetaran los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea y se infectara con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, suspendidas en un volumen de 100 µl de buffer de fosfatos salino (PBS). Los animales utilizados para los estudios relacionados con micobacterias serán alojados en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA y manipulados bajo Bioseguridad Animal Nivel 3. Para la obtención de muestras, se practicara la eutanasia a grupos de 9 ratones por cada día de sacrificio de la cinética. Serán anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (v.ip.) a una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. En el modelo experimental de TB pulmonar progresiva, se toman muestras de estos tiempos pues son los días en los que pueden evidenciarse los cambios histopatológicos característicos de la enfermedad. Para la evaluación del tratamiento con agonistas y antagonistas de AVP del objetivo 3 de este protocolo, se seguirá el mismo procedimiento excepto por los tiempos de sacrificio que serán a los días 7, 14, 28, 60, 90, y 120 post-tratamiento. Todo el material, así como los productos de desecho (que no sean cadáveres) generados por el sacrificio de los animales será considerado RPBI y serán inactivados con Clidox™ por 15min.

Nuestro grupo de trabajo tiene una amplia experiencia en el manejo, infección y sacrificio de animales para la obtención de muestras, además de contar con las instalaciones necesarias para poder manejar patógenos del Grupo de Riesgo 3 como *M. tuberculosis*.

El material de cama que esté en contacto con los ratones infectados se maneja dentro de gabinetes de flujo laminar con nivel de bioseguridad III, la cama sucia se depositara en bolsas rojas resistentes al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min), marcadas con la leyenda RPBI's. Los cadáveres de los ratones sacrificados durante el desarrollo del protocolo, se colocarán en una bolsa de iguales características, etiquetada con la fecha y número de ratones, para el mismo proceso de esterilización, una vez finalizado el ciclo la bolsa roja se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla marcada con la leyenda "RPBI's", la cual será trasladada al depósito temporal del instituto e incinerado posteriormente por una empresa especializada en el ramo.

Distribución de ratones en las diferentes etapas del protocolo.

Caracterización de la respuesta vasopresinérgica en el curso de la tb pulmonar.				
Grupo	Cepa	Cinética de sacrificio	Ratones por grupo.	Total de ratones.
Control (sin infección).	No infectado	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120.	72	460
Infectados.	H37Rv	(9 ratones por grupo por día de sacrificio.	72	
Desmopresina (fase temprana).		14, 21, 28, 45, 60, 90 y 120.	63	
Desmopresina (fase progresiva).		35, 60, 90, 120.	36	
Conivaptan.		3, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120.	72	
Relcovaptan		90, 120.	72	
Tolvaptan.			72	

Tabla 1.- En este primer experimento se estudiará el efecto de los fármacos agonistas y bloqueadores de receptores V1a, V1b y V2 durante el curso de la enfermedad en términos de supervivencia, carga bacilar pulmonar, inflamación, extensión de daño tisular y expresión de citocinas, después de suprimir por separado la actividad vasopresinérgica, durante la fase temprana y progresiva de la TB pulmonar experimental

Condición.	Número de ratones
Experimento.	460
Repetición.	460
Total para 2 experimentos.	920
Total + 8% aproximadamente.	1000

Tabla 2.- Animales necesarios para hacer los experimentos descritos (programados para los próximos 3 años) pronosticando que los fármacos bloqueadores podrían tener un efecto positivo sobre el desarrollo de la enfermedad, este número podría variar.

El cálculo del número de ratones fue determinado usando la fórmula descrita por Amigo, et al. La cual está basada en incidencias seriadas de los procedimientos.

$$X = N / ((A/100) \times (B/100) \times (C/100) \dots)$$

Donde:

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual se parte.

N= Número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos en el proyecto.

A= 100 - % de incidencia 1.

B= 100- % de incidencia 2.

C= 100- % de incidencia 3 y así sucesivamente.

*Como incidencias se tomaron, de acuerdo a la experiencia de nuestro grupo de trabajo el número de animales perdidos por muerte por enfermedad, muerte por aplicación del tratamiento, muerte por anestesia.

