



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Médicas

Tesis Doctoral

**“La relación inmuno-endócrina en pacientes
con Tuberculosis y Diabetes mellitus”**

Lic. Rocío del Valle Fernández

2019

Dirección: Dra. María Luisa Bay

Co-dirección: Dr. Luciano D’Attilio

Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)

CONICET-UNR

A Chiche...

Publicaciones relacionadas con el tema de Tesis

L. D'Attilio, A. Díaz, **R.D.V Fernández**, B. Bongiovanni, N. Santucci, G. Dídoli, S. Lioi, W. Gardeñez, J. L. Naninni, A. del Rey, H. Besedovsky, O. Bottasso, M. L. Bay. **"The neuro-endocrine-immune relationship in pulmonary and pleural tuberculosis: a better local profile in pleural fluid"**. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease (France)* 2018.

S.V. Spinelli, **R.D.V. Fernández**, L. Zoff, B. Bongiovanni, A. Díaz, L. D'Attilio, N. Santucci, T. Alvarez, M.M. Marchesini, C. Bogue, M. Bay, O.A. Bottasso. **"miR-30c is specifically repressed in patients with active pulmonary tuberculosis"**. *Tuberculosis Journal (Edinburg)* 2017.

A. Díaz, B. Bongiovanni, L. D'Attilio, N. Santucci, G. Dídoli, **R.D.V. Fernández**, L. Kovalevski, S. Lioi, W. Gardeñez, N. Brandan, L.J. Nannini, H. Besedovsky, A. del Rey, O. Bottasso and M.L. Bay. **"The clinical recovery of tuberculosis patients undergoing specific treatment is associated with changes in the immune and neuroendocrine responses"**. *Pathogens and Disease (Oxford University)* 2017.

R. Fernández*, A. Díaz*, L. D'Attilio, B. Bongiovanni, N. Santucci, D. Bertola, H. Besedovsky, A. del Rey, M.L. Bay, O. Bottasso. **"An adverse immune-endocrine profile in patients with tuberculosis and type 2 diabetes"**. *Tuberculosis Journal (Edinburg)* 2016.

Presentaciones en reuniones científicas

Disertación oral. Fernández Rocío DV, Díaz Ariana, Bongiovanni Bettina, Pitasny Vanesa, Hails Emilia, D'Attilio Luciano, Bottasso Oscar, Bay María Luisa. **"Concentraciones elevadas de glucosa modulan la expresión de PPAR α y PPAR γ en macrófagos estimulados con Mtb y adicionados o no con cortisol"**. IX Simposio de Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis (SLAMTB) y XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Santiago de Chile, Chile Noviembre 2018.

Rocío Fernández, Ariana Díaz, Bettina Bongiovanni, Diego Bértola, Walter Gardeñez, María V. Pent, María L. Bay, Oscar Bottasso and Luciano D'Attilio. **"Evidence that normal to high glucose supplementation modifies the inhibitory effect of cortisol on the in vitro anti-TB response"**. *XII Congress of the Latin American Association of Immunology & XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology*. Cancún, México. 2018.

Rocío del Valle Fernández, Ariana Díaz, Luciano D'Attilio, Bettina Bongiovanni, Oscar Bottasso and María Luisa Bay. **"Effect of hyperglycemia and cortisol-mediated stress on inflammatory response and PPAR γ expression in macrophages derived from THP1 line stimulated with Mtb"**. *Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias*. Buenos Aires, Argentina. 2017.

Fernández, Rocío del Valle; Díaz, Ariana; Bongiovanni, Bettina; Santucci, Natalia; Bértola Diego; Bay María L; D'Attilio, Luciano y Bottasso Oscar. **"La respuesta inmuno-endocrina en pacientes diabéticos con tuberculosis pulmonar"**. *XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos-CLAMME y Reunión de la SLAMTB*. Rosario, Argentina. 2016.

Fernández, Rocío del Valle; D'Attilio, Luciano; Santucci, Natalia; Cerliani, Juan P.; Pochettino Arístides; Bértola Diego; Bottasso Oscar; Ravinovich Gabriel and Bay María L. **"Levels of gal-1 and gal-3 in plasma and pleural fluids from patients with tuberculosis, and its relation with immune-endocrine parameters"**. *IV LASID Meeting, LXIII Argentinean Society for Immunology Meeting, and II French Society for Immunology Meeting. Sociedad Argentina de Inmunología*. Buenos Aires, Argentina. 2015.

Fernández, Rocío del Valle; D'Attilio, Luciano; Díaz, Ariana; Bongiovanni, Bettina; Santucci, Natalia; Bottasso Oscar; Bay María L. **"Efectos de la hiperglicemia y el cortisol en la modulación de la respuesta in vitro de células mononucleares sanguíneas estimuladas con Mycobacterium tuberculosis"**. *XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Sociedad de Biología de Rosario*. Rosario, Argentina. 2015.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 Tuberculosis. Generalidades	5
1.2 Epidemiología	5
1.2.1 Diabetes como factor de riesgo para la tuberculosis.....	6
1.3 Transmisión y sintomatología de la tuberculosis	7
1.4 Diagnóstico: algunas consideraciones.....	8
1.5 Prevención y Tratamiento	9
1.6 Aspectos patogénicos y clínicos de la tuberculosis.....	11
1.7 El granuloma en tuberculosis	12
1.8 Respuesta inmune frente a <i>Mtb</i>	14
1.8.1 Mecanismos de la inmunidad innata contra <i>Mtb</i>	14
1.8.2 Mecanismos de la inmunidad adquirida contra <i>Mtb</i>	21
1.8.3 Citocinas relevantes en la infección con <i>Mtb</i>	24
1.9 ¿Cómo la inflamación crónica en la DBT contribuye a la desregulación del SI?	29
1.9.1 Inmunidad innata frente a <i>Mtb</i> de un huésped con la comorbilidad TB-DBT	30
1.9.2 Inmunidad adaptativa frente a <i>Mtb</i> de un hospedero TB-DBT.....	31
1.9.3 Disfuncionalidad de la RI frente a <i>Mtb</i> en pacientes DBT	33
1.10 Interacción neuroinmunoendócrina	33
1.10.1 Glucocorticoides.....	34
1.10.2 Dehidroepiandrosterona	39
1.10.3 Interrelación inmuno-endócrina-metabólica	41
1.11 Construcción de la hipótesis de trabajo	44
2 OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo general	48
2.2 Objetivos específicos	48
3 MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 Grupos de estudio	51
3.1.1 Pacientes con TB (con y sin diabetes tipo 2)	51
3.1.2 Controles sanos (HCo)	51
3.1.3 Pacientes con DBT sin TB.....	52

3.2	Parámetros clínicos y bioquímicos	52
3.3	Recolección de muestras y separación de células mononucleares periféricas.....	53
3.4	Análisis de la capacidad proliferativa de las CMP de los distintos voluntarios.....	54
3.5	Determinación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo	54
3.6	Determinación de células T reguladoras.....	55
3.7	Cuantificación de citocinas, hormonas y otros factores	55
3.8	Modulación de la respuesta al <i>Mtbi</i> por cortisol y/o glucosa.....	55
3.9	Detección de citocinas de los patrones Th1/Th2/Th17 por citometría de flujo	56
3.10	Cultivo de la línea celular THP1.....	56
3.11	Cuantificación de la apoptosis inducida por variaciones osmóticas y/o elevadas concentraciones de glucosa sobre CMP y Mø derivados de la línea THP-1 estimuladas o no con <i>Mtb</i> .	57
3.12	Cuantificación en tiempo real de los ARNm de GR α , GR β , 11 β HSD1, 11 β HSD2, PPAR γ y PPAR α	58
3.12.1	Protocolo general	58
3.12.2	Diseño de cebadores	59
3.12.3	Condiciones de reacción de la retrotranscripción.....	59
3.12.4	Condiciones de reacción de la PCR en tiempo real (PCRq)	60
3.13	Análisis estadísticos.....	60
4	RESULTADOS	65
4.1	Análisis de la interrelación inmuno-endócrino-metabólica en el contexto de la comorbilidad Tuberculosis-Diabetes mellitus	65
4.1.1	Características generales y parámetros clínicos de la población en estudio	65
4.1.2	Análisis de la capacidad proliferativa específica de las CMP de los distintos grupos en estudio	73
4.1.3	Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.....	73
4.1.4	Cuantificación en plasma de mediadores y hormonas	76
4.1.5	Niveles relativos de expresión de los ARNm de GR α , GR β , PPAR γ , PPAR α y de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en CMP de los distintos grupos en estudio.....	86
4.1.6	Análisis multivariado de componentes principales.....	90
4.2	Efecto del cortisol y/o glucosa sobre la respuesta inmune de las células mononucleares periféricas frente a <i>Mtb</i>	92
4.2.1	Estudio de la capacidad linfoproliferativa	93
4.2.2	Cuantificación de mediadores en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares periféricas.....	97

4.2.3	Correlaciones entre los niveles de citocinas e IE de los cultivos de CMP estimulados con <i>Mtbi</i> en condiciones o no de hiperglicemia y tratados o no con cortisol	103
4.3	Efecto del cortisol y la glucosa sobre la respuesta inducida por <i>Mtb</i> en macrófagos derivados de la línea celular THP1	104
4.3.1	Modulación de la expresión de PPAR α y PPAR γ y producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10	104
5	DISCUSIÓN	110
5.1	Análisis de la interrelación inmuno-endócrino-metabólica en el contexto de la comorbilidad Tuberculosis-Diabetes mellitus	110
5.2	Respuesta inmune de células mononucleares periféricas y macrófagos frente a antígenos de <i>Mtb</i> en un ambiente hiperglicémico y/o de estrés mediado por cortisol	122
5.2.1	Efecto del cortisol y/o glucosa sobre la respuesta inmune de las células mononucleares periféricas frente a <i>Mtb</i>	122
5.2.2	Efecto del cortisol y la glucosa sobre la respuesta inducida por <i>Mtb</i> en macrófagos derivados de la línea celular THP1	127
6	CONCLUSIONES	133
	RESUMEN	137
7	BIBLIOGRAFÍA	138
	ANEXO	I

ABREVIATURAS

11 β HSD1	11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 1
11 β HSD2	11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 2
ACTH	Hormona Adrenocorticotrofina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
AGE	Productos finales de glicación avanzada
AGL	Ácidos grasos libres
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CCL2	Ligando de quimiocina 2
CD	Células dendríticas
CLI	Célula linfoide innata
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMP	Células mononucleares periféricas
ConA	Concanavalina A
CPA	Células presentadoras de antígenos
cpm	Cuentas por minuto
CR3	Receptor de complemento 3
CRP	Proteína C reactiva
CycA	Peptidilpropil isomerasa A
DBT	Diabetes mellitus tipo 2
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona sulfato
ENT	Enfermedad no transmisible
ERS	Velocidad de eritrosedimentación
FcyR	fracción cristalizable de la inmunoglobulina G
GC	Glucocorticoide
hGH	Hormona de crecimiento
Glc	Glucosa
GLUT	Transportadores de glucosa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elementos de respuesta específicos de glucocorticoides
GR α	Receptor de glucocorticoides alfa
GR β	Receptor de glucocorticoides beta
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCo	Sujetos sanos
GH	Hormona de crecimiento humana
HMGB1	Prote3na del Grupo de Alta Movilidad Box1
HPA	Eje hipotal3mico pituitario adrenal
IE	3ndice de estimulaci3n
IFN- γ	Interfer3n Gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	3ndice de masa corporal
iNOS	Sintasa inducible de 3xido n3trico
LT	Linfocitos T
M1	Macr3fagos activados de manera cl3sica
M2	Macr3fagos activados de modo alternativo
MCC	Medio de cultivo completo
M ϕ	Macr3fagos
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtbi</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37Rv muerto por radiaci3n gamma
NE	Neutr3filos
NFAT	Factor nuclear de las c3lulas T activadas
NK	C3lulas citot3xicas naturales
NLR	Receptor de tipo NOD
NO	3xido n3trico
NPV	N3cleo paraventricular
OMS	Organizaci3n Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a pat3genos
PBS	Soluci3n salina de buffer fosfato
PCR	Reacci3n en cadena de la polimerasa

PPAR	Factor de Proliferación Peroxisomal
PPAR α	Factor de Proliferación Peroxisomal isoforma alfa
PPAR $\beta\delta$	Factor de Proliferación Peroxisomal isoforma beta delta
PPAR γ	Factor de Proliferación Peroxisomal isoforma gamma
PPD	Derivado proteico purificado
RFA	Respuesta de fase aguda
RI	Respuesta Inmune
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRP	Receptores de reconocimiento de patrón
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SI	Sistema Inmune
STS	Enzima sulfatasa
SULT2A1	Enzima sulfotransferasa de la familia 2A miembro 1
TAB	Tejido adiposo blanco
TAV	Tejido adiposo visceral
TB	Tuberculosis
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T colaboradores de tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores de tipo 2
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
Treg	Células T reguladoras
TZD	Tiazolidinedionas
VIH	Virus de inmunodeficiencia human

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis. Generalidades

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica causada por el agente de vida intracelular *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, también conocido como bacilo de Koch¹.

Se calcula que una tercera parte de la población mundial presentaría TB latente; es decir, estarían infectadas por el bacilo, pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. Sin embargo, aproximadamente un 10% de las personas infectadas con la micobacteria desarrolla la enfermedad en algún momento de su vida. Este porcentaje asciende a un 10% de riesgo anual en aquellas personas que se encuentran inmunocomprometidas, como ocurre en casos de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), desnutrición, diabetes, entre otros¹.

1.2 Epidemiología

En la actualidad la TB continúa siendo un importante problema de salud pública. Es la novena causa de muerte a nivel mundial y la primera por enfermedades infecciosas. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 10 millones de personas contrajeron TB en 2017 (90% adultos, 64% hombres, 9% personas coinfectadas con VIH) mientras que se registraron 1,3 millones de muertes asociadas a esta enfermedad, sin considerar aquellas ocasionadas por la coinfección TB-VIH².

En nuestro país, de acuerdo con Boletín sobre Tuberculosis de marzo de 2018, se notificaron 11.560 casos en el año 2016, generándose un nuevo aumento en la tasa de notificación de casos, particularmente en lo que respecta a 2015 de 24,9 a 26,5 cada 100.000 habitantes. Asimismo se evidenció una alta carga en aquellas jurisdicciones con situaciones socioeconómicas desfavorables, a la par de un constante incremento en aquellas jurisdicciones altamente urbanizadas y de gran concentración poblacional en circunstancias de vulnerabilidad. Con respecto a las muertes por TB, se reportaron 757, un 5% más que en 2015. El riesgo de muerte es mayor en los hombres y si bien aumenta con la edad, dos de cada tres muertes ocurren en personas menores de 65 años³.

En nuestra provincia, se notificaron 606 casos de TB en el año 2017, siendo el departamento de Rosario el más comprometido, donde las categorías de nuevos casos y recaídas fueron las de

mayor peso, estos son los que marcan el comportamiento epidemiológico de la TB ya que se consideran como producto de la transmisión del bacilo en la comunidad.

De los casos de TB entre un 10 y 20% se le atribuyen a la comorbilidad TB-diabetes. En países como México e India, donde ambas patologías son endémicas, el riesgo poblacional alcanza el 20%. Un estudio que utilizó modelos dinámicos de transmisión de la TB analizó los efectos potenciales de la diabetes en la epidemiología de la TB de 13 países con alta carga de TB. Concluyeron que controlando el incremento de pacientes diabéticos se podrían evitar 6 millones de casos de TB y 1.1 millones de muertes debido a esta patología, en 20 años⁴.

La mayor parte de los estudios sobre esta comorbilidad son observacionales, con pocos estudios de cohorte, principalmente retrospectivos basados en archivos médicos. Es por ello por lo que inferir acerca de la direccionalidad sobre la asociación no resulta fácil. A pesar de ello, la mayor parte de la información disponible apoya que la diabetes precede a la TB, sin embargo aquellos estudios más exhaustivos indicarían que la diabetes en sí misma no sería el factor de riesgo para el desarrollo de esta patología sino aquellos individuos que presentan un mal control de su metabolopatía⁵⁻⁷.