Determinación de carga bacilar (unidades formadoras de colonias, UFC).

Se obtendrán los pulmones derechos de 5 ratones de cada grupo en los tiempos de sacrificio mencionados previamente, los cuales se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido, y almacenados a -70°C hasta su procesamiento. Para determinar la carga bacilar por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), brevemente: se descongelan los pulmones y se agrega 500 µL de PBS-tween 0.05%. Se homogeniza el tejido con el sistema FastPrep24 y se lleva la mezcla a un volumen final de 1mL con PBS-Tween 0.05%. En una placa de 96 pozos, se agregan 270µL de PBS-Tween 0.05% en cada pozo a utilizar (para cada pulmón se realizarán 4 diluciones seriadas que van de la -1 a la -4), y se tomarán 30 µL del concentrado de cada muestra (antes de tomar las muestras se deben sonicar por cuarenta y cinco segundos, se aplica vortex inmediatamente después) y se mezclarán por pipeteo 5 veces/cada dilución. Posteriormente se divide una caja petri con medio 7H10, enriquecido con OADC en 8 partes iguales y se sembrarán 10 microlitros de cada dilución en cada una de las partes. Todo el material y los desechos que tuvieron contacto con los tejidos infectados serán inactivados con Clidox™ y tratados como se describió previamente y los procedimientos se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

Análisis histológico e inmunohistoquímica.

De cada grupo de animales sacrificados se obtendrá el pulmón izquierdo de 3 de ellos, cada pulmón será perfundido con etanol absoluto durante el proceso de necropsia. Una vez fijado se incluirá en bloque de parafina, de los cuales se obtendrán cortes histológicos de 4 micras y serán teñidos con Hematoxilina y Eosina (HE). En estas preparaciones se realizará el análisis histológico y morfométrico por medio de la determinación en micras cuadradas de la inflamación perivascular, peribronquial e intersticial, así como el tamaño de los granulomas y el porcentaje de afección neumónica con la utilización de un software para análisis morfométrico Leica ApplicationSuite v4.3.

Para el análisis por inmunohistoquímica (IHQ), de estos bloques se obtendrán cortes que serán montados en laminillas electrocargadas y serán utilizados para la detección de AVP y de los receptores V1a, V1b y V2 por medio de anticuerpos. Para ello, las laminillas serán desparafinadas por incubación a 60°C durante 25 minutos, e hidratadas gradualmente en baños de Xilol, xilol-alcohol, etanol 96°, etanol al 70% y finalmente en agua destilada. Posterior a la hidratación se bloqueará la actividad interna de la peroxidasa y se incubará el corte tejido con el anticuerpo primario durante toda la noche. Seguido por lavados con PBS-Tween 20 e incubación con el anticuerpo secundario marcado con biotina, la detección se hará con el sistema biotina-streptavidina-peroxidasa, el análisis densitométrico de células positivas y negativas en el epitelio bronquial, infiltrado inflamatorio perivascular, peribronquial, intersticial, en los granulomas y áreas neumónicas se hará con el software mencionado previamente. Se obtendrán muestras también de bazo, timo y adrenales las

cuales serán incluidas en parafina y se aplicará el mismo procedimiento para la detección por IHQ y el análisis cinético de la expresión de AVP y sus receptores en dichos órganos.

Cuantificación sérica de vasopresina (Copeptina).

Para la cuantificación de la concentración sérica se utilizará la metodología de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) competitivo, dirigido hacia el glucopéptido señal de AVP, la copeptina(24). El motivo de dicha medición es debido a que la vasopresina al secretarse a la circulación es rápidamente degradada por proteasas plasmáticas y se une a receptores en plaquetas y endotelio lo cual altera la cantidad de la hormona circulante en el plasma siendo un método de detección poco confiable; por el contrario, la copeptina ha mostrado ser un marcador eficiente de la cantidad de vasopresina en circulación pues refleja de manera indirecta la producción de este péptido ya que se secretan de manera equimolar y a diferencia de AVP, la copeptina no es degradada por proteasas plasmáticas y no tiene efectos biológicos conocidos. Brevemente las muestras de suero obtenidas durante el proceso de eutanasia serán colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, centrifugadas a 4°C en el Bioterio de tipo BSL3, los sueros obtenidos serán almacenados en tubos de 0.6ml e inmediatamente congelados a -80°C hasta su uso. Para dicho ensayo se utilizará un kit de ELISA de la marca LifeSpan Biosciences (USA), con placas previamente sensibilizadas en las que serán cargados 50 microlitros (ul) de suero, obtenido durante el proceso de sacrificio de cada ratón; cada muestra será colocada por triplicado. El protocolo de activación de anticuerpos e incubación del método serán realizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se analizará la absorbancia a una densidad óptica de 450 nm en un espectrofotómetro de placas de la marca EPOCH. Los límites de detección de este kit comprenden un rango entre 24.69-2000 pg/ml.