1.2.1 Diabetes como factor de riesgo para la tuberculosis

La diabetes es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales del siglo XXI y, al igual que la TB, se encuentra entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial. Junto con las otras tres principales enfermedades no transmisibles (ENT- enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias) representa más del 80% de todas las muertes prematuras por ENT. Uno de los principales potenciadores del problema de la diabetes es que entre un 30 y un 80% de las personas con esta patología no están diagnosticadas⁸.

El incremento global de esta ENT se ha convertido en un factor de riesgo reemergente para la TB. Aquellos individuos con diabetes tienen 3 veces más riesgo de desarrollar TB con respecto a individuos sin esta patología⁹⁻¹¹, mientras que al contraer la enfermedad las posibilidades de tener un tratamiento anti-TB eficaz son menores¹² Según el último reporte de la OMS, 0.79 millones de casos de TB se debieron a esta patología en 2017².

La asociación entre estas patologías fue descrita por primera vez por Avicena, un médico y filósofo persa del siglo X. Fue tema de intensos debates médicos a principios del siglo XX^{13,14}, pero con el advenimiento de la insulina como tratamiento para los pacientes diabéticos, sumado al descubrimiento de los antibióticos para la TB, la cuestión perdió relevancia.

En la actualidad se señala un incremento de la prevalencia global de la diabetes del 20% en menos de 30 años y se estima que para el año 2045 el número de pacientes diabéticos será de

630 millones. Aproximadamente entre el 85-95% de los casos globales de la diabetes se le atribuye a la diabetes mellitus tipo 2 (DBT). A pesar que la creciente incidencia es ampliamente reconocida en países con ingresos altos, aproximadamente el 80% de las personas con diabetes viven actualmente en países de ingresos bajos y medianos, con la predicción de los mayores incrementos en estas regiones donde a su vez la TB es endémica⁸.

1.3 Transmisión y sintomatología de la tuberculosis

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

La TB pulmonar activa representa alrededor del 80 al 85% del total de los casos. Se presenta con signos respiratorios como tos seca (a veces con esputo sanguinolento), dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna¹⁵. La TB también puede presentarse bajo la forma extrapulmonar. Ésta representa entre el 15 al 20% de todos los casos de la patología, viéndose en más del 50% de los pacientes en poblaciones inmunodeprimidas. Las formas más frecuentes son la pleural y la ganglionar, seguidas por la genitourinaria. Los síntomas dependerán de los órganos afectados¹⁵.

En adultos, la TB afecta principalmente a individuos jóvenes, es decir, en la edad más productiva, pero todos los grupos de edad están en riesgo. Más del 95% de los casos y las muertes se registran en los países en desarrollo.

En lo que respecta a la comorbilidad, los pacientes TB-DBT presentan un perfil muy diferente respecto de los pacientes únicamente con TB, son individuos con mayor edad, con

presencia de obesidad, entre otras metabopatías, y mayormente de género femenino, los cuales no son considerados factores clásicamente asociados a la TB como el consumo excesivo de alcohol, drogas, encarcelamiento o VIH¹⁶.

1.4 Diagnóstico: algunas consideraciones

El diagnóstico de TB implica la identificación del agente causal en muestras de secreciones orgánicas o de tejidos. La placa de tórax es un elemento complementario para la identificación de esta patología, no sólo porque es imposible discriminar con certeza las lesiones activas de las inactivas sino también porque es poco específica ya que las imágenes radiológicas que genera la TB (infiltrados, nódulos, cavidades, fibrosis y retracciones) pueden ser producidas por otras patologías respiratorias y enfermedades sistémicas¹⁷. Por lo tanto esta técnica suele utilizarse para clasificar el grado de compromiso pulmonar presentado por los pacientes.

La **baciloscopia** es la técnica diagnóstica más práctica y la más utilizada en los países en desarrollo. Identifica la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes, directamente de la muestra de esputo mediante la tinción clásica de Ziehl-Neelsen. En simultáneo se realiza un **cultivo** de la muestra de esputo del paciente, en medios sólidos (durante 6-8 semanas de incubación) o en medios líquidos (acortan en 2-3 semanas la detección de las micobacterias). Esta es una técnica de mayor sensibilidad que la baciloscopia, pero requiere de más tiempo y es más compleja^{17,18}.

Podemos encontrar un conjunto de pruebas no convencionales para el diagnóstico de la TB, aunque ninguna cumple con las condiciones ideales de bajo costo, simplicidad, sensibilidad y especificidad. Estas pruebas incluyen: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía gaseosa, cuantificación de Adenosina Deaminasa y dosaje de anticuerpos por técnica de Elisa¹⁷. También están los llamados IGRA (*interferon gamma release assays*), que detectan la liberación de Interferón Gamma (IFN- γ) por los linfocitos en respuesta a antígenos micobacterianos específicos, que suelen utilizarse como ayuda en el diagnóstico de infección latente y de enfermedad tuberculosa.

Actualmente la OMS recomienda la utilización de una prueba rápida Xper[®]MTB/RIF, que permite detectar cepas del complejo *Mtb* y resistentes a rifampicina mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Es una técnica rápida (resultados en 2h) y eficiente que permite instaurar el tratamiento más tempranamente sin embargo presenta sus limitaciones ya que un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables¹⁹.

La reacción de PPD (Derivado proteico purificado), también llamada prueba de Mantoux es de poca ayuda diagnóstica, ya que determina infección y no enfermedad. Entre el 10 al 20% de las formas de TB pueden aparecer como anérgicas (no reactivas) a la tuberculina, ya sea por mala realización de la técnica o por enfermedades que producen inmunodepresión, como infección por VIH, insuficiencia renal, malnutrición, etc. Además, esta técnica no permite distinguir una reacción inducida por la vacuna BCG (Bacilo Calmette-Guerin) de otra causada por una infección natural, por lo que no es de gran utilidad en países donde la vacunación con BCG es obligatoria, como sucede en Argentina. La prueba suele utilizarse: como índice epidemiológico de infección por *Mtb*, para detectar infecciones recientes por el viraje tuberculínico y para evidenciar la infección con la micobacteria en personas con alto riesgo de progresar hacia enfermedad¹⁷.

Hasta el momento, los pocos estudios realizados en pacientes DBT para evaluar la *performance* de algunas de las pruebas como la de PPD e IGRA no han sido concluyentes en la modificación de la sensibilidad de las mismas^{20,21}.

1.5 Prevención y Tratamiento

La inmunización profiláctica es una estrategia clave para reducir la incidencia de la TB. La vacuna BCG, creada hace más de 90 años, es la única con licencia hasta el momento. Se prepara a partir de cultivos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis* que ha perdido su virulencia en cultivos artificiales, manteniendo su poder antigénico. La misma se aplica a neonatos y lactantes en regiones de todo el mundo donde la tasa de morbilidad por TB es alta, siguiendo las indicaciones del programa de expansión de inmunización de la OMS. Se ha documentado el efecto protector en niños de la vacuna BCG contra la meningitis tuberculosa y la TB diseminada sin embargo no evita la infección primaria y, lo que es más importante, no previene la reactivación de la infección pulmonar latente, la principal fuente de propagación del bacilo en la comunidad. El efecto de las vacunas BCG en la transmisión de *Mtb* es, por consiguiente, limitado.

Hasta que se disponga de una mejor vacuna para prevenir la TB, la lucha contra la propagación de esta enfermedad continuará basándose en los instrumentos disponibles actualmente: el diagnóstico temprano, la terapia supervisada y el tratamiento preventivo adecuado, así como en medidas de salud pública y de lucha contra la infección².

La TB es una enfermedad crónica en esencia, aunque se puede lograr la curación si se cumple con el tratamiento adecuado. Existen medicamentos de primera y segunda línea:

- Los medicamentos de primera línea, principales, o esenciales son: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Estreptomina y Etambutol. Estos fármacos son efectivos en la mayoría de los casos y logran la curación de los pacientes en un periodo de seis meses o más de acuerdo con la categoría de la enfermedad.
- Los medicamentos de segunda línea o subsidiarios se utilizan en caso de reacciones adversas y resistencia a fármacos tradicionales.

La forma activa que es sensible a los antibióticos se trata, generalmente con una combinación estándar de cuatro de estos medicamentos administrados durante seis meses en total junto con información, supervisión y apoyo del paciente por un agente sanitario o un voluntario capacitado. Si no se proporcionan supervisión y apoyo, el cumplimiento terapéutico puede ser difícil y, como consecuencia, la infección puede progresar.

Los medicamentos antituberculosos corrientes se han venido usando por décadas y la resistencia a ellos está aumentando. En todos los países estudiados se ha comprobado la existencia de cepas del bacilo que presentan resistencia a por lo menos un medicamento antituberculoso²².

Hasta el momento la asociación entre TB resistente y multirresistente en la comorbilidad TB-DBT no ha sido esclarecida. Un metaanálisis realizado en 2011, en base a 4 estudios, no encontró una presencia en particular de resistencia o multirresistencia en aquellos pacientes TB-DBT vs TB²³.

Sin embargo, existe evidencia de diversos estudios observacionales donde la comorbilidad se ha asociado a una mala respuesta al tratamiento anti-TB específicamente retrasándose el *clearance* micobacteriano. Esto podría deberse a dos aspectos: el control deficiente de los niveles de glucosa (Glc), los cuales se ha visto comprometen la respuesta inmune (RI) frente a *Mtb* en los pacientes DBT y por lo tanto es probable que reduzca la eficacia del tratamiento antimicobacteriano. La hiperglicemia también podría evitar la muerte del *Mtb* al afectar la microvasculatura y reducir la perfusión del tejido pulmonar para una vigilancia inmune óptima. La OMS recomienda, según la información disponible, que se realice un control optimizado de la glicemia en aquellos pacientes con la comorbilidad; el segundo aspecto podría deberse a niveles plasmáticos subóptimos de los antibióticos antimicobacterianos²⁴, sin embargo es necesario que se realicen estudios más exhaustivos.

Con la información disponible, un grupo de médicos clínicos expertos en el tema, han desarrollado recientemente una serie de lineamientos a seguir en el tratamiento de la TB en pacientes DBT. En líneas generales se recomienda principalmente:

- Realizar un *screening* de diabetes a todo paciente con TB recientemente diagnosticado con una edad >45 años, con índice de masa corporal (IMC) >25, antecedente familiar de primer grado en DBT, y de etnias como afroamericana, hispana, entre otras.
- Sumar piridoxina junto con la isoniacida, dado el alto riesgo de neuropatías.
- Extender la segunda fase del tratamiento hasta los 7 meses, con un tratamiento anti bacilar que se completaría a los 9 meses²⁵.

1.6 Aspectos patogénicos y clínicos de la tuberculosis

En las etapas iniciales la TB se manifiesta como una respuesta inflamatoria alveolar no específica, que progresa hacia una reacción de tipo granulomatosa¹⁷. El foco es casi siempre de localización subpleural generalmente ubicado en la zona media de los pulmones donde el mayor flujo aéreo favorece el establecimiento de los bacilos inhalados¹⁵.

La TB puede presentarse en tres estadios: primaria, latente y post primaria. La primera es la infección que se presenta en una persona que no ha tenido contacto previo con el *Mtb*; suele ocurrir durante la infancia y frecuentemente cursa como una enfermedad asintomática y autolimitada, excepto bajo ciertas circunstancias donde puede progresar causando meningitis o TB diseminada, especialmente en individuos muy jóvenes o inmunodeprimidos. La respuesta temprana del hospedero frente a la infección está caracterizada por la afluencia de células fagocíticas, que incluyen principalmente a los macrófagos (M ϕ) alveolares, células dendríticas (CD) y neutrófilos (NE). Los bacilos internalizados por los fagocitos pueden ser inmediatamente eliminados o crecer en el medio ambiente intracelular en lesiones localizadas. Dos a tres semanas después de la infección se establece la inmunidad celular, y la subsecuente infiltración de M ϕ y linfocitos activados en la lesión, lo que conduce a la eliminación de la mayor parte de los bacilos y a la finalización de la infección primaria, habitualmente sin la presencia de síntomas clínicos. En casos de este tipo (donde la RI del hospedero es eficiente), la lesión es contenida, pudiendo o no causar daño residual en los pulmones¹⁵.

La TB post primaria, también conocida como secundaria es la fase de la infección que se produce en una persona previamente sensibilizada, tanto si los bacilos provienen de origen endógeno (reactivación) o exógeno (reinfección). El desarrollo de una TB post primaria como ya se expresó ocurre en un 5%-10% de las personas con una infección latente. Una respuesta inefectiva al control de la multiplicación bacilar lleva a una evolución inadecuada del granuloma con la aparición de necrosis caseosa seguida de formación de cavidades, y a una diseminación

del material infeccioso a través de los bronquios, que habitualmente se eliminan con el esputo. La enfermedad comienza como un proceso inflamatorio exudativo con características neumónicas y a medida que progresa aparecen los síntomas típicos de la TB previamente detallados. La caseificación y la cavitación se presentan con posterioridad, principalmente en los lóbulos superiores. Si la infección progresa de forma aguda, su pronóstico empeora y puede generar una amplia destrucción de tejidos. Por el otro lado, si el infiltrado inicial progresa hacia cronicidad, el proceso podría estabilizarse con el desarrollo de fibrosis. En esta etapa los enfermos podrían sobrevivir por varios años, con recurrentes episodios de hemoptisis.

Según diversos reportes, los pacientes con TB-DBT junto con la mayor predisposición a desarrollar una TB activa presentan resultados más desfavorables de la misma como: compromiso de las regiones inferiores del pulmón, presencia de lesiones cavitadas, mayor carga bacilar en el esputo, la cual perdura luego de iniciado el tratamiento anti bacilar, y una probabilidad 4 veces mayor de recaer o presentar una mortalidad más elevada^{23,26}.

1.7 El granuloma en tuberculosis

La TB es una infección esencialmente pulmonar y es en este órgano donde la micobacteria se pone en contacto con las células allí residentes. Algunos individuos no muestran signos de la infección: ausencia de patología, sin síntomas clínicos y sin la aparente presencia de la RI adaptativa. Es posible que en estas situaciones la RI innata haya eliminado al bacilo, en un estadio temprano, por completo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la internalización de la micobacteria por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) induce una respuesta inflamatoria. La liberación de citocinas y quimiocinas provoca la rápida acumulación de una gran variedad de células inmunes, y con el tiempo, la formación de una estructura conocida como granuloma²⁷.

El granuloma es el resultado de la interacción local entre la bacteria y las células del hospedero dentro del sitio de la infección. Esta estructura presenta un rol dual, por un lado crea un microambiente inmunológico en el que la infección puede ser controlada, sin embargo en algunos casos también le proporciona a la bacteria un nicho donde puede modular la RI para asegurar su supervivencia durante largos períodos de tiempo²⁸. La formación de esta estructura es un proceso dinámico que comienza poco después de la infección y evoluciona continuamente con el tiempo. Uno de los factores más importantes que se requieren para el establecimiento de la infección es un equilibrio entre las citocinas pro- y antiinflamatorias, producidas para reducir o controlar la proliferación bacteriana. Entre los primeros mediadores

los que más se destacan son el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) y el IFN- γ , ambos importantes para promover la formación y función del granuloma, mientras que la Interleucina 10 (IL-10) es uno de los principales reguladores negativos de la respuesta.