Cuantificación de la expresión del gen de AVP.

Para esta etapa del experimento, los pulmones izquierdos de 3 ratones de cada grupo serán obtenidos y almacenados en tubos MP se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente a -70°C. Para el análisis por RT-qPCR, se purificará el RNA total de cada pulmón. Brevemente, el tejido es homogenizado con perlas de sílice y zirconia, usando el sistema MP fast prep24; se obtiene el RNA con ayuda del kit de extracción RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Mexico). La Calidad y cantidad de RNA será evaluada mediante espectrofotometría (260/280) por un espectrofotómetro de placas EPOCH (BioTek instruments, USA) y mediante PCR de punto final en gel de agarosa. Se realizará la retrotranscripción del RNAm utilizando 5 ug de RNA, oligo -dT y Omniscript Kit (Qiagen, México). La PCR en Tiempo Real se realizara empleando el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) y se cuantificara utilizando la tecnología Quantitech Sybr Green Master Mix (Qiagen). Se utilizará el método de cuantificación absoluta para lo cual se realizará una curva estándar (1×10^9 hasta 1×10^2) para cuantificar el número de copias. Se usarán primers específicos diseñados con el programa Primer-Express (Applied Biosystem) para AVP y sus tres receptores en la primer parte del experimento. Se utilizarán los

siguientes oligonucleotidos: (GCTGCCAGGAGGAGAACTAC y AAAAACCGTCGTGGCACTCG) para AVP; (AATGAATTCATGAGTTTCCC GCGAGGC y TCCGGATCCAGTGGAGACAGGGTAAA) para V1a; (CAAGAATTCATGGATTCTGAGCCTTCT y AACGGATCCAGAGATGCTGGTCTCCAT) para V1b y para V2 (ATGATCCTGGTGTCTACCAC y TAGAAAGAGCCCAGTAGCTAC). Además, se cuantificarán en la posterior a la manipulación farmacológica de la AVP, genes de citocinas como: TNF, IL-1, IFN, IL-12, IL-17, IL-10, IL-4, TGF y la enzima iNOS para determinar el efecto de AVP sobre las mismas. Bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos. El número de copias de AVP y sus receptores, además de cada citocina se normalizará a un millón de copias de RNAm de un gen constitutivo. Todo el material y los desechos que tuvieron contacto con los tejidos infectados serán inactivados con Clidox™ y tratados como se describió previamente y los procedimientos se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III.

Administración de fármacos agonistas y antagonistas de receptores de AVP.

Los fármacos serán administrados durante toda la infección en algunos casos, o bien, en la fase progresiva de la TB en otros. En el caso de la Desmopresina (dDAVP), un análogo del receptor V2, se administrará por vía intratraqueal cada día a una dosis de 2 µg/kg, 7 días previos a la infección con Mtb para conocer los efectos en la fase temprana de la enfermedad. En otro grupo experimental se administrará este fármaco en la misma dosis durante la fase progresiva de la enfermedad, para evaluar su efecto sobre el sistema inmune en esta etapa de la TB. Los demás fármacos se administrarán por vía intragástrica (i.g.) siguiendo la siguiente técnica: Se sujeta al ratón por la cola y la parte superior de la cabeza para poner en posición recta el esófago; se introduce la cánula mencionada anteriormente con punta roma y se vierte el contenido a la cavidad gástrica; las dosis utilizadas para este experimento de cada fármaco serán: Conivaptan (1mg/kg de peso) 1 vez al día; Tolvaptan (1 mg/Kg); Relcovaptan (2 mg/Kg).