El granuloma consiste en una lesión anatomopatológica bien estructurada y organizada, que constituye un agregado multicelular dinámico donde predominan desde el centro hacia la periferia los M ϕ en diferentes estadios de activación y diferenciación (células gigantes multinucleadas, células espumosas y células epitelioides), NE y linfocitos T (LT) de diversos fenotipos. Dentro del grupo de linfocitos encontramos las células T CD4+ distribuidas tanto en el interior como en las capas más externas del granuloma, los LT CD8+ ubicados principalmente en la zona externa, así como también células T- $\gamma\delta$, células citotóxicas naturales (NK), y células T reguladoras (Treg). Además, en la zona más externa pueden observarse agregados de linfocitos B (LB), muchos de ellos, actuando como CPA²⁷. El típico granuloma caseoso incluye un centro necrótico, si bien pueden encontrarse algunos bacilos en este sitio la mayoría de ellos se ubican en la interfase entre el centro necrótico y la zona rica en M ϕ . A medida que la enfermedad progresa, los granulomas tienden a ser menos organizados y pueden devenir en cavitarios, lo cual facilita la conexión del centro caseoso con el árbol bronquioalveolar. La pérdida de organización de esta estructura altera la interacción entre las células inmunes y deriva en la destrucción tisular. Eventualmente esta lesión puede curar por fibrosis y/o calcificación. Si la alteración de la estructura del granuloma persiste, con la consecuente generación de liquefacción y posterior cavitación, los bacilos pueden volcarse a los bronquios y así conseguir diseminarse a otras áreas del pulmón y, si contactan con los vasos también lo harán hacia otros órganos con formación de nuevos granulomas^{29,30}. La afección pulmonar da lugar al síntoma característico de la TB, una tos persistente con sangre en el esputo. En este punto, el paciente es altamente contagioso, dado que libera las bacterias a través de las gotitas de saliva.

En base a lo expuesto resulta claro que la destrucción tisular que se observa en la TB no se encuentra mediada mayoritariamente por la micobacteria, sino que es de naturaleza inmunológica. De esta manera se torna evidente que la RI es crítica tanto para la supervivencia del hospedero como así también de la bacteria. Es por esto que el bacilo por su parte estimula y subvierte de manera activa esta respuesta con el fin de asegurarse su supervivencia y propagación²⁸.

La influencia de la DBT en la formación del granuloma todavía no es muy clara. Observaciones clínicas que evidencian un incremento de las lesiones cavitadas pulmonares podrían indicar alteraciones en la formación de esta estructura²⁶. También se han visto

granulomas más grandes en un modelo experimental de TB-DBT³¹. Esto concuerda con una menor producción de TNF- α , IL-12, y óxido nítrico (NO) por parte de los M ϕ alveolares³¹. Es posible que el retraso en la migración de las CD, M ϕ y LT efectores a los pulmones contribuya a una alteración de la organización estructural del granuloma en individuos con la comorbilidad. Las lesiones cavitadas se han encontrado asociadas a M ϕ disfuncionales e infiltrados de NE, característica típica de ratones carentes de IFN- γ , TNF α y CCL2^{32,33}.

1.8 Respuesta inmune frente a *Mtb*

Esta respuesta consiste en una interacción entre la RI tanto innata como adaptativa celular y humoral. Esta interacción no es estática, sino que cambia con el tiempo a medida que crecemos, envejecemos y respondemos a nuestro entorno. Los modelos animales han permitido estudiar los componentes de esta respuesta de manera individual, en distintos tiempos durante el curso de la infección, lo que ha permitido elucidar mecanismos claves de la inmunidad para el control de la bacteria. Sin embargo, es importante considerar que existe una enorme heterogeneidad en las interacciones hospedero patógeno, las cuales se encuentran estrechamente influenciadas por factores genéticos, ambientales y la presencia de comorbilidades.

Como ya fuera adelantado, aproximadamente un 90% de la población que se encuentra infectada con el bacilo no desarrolla la enfermedad durante toda su vida lo que demuestra la eficiencia del sistema inmune (SI). Sin embargo, si la infección coexiste con una alteración del SI generada por ejemplo por una enfermedad metabólica como la diabetes, los riesgos de desarrollar la enfermedad aumentan a un 90%³⁴.

1.8.1 Mecanismos de la inmunidad innata contra *Mtb*

El SI innato está constituido por una serie de factores solubles, proteínas y células especializadas que le permitirán lidiar con el patógeno en las primeras instancias de la infección. Las principales células y mecanismos involucrados se detallan a lo largo del texto.

Reconocimiento de la micobacteria por el SI innato

La infección con *Mtb* comienza por el reconocimiento de la bacteria luego de su inhalación, y la captación de la misma por parte de los fagocitos residentes en el pulmón: M ϕ alveolares y CD. Estas células juegan un rol fundamental en el inicio y direccionamiento de la inmunidad adaptativa mediante la presentación de antígenos micobacterianos, la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas³⁵. El reconocimiento de moléculas antigénicas

expresadas por el *Mtb* conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), es fundamental para el inicio de la RI innata del hospedero. Estas señales son detectadas por los receptores de reconocimiento de patrón (RRP)³⁶ los cuales actúan principalmente como receptores de señalización, pero algunos de ellos también están implicados en la fagocitosis de la bacteria, en la activación del complemento e inducción de la apoptosis. La expresión de los RRP no se encuentra restringida a las CPA, sino que también pueden hallarse en otras poblaciones celulares sanguíneas, células del epitelio y mucosas. Algunos de los receptores más destacados e involucrados en el reconocimiento y/o internalización del *Mtb* son: receptor para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G (FcγR), receptor de complemento 3 (CR3), los de tipo Toll (TLR), los de tipo NOD (NLR), de lectina de tipo C, entre otros³⁷.

Las micobacterias pueden ser opsonizadas por moléculas de inmunoglobulina G (IgG), C3b y proteínas de unión a manosa, así como por el factor surfactante A, lo cual ayuda a que ingresen al Mø de manera eficiente. Los bacilos opsonizados por moléculas de IgG ingresan a la célula hospedadora vía el FcγR, este mecanismo favorece la fusión fagosoma-lisosoma e induce la producción especies reactivas del oxígeno (ROS), contribuyendo de este modo con la eliminación del bacilo³⁷. Si en cambio, la micobacteria se encuentra opsonizada por fragmentos del complemento (C3b) es reconocida e internalizada por CR3. La fagocitosis mediada por CR3 no contribuiría con la muerte de la bacteria, dado que el reconocimiento e ingreso de la misma mediado por este receptor inhibiría la maduración del endosoma temprano y el estallido respiratorio³⁷.

Los TLR constituyen una familia de receptores conservados filogenéticamente, esenciales para el reconocimiento de patógenos fundamentalmente por Mø y CD, así como NE, mastocitos. Estos receptores al activarse desencadenan una compleja señalización intracelular que en última instancia activa factores de transcripción, como el factor nuclear-κB (NF-κB), favoreciendo la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α), quimiocinas, moléculas coestimuladoras, así como la inducción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) a través del aumento de la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). Entre los TLR que han sido identificados, TLR2, TLR4, TLR9 y TLR8 participan en el reconocimiento de distintos componentes del *Mtb*. TLR2 interactúa con lipopéptidos y glicolípidos, TLR4 con lipoproteínas, TLR9 y TLR8 con ADN³⁸. A pesar del gran incremento de información sobre la conformación y mecanismos de acción de estos receptores, frente a la infección por *Mtb*, aún existen muchos interrogantes.

Los NLR representan una amplia familia de sensores intracelulares que están involucrados en la detección de señales provenientes de patógenos y también de situaciones de estrés. Se sabe que los NLR reconocen, dentro del compartimento citoplasmático, péptidos muramilados y péptidoglicanos que pueden hallarse sobre la micobacteria. La activación de NOD2, uno de los integrantes más caracterizados de esta familia de receptores, favorece la RI inflamatoria a través de la activación de la vía del NF- κ B. Además, otros miembros de la familia NLR como NLRP1 y NLRP3 activan los llamados inflamasomas, complejos de estructuras proteicas inductores de procesos proteolíticos. En el caso del *Mtb*, la inducción del NLRP3-inflamasoma lleva a la activación de la caspasa 1, la cual actúa sobre diferentes pro-citocinas de la familia de IL-1 (IL-1 β e IL-18) las que son activadas y secretadas. Algunos estudios en ratones demostraron que la micobacteria utilizaría diversos mecanismos para inhibir la activación de este inflammasoma, lo que generaría una disminución en la producción de IL-1 β ^{39,40}.

Con respecto a los receptores de lectinas de tipo C, varios de ellos están involucrados en el reconocimiento del *Mtb*. Un ejemplo son los receptores de manosa que, como su nombre lo indica, reconocen residuos terminales de manosa presentes sobre la micobacteria e inducen la fagocitosis de la misma. El ingreso del *Mtb* por esta vía inhibe la fusión fagosoma lisosoma y estimula la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13) a la par que dificulta la síntesis de IL-12^{41,42}. Al respecto, se ha demostrado que la internalización del *Mtb* por M ϕ humanos utilizando este receptor, no conduce a la muerte del bacilo, ni reduciría la carga bacilar, según lo observado en un modelo murino⁴³.

Otro tipo de receptor de lectina de tipo C, DC-SIGN, juega un papel fundamental en el reconocimiento e internalización de la micobacteria por parte de las CD y en menor medida por los M ϕ alveolares. DC-SIGN actúa como RRP y como receptor de adhesión, favoreciendo la migración de las CD y la interacción entre estas células con los linfocitos⁴¹. La activación de este receptor por el *Mtb* promueve una respuesta antiinflamatoria mediada por la inducción de la producción de IL-10 por parte de las CD³⁷.

Por lo expresado se puede inferir que la respuesta a desarrollar contra *Mtb* va a depender, entre otros factores, del tipo de receptor con el que esta interactúe en los estadios tempranos de la infección.

Principales células de la inmunidad innata involucradas en la infección micobacteriana

El M ϕ es la célula blanco con respecto a la infección por *Mtb*. De hecho, los M ϕ alveolares han demostrado jugar un papel esencial en la eliminación de las partículas que ingresan en el

organismo a través de las vías respiratorias, y han sido considerados como una de las primeras poblaciones celulares que interactúan con el bacilo de la TB, además también están involucradas en el inicio de la respuesta adaptativa. El reconocimiento e ingestión del *Mtb* por parte de los Mø gatilla, mediante la inducción de diversas vías como por ejemplo la del NF-κB, la activación transcripcional de numerosos genes, entre ellos se incluyen los de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas, iniciando así la cascada inflamatoria necesaria para la llegada de leucocitos al sitio de la infección⁴⁴.

Estas células pueden eliminar a la micobacteria a través de diversos mecanismos, bien establecidos sobre todo en modelos murinos. Con respecto a la fagocitosis, en condiciones ideales, la internalización de microorganismos inicia una serie de procesos dinámicos donde distintas vesículas endosomales y por último el lisosoma, se fusionan al fagosoma inicial o temprano y llevan a la formación del fagolisosoma o fagosoma maduro. La actividad antimicrobiana del fagolisosoma está mediada, al menos en parte, por la función degradativa de las hidrolasas lisosomales y por el medio ácido, que tienen como consecuencia la degradación de lípidos y proteínas bacterianas. Además la maduración del fagosoma favorece la producción ROS, que constituye un importante mecanismo microbicida demostrado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*³⁵, ya que dañan al patógeno produciendo importantes modificaciones en su ADN, lípidos y proteínas. A este mecanismo efector se sumaría la producción de RNS como consecuencia de la activación del Mø.

Sin embargo, se ha observado que la micobacteria utiliza diversos mecanismos para poder sobrevivir dentro de estas células, por ejemplo restringiendo la acidificación del fagosoma mediante la exclusión de la bomba de protones, pudiendo además contribuir a este efecto la producción de NH₄⁺ por parte del patógeno⁴⁵. Por otro lado, también se ha visto que sulfátidos y algunos glicolípidos micobacterianos impiden la fusión fagolisosomal. La inhibición de la maduración del fagosoma mediada por la bacteria, puede ser revertida por citocinas como el IFN-γ y el TNF-α, que a su vez también estimulan los mecanismos microbicidas³⁶.

Otro mecanismo utilizado por el *Mtb* para evadir las defensas del hospedero está dado por la manipulación de las vías de muerte de la célula hospedera. En el caso particular del *Mtb*, la micobacteria impediría la apoptosis (restringe la viabilidad y diseminación del bacilo y favorece la presentación cruzada en las CD) y promovería la muerte por necrosis (favorece la supervivencia y propagación del bacilo e incrementa la respuesta proinflamatoria) de estas células mediante la estimulación de la producción de lipoxinas, como la lipoxina A₄, que inhibe la producción de prostaglandina E₂, la cual es necesaria para la protección de la membrana

interna mitocondrial. Estudios en M ϕ humanos y murinos demostraron que la infección de estas células por cepas de micobacterias atenuadas induce apoptosis, mientras que las cepas virulentas inducen necrosis, indicando de este modo que el destino del M ϕ se ve influenciado diferencialmente de acuerdo a la virulencia de la micobacteria con la que interactúe⁴⁶.

En M ϕ humanos se observó que el metabolito biológicamente activo de la vitamina D3: 1,25 dihidroxi vitamina D3, sólo o conjuntamente con IFN- γ y TNF- α , era capaz de activar a los M ϕ para inhibir o eliminar al *Mtb*, por ejemplo mediante la inducción de la producción de proteínas antimicrobianas como las catelipsinas⁴⁷. En este caso, el destino de la micobacteria intracelular es ser eliminada a través de la autofagia, un proceso celular a través del cual los componentes celulares, como organelas o patógenos intracelulares, son secuestrados en una estructura llamada autofagosoma que se fusiona con los lisosomas para su degradación⁴⁸. La autofagia actuaría como un efector inmune, por lo que su inducción y activación contribuiría con la eliminación del *Mtb* favoreciendo la maduración del fagosoma. Algunos estudios en modelos murinos demostraron que el tratamiento con isoniacida y pirazinamida induce autofagia en M ϕ infectados con *Mtb*, contribuyendo también de este modo a la eliminación de la micobacteria⁴⁹.

Como se ha señalado anteriormente, los M ϕ son las principales células que se encuentran en los granulomas, pero no todos los M ϕ dentro de esta estructura están infectados. Las células no infectadas parecen ayudar en la contención de la infección y contribuirían a la secreción de citocinas. Diversos estudios en ratones sugieren la existencia de dos tipos de M ϕ , los activados de manera clásica (M1) que se diferencian en respuesta a la señal de diversas citocinas, o los activados de modo alternativo (M2). Los M1, inducidos por la secreción de citocinas de los LT colaboradores de tipo 1 (Th1), fundamentalmente IFN- γ , son capaces de destruir a la bacteria y a su vez producir citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-23. Mientras que los M2, inducidos por citocinas de los LT colaboradores de tipo 2 (Th2), como IL-4 e IL-13, sintetizan citocinas antiinflamatorias (IL-10, Factor de crecimiento transformante beta-TGF- β), carecen de actividad antimicrobiana y poseen una baja actividad presentadora de antígenos. Si bien ambas poblaciones suelen encontrarse en el granuloma frente a la infección por *Mtb*, una RI eficiente depende fundamentalmente de un predominio del perfil M1, pero como parte de una respuesta bien balanceada se requiere de la presencia de factores antiinflamatorios y de M2 para controlar la flogosis y evitar el daño en el hospedero²⁸.

Como se expresó anteriormente, en los granulomas existe una importante heterogeneidad de subtipos de M ϕ , entre ellos los de tipo espumosos, quienes adquieren su apariencia esponjosa como resultado de la acumulación de lípidos intracelulares dentro de estructuras

conocidas como cuerpos lipídicos⁵⁰. Lay y colaboradores demostraron, en un modelo *in vitro*, que estas células pierden su capacidad fagocítica y su actividad bactericida permitiéndole de este modo a las bacterias previamente ingeridas permanecer en un estado de latencia. Además los lípidos presentes en estas células servirían como una fuente de nutrientes para la micobacteria⁵¹.

Frente a la infección por *Mtb*, las **CD** juegan un rol fundamental en la inducción de la RI celular, activando a los LT vírgenes específicos en los ganglios linfáticos. Además, la producción de citocinas como IL-12 e IL-18 por estas células favorece la maduración de las células T hacia un perfil Th1. En modelos murinos se vio que la presentación de antígenos micobacterianos por las CD a los linfocitos vírgenes ocurre en los ganglios linfáticos entre 9 y 12 días post-infección. No se sabe exactamente cuál es el motivo de dicho retardo, pero tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* se observó que la población de CD presentes en el tejido alveolar, infectadas con *Mtb*, tardaban en migrar hacia los ganglios y eran menos eficientes en la presentación antigénica que otras poblaciones de CD. Además, está reportado que la infección con *Mtb* de las CD derivadas de monocitos altera la habilidad de éstas para presentar antígenos lipídicos, por la disminución en la expresión de las moléculas CD1^{52,53}. Sin embargo, Ernst y colaboradores demostraron que las CD que migran hacia los ganglios linfáticos utilizarían algunos mecanismos para compensar la inhibición de la presentación antigénica mediada por *Mtb*, por ejemplo, mediante la transferencia célula a célula de proteínas micobacterianas a CD residentes en los ganglios, optimizando de este modo la presentación y activación de los LT CD4+ vírgenes.

Los **NE** se encuentran entre las primeras células del SI que migran al sitio de la infección durante la infección por *Mtb* y desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la RI innata e inflamatoria⁵⁴. La mayoría de los microorganismos fagocitados por estas células mueren rápidamente luego de la fusión del fagosoma con los compartimentos lisosomales y con gránulos citoplásmicos especializados que contienen un vasto arsenal de moléculas efectoras antimicrobianas como α defensinas, proteasas, lactoferrina, etc. Al fagocitar a la micobacteria se activan diversas cascadas de señales que culminan en la producción de citocinas tales como TNF- α e IL-1 β y de quimiocinas por parte de estas células⁵⁵. Además la interacción con el *Mtb* desencadena la apoptosis de NE, e *in vitro* se observó que la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por parte de los M ϕ resulta en la disminución de la viabilidad de la micobacteria intracelular, dado que los gránulos presentes en los cuerpos apoptóticos son trasladados hacia los endosomas tempranos donde se localiza la micobacteria, potenciando de este modo la

actividad antimicrobiana de los M ϕ ⁵⁶. También se observó en diversos modelos que estas células son importantes en la formación del granuloma durante la infección con *Mtb*, dado que producen quimiocinas como CXCR3 que favorecen la organización de los linfocitos y monocitos que llegan al sitio de la infección^{57,58}. Por otro lado, la acumulación y persistencia de los NE en el sitio de la infección por períodos prolongados resulta perjudicial para el hospedero, dado que la liberación continua de gránulos y sus respectivas enzimas genera importante daño tisular. Por lo que, si bien los NE tendrían un rol protector inmediatamente después de la infección, la persistencia de estas células en etapas tardías de la enfermedad estaría asociada con la falla en la contención del *Mtb* y la progresión de la enfermedad activa⁵⁹.

Células NK. Su función principal está asociada con el desarrollo de citotoxicidad frente a células diana, mediadas por los sistemas Fas/Fas-L y perforina/granzima, y además se encuentran entre las primeras células que producen IFN- γ durante la RI frente a *Mtb*⁶⁰. En un modelo humano *in vitro* se demostró que estas células reconocen e inducen la apoptosis de los M ϕ infectados con la micobacteria; además, en modelos murinos de infección con *Mtb* se vio que estas células también están involucradas en el inicio del proceso inflamatorio mediante la secreción de quimiocinas como IL-8 que reclutan leucocitos, e intervienen en la organización del granuloma²⁸.

Existe una creciente evidencia de la participación de las **células NKT** en la protección contra *Mtb*⁶¹. Son células que expresan marcadores tanto de las células NK como de los LT, con funciones efectoras así como reguladoras. Estudios recientes realizados en pacientes con TB han reportado que células NKT aisladas de fluidos pleurales producen IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-2 e IL-21 luego de la estimulación *ex vivo* con antígenos^{62,63}.

Diversos estudios demostraron que los linfocitos **T- $\gamma\delta$** están presentes en el sitio de la infección desde etapas tempranas de la RI anti-TB. Reconocen antígenos micobacterianos, fundamentalmente fosfoantígenos, a través de su TCR que no se encuentra restringido por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)⁵⁴. Estas células son las principales productoras de IL-17 en la fase inicial de la infección, también producen TNF- α , y al igual que los LT CD4+ y LT CD8+, secretan IFN- γ ⁶⁴. Estudios tanto en ratones como en humanos muestran su participación en la restricción del crecimiento micobacteriano a través de la liberación de perforina y granulisina⁶⁵. También ejercen una respuesta inmune protectora a través de su interacción con las células NK, las CD y los LT CD8+⁶⁶.

Otro grupo de células que ha tomado relevancia en los últimos años son las células linfoides innatas (**CLI**). Hasta el momento existen muy pocas publicaciones sobre su participación en la RI

anti-TB. Un estudio realizado el último año ha demostrado que la vacunación con BCG activa a las CLI en un modelo murino⁶⁷, mientras que otro ha reportado una reducción significativa de estas células en pacientes con TB activa susceptible y resistente a drogas respecto de sujetos sanos (HCo). El tratamiento con antibióticos restauró los niveles de los subtipos CLI1 y CLI3 pero no los de CLI2. Además, las poblaciones de CLI, aisladas de biopsias de pulmones de individuos infectados con TB, mostraron una alta expresión de los marcadores de activación CD69, CD25 y CCR6 al compararlos con los de las células NK y LT. Estos resultados sugieren que la modulación de la población de CLI durante la infección con *Mtb* podría participar en la patogenia y/o protección de esta enfermedad⁶⁸.

1.8.2 Mecanismos de la inmunidad adquirida contra *Mtb*

En la TB es la inmunidad de tipo celular la que juega un rol clave para el control del patógeno. No obstante, durante la infección con *Mtb* también se observa una fuerte respuesta humoral⁶⁹.

El resultado de las infecciones micobacterianas depende de la interacción entre la bacteria y la RI innata y adaptativa del hospedero. Las células T son un componente fundamental de la respuesta protectora frente a la infección con *Mtb*. Para que los LT específicos se activen y expandan es necesario que la micobacteria sea trasladada desde el pulmón hacia el ganglio linfático drenante, donde se produce el reconocimiento de los antígenos micobacterianos. La RI celular tarda en ser inducida, por lo que el inicio de la misma se ve demorado en comparación con la de otras infecciones, lo que le permite a la micobacteria replicarse en los pulmones durante la fase temprana de la infección (primeros 21 días), establecerse y condicionar a la respuesta efectora, de modo que la misma se exprese en un sitio inflamatorio que ha sido gatillado y modulado por la bacteria⁷⁰.

Como se expresó previamente, una vez que la bacteria es presentada a los LT en el ganglio linfático, las células vírgenes allí activadas migran hacia el sitio de la infección, donde mediarán sus funciones efectoras. La llegada de las células al foco de la infección ocurre entre dos a tres semanas post inhalación de la bacteria. Además, la interacción de las células T y los M ϕ infectados es central en la inmunidad frente al *Mtb*, las células T CD4+ son esenciales para montar una buena respuesta celular, pero son apoyadas por otras subpoblaciones de células T como las CD8+ y otros linfocitos capaces de reconocer componentes de la micobacteria expuestos por las moléculas no clásicas del CMH⁷¹.

Reconocimiento de la micobacteria por los linfocitos

Dado que la micobacteria reside en general en los compartimentos fagocíticos, la presentación del antígeno por el CMH de tipo II es la más frecuente, y los LT CD4+ son las células responsables de reconocer el *Mtb* en este contexto. Mientras que las moléculas pertenecientes al CMH de tipo I son capaces de presentar a los LT CD8+ péptidos derivados de antígenos presentes en el citosol. En este caso el *Mtb* o componentes del mismo deben acceder al citosol para ser procesados y presentados por este tipo de molécula. Al respecto, se ha observado que algunas proteínas de secreción micobacterianas pueden ser translocadas al citosol de las CPA infectadas y ser presentadas de este modo⁷². A su vez se ha postulado la presencia de un poro o grieta, inducido por la micobacteria sobre la membrana vesicular, que permitiría un tráfico bidireccional de antígenos micobacterianos hacia el citoplasma, así como de nutrientes hacia el interior de la vesícula.

Células de la inmunidad adquirida

LT CD4+. Estas células juegan un papel central en la RI humana frente al *Mtb*. Ayudan a los LB a producir anticuerpos, a experimentar el cambio de isotipo y maduración de la afinidad; favorecen la activación de M ϕ , NE, etc. en el sitio de la infección; mejoran y sostienen la respuesta de las células TCD8+, y también participan en el control de la excesiva RI. El reconocimiento de los antígenos micobacterianos unidos a las moléculas del CMH tipo II por parte del receptor de LT (TCR), junto con las señales coestimuladoras activan a los LT CD4+, lo que induce la proliferación y diferenciación de los mismos en los distintos perfiles ampliamente conocidos⁴⁴.

Es sabido que la RI protectora frente al *Mtb* es mediada por la inmunidad celular, y las células Th1 efectoras y las citocinas que estas producen son fundamentales frente a esta infección. Por ejemplo la producción de IFN- γ por parte de este linaje es clave para la activación de los M ϕ y la contención de la infección, aunque una respuesta Th1 exacerbada también está involucrada en la patología⁷³. La diferenciación de estos linfocitos hacia este perfil requiere de la presencia de citocinas como IL-12 e IL-18 y de la activación del factor de transcripción T-bet. Las células Th2 también están presentes durante la infección con *Mtb*, estas producen citocinas como IL-4 que inhiben el perfil Th1 y de este modo contribuyen a un control de esta subpoblación⁷⁴. Los linfocitos vírgenes se diferencian a este perfil en presencia de IL-4.

El balance entre una respuesta Th1/Th2 es fundamental para lograr el control de la infección de la micobacteria y evitar caer en situaciones inmunopatológicas. Diversos estudios

demonstraron que los pacientes con formas leves de TB se caracterizan por conservar una RI celular, y los individuos que presentan formas severas de la enfermedad presentan un deterioro de los parámetros inmunes mediados por células, junto con un aumento en la respuesta humoral. Es decir que los pacientes con las formas más leves de la enfermedad presentan una preponderante respuesta celular de tipo Th1, mientras que en los casos más severos hay un predominio del perfil Th2^{75,76}.

Por otro lado, el linaje Th17 también se encuentra involucrado en la RI frente a la micobacteria, sin embargo su rol es controversial. Este perfil se genera en presencia de IL-6 y TGF- β , mientras que la IL-23 es necesaria para su supervivencia y mantenimiento. La producción de IL-17, generada por estas células, favorecería el reclutamiento de NE los cuales en conjunción con los M ϕ contribuirían a la eliminación de la micobacteria; además los NE favorecerían la organización del granuloma. A su vez, se ha observado que proteínas liberadas por la degranulación de los NE promueven la secreción de IL-12 por parte de los M ϕ , favoreciendo el sesgo de la respuesta hacia un perfil Th1. Sin embargo, la liberación prolongada de IL-17 sería perjudicial para el control de la TB en una fase más tardía dado que continuaría reclutando NE, los que activados generarían daño tisular⁷⁷.

El exceso de activación de cualquiera de los patrones de respuesta mencionados sostenido en el tiempo es perjudicial para el hospedero. Entre los diversos mecanismos de regulación intrínseca del SI, la activación de las Treg juega un papel fundamental en el control de la RI frente a patógenos, entre otras funciones. En humanos las Treg representan un 5-10% de los LT CD4+ circulantes, y sólo las que expresan niveles elevados de CD25 exhiben una importante capacidad supresora. En pacientes con TB se vio un incremento en la frecuencia de estas células en sangre periférica y en el sitio de la infección^{78,79}; se ha reportado que pueden inhibir la producción de IFN- γ por parte de las células T por contacto célula-célula a través de CTL4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), mediante la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) y mediante el “secuestro” de IL-2⁸⁰.

Como fue previamente mencionado, el equilibrio entre las respuestas efectoras y las respuestas reguladoras luego de la infección con *Mtb* puede determinar el desenlace y la progresión de la enfermedad activa. Las células Treg desempeñan una función importante en el balance entre la inmunopatología y la persistencia del patógeno. Por un lado, estas células son capaces de evitar una respuesta inflamatoria excesiva disminuyendo el daño tisular en el hospedero, y por el otro pueden comprometer la eliminación del agente infeccioso, favoreciendo su persistencia y diseminación. La RI en la TB suele estar caracterizada por una

inmunosupresión activa, particularmente en las formas más severas de la enfermedad, reflejado en una disminución en la producción de IL-2 e IFN- γ y en una anergia específica a preparaciones de PPD que se correlaciona con una expansión de las células T productoras de IL-10. Las citocinas IL-10 y TGF- β pueden correlacionarse con la susceptibilidad a la infección y a la enfermedad y, en simultáneo, sugieren una participación de las células Treg en este proceso⁸¹.

LT CD8+. Estas células al ser activadas por el *Mtb* comienzan a producir IFN- γ , aunque en menor medida que las CD4+ y adquieren funciones citotóxicas sobre células infectadas con la micobacteria. En cuanto a la actividad citolítica, los LT CD8+ comienzan a expresar Fas-L y a liberar perforinas sobre las células *target* para permitir el ingreso de granulisinas y granzimas que son las responsables de inducir apoptosis en las células infectadas con la bacteria⁸². En estudios en ratones se vio que en la fase aguda de la infección hay un predominio de la función citotóxica por parte de estas células, y a medida que la infección se cronifica los LT CD8+ comienzan a aumentar su producción de IFN- γ ⁸³.

LB. En los últimos años se ha demostrado que tanto las células B como los anticuerpos producidos por ellas tienen una amplia variedad de mecanismos involucrados en la modulación de la RI frente a patógenos intracelulares, entre ellos para el control del *Mtb*^{69,84,85}. Como se comentó anteriormente, los LB componen la estructura del granuloma y, participan en el procesamiento y presentación antigénica a los LT, secretan anticuerpos, favoreciendo la fagocitosis del *Mtb* así como la activación del sistema del complemento, y modulan el proceso inflamatorio a través de la secreción de IL-10⁸⁶. A pesar de ello existen muy pocos reportes clínicos sobre la participación de la respuesta de las células B en la infección con *Mtb*. Entre ellos puede destacarse un trabajo realizado en Sudáfrica, que observó un comportamiento diferencial de la respuesta de las células B periféricas en pacientes con TB activa y latente respecto de HCo frente a distintos antígenos de *Mtb*⁸⁷. Por otro lado estudios *in vitro* utilizando líneas humanas de LB han mostrado que estas células tienen la capacidad de fagocitar a la micobacteria y que ello desencadena una mayor producción de IgM y favorece además, la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86)⁸⁸.

1.8.3 Citocinas relevantes en la infección con *Mtb*

La compleja interacción entre *Mtb* y el SI se asocia a la liberación de una amplia gama de citocinas secretadas por los diferentes tipos de células involucradas en respuesta a la infección. Todos los eventos detallados anteriormente están orquestados por estas proteínas multifuncionales que actúan en respuesta a la infección, tanto de manera local como sistémica,

ejerciendo efectos pro o antiinflamatorios en múltiples células diana. Es el delicado equilibrio entre la RI inflamatoria y protectora lo que determina el resultado de la infección tuberculosa.

Mediadores proinflamatorios

En el caso de la TB la producción de **IFN- γ** es crítica para el control de la infección con *Mtb*, tanto cuando es sintetizado en forma inespecífica en las primeras etapas de la infección como reflejo de la activación de la RI innata principalmente por las células NK, o como producto de la activación de células T antígeno específicas (fundamentalmente LT CD4+ del patrón Th1, así como también por LT CD8+). Pese a que la sola producción de esta citocina no es suficiente para el control de esta patología, es necesaria para montar una respuesta protectora frente a la bacteria. En modelos murinos se puso de manifiesto que una de las principales funciones del IFN- γ frente a la infección micobacteriana es constituirse como el mayor activador de los M ϕ . También favorece la presentación antigénica al estimular la síntesis de moléculas del CMH de clase II en M ϕ , lo que lleva a una mayor activación de LT CD4+; promueve la síntesis de IL-12 por parte de los M ϕ activados y la expresión del receptor para la IL-12 en los linfocitos vírgenes. El papel fundamental en humanos se ve reflejado en pacientes con deficiencia en la producción del IFN- γ o de su receptor, los que presentan una marcada susceptibilidad a infecciones micobacterianas^{44,89}.

La **IL-12** es una citocina proinflamatoria, producida por las CPA y es esencial para la generación de la RI protectora contra