Referencias.

1. Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2014;
2. Di Comite G, Grazia Sabbadini M, Corti A, Rovere-Querini P, Manfredi A a. Conversation galante: How the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmun Rev*. 2007;7(1):23–9.
3. Quintanar A, Campos-rodr R. Vasopressin and Immune Function. 2011;1:143–56.
4. Chikanza IC, Grossman a S. Hypothalamic-pituitary-mediated immunomodulation: arginine vasopressin is a neuroendocrine immune mediator. *Br J Rheumatol*. 1998;37(2):131–6.
5. Kochman K. Neurohormones : oxytocin , vasopressin and related peptides – structure , genes , receptors , and evolution. 2013;283–94.
6. Ekman R, Gobom J, Persson R, Mecocci P, Nilsson CL. Arginine vasopressin in the cytoplasm and nuclear fraction of lymphocytes from healthy donors and patients with depression or schizophrenia. *Peptides*. 2001;22(1):67–72.
7. Chowdrey HS, Lightman SL, Harbuz MS, Larsen PJ, Jessop DS. Contents of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin immunoreactivity in the spleen and thymus during a chronic inflammatory stress. *J Neuroimmunol*. 1994;53(1):17–21.
8. Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, et al. Vasopressin : a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res*. 1998;24(3-4):703–10.
9. Koshimizu T -a., Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue a. Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1813–64.
10. Maybauer MO, Maybauer DM, Enkhbaatar P, Traber DL. Physiology of the vasopressin receptors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2008;22(2):253–63.
11. Palin K, Moreau ML, Sauvant J, Orcel H, Nadjar A, Duvold-Guillou A, et al. Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6):E1289–99.
12. Peng TC, Huang CJ. Vasopressin inhibits endotoxin-induced upregulation of inflammatory mediators in activated macrophages. *Tzu Chi Med J*. Elsevier Taiwan LLC; 2013;25(3):150–4.
13. Khegai II, Gulyaeva M a., Popova N a., Zakharova L a., Ivanova LN. Immune system in vasopressin-deficient rats during ontogeny. *Bull Exp Biol Med*. 2003;136(5):448–50.

14. Torres B a, Johnson HM. Arginine vasopressin (AVP) replacement of helper cell requirement in IFN-gamma production. Evidence for a novel AVP receptor on mouse lymphocytes. *J Immunol.* 1988;140(7):2179–83.
15. Berczi I, Quintanar-Stephano A, Kovacs K. Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1153:220–39.
16. Guetta J, Klorin G, Tal R, Berger G, Ismael-Badarneh R, Bishara B, et al. Vasopressin-2 receptor antagonist attenuates the ability of the lungs to clear edema in an experimental model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):583–8.
17. Boyd JH, Holmes CL, Wang Y, Roberts H, Walley KR. Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R. *Resuscitation.* 2008;79(2):325–31.
18. Esposito P, Piotti G, Bianzina S, Malul Y, Dal Canton A. The syndrome of inappropriate antidiuresis: Pathophysiology, clinical management and new therapeutic options. *Nephron - Clin Pract.* 2011;119(1).
19. Lee P, Ho KKY. Hyponatremia in pulmonary TB: Evidence of ectopic antidiuretic hormone production. *Chest.* 2010;137(1):207–8.
20. Jafari NJ, Izadi M, Sarrafzadeh F, Heidari A, Ranjbar R, Saburi A. Hyponatremia due to pulmonary tuberculosis: Review of 200 cases. *Nephrourol Mon.* 2013;5(1):687–91.
21. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, Del Rey A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(2):68–77.
22. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci.* Elsevier Inc.; 2013;53:77–85.
23. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri a, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996;89(1):26–33.
24. ??ukaszuk E, Ma??yszko J. Copeptin: Pathophysiology and potential clinical impact. *Adv Med Sci. Medical University of Bialystok;* 2015;60(2):335–41.

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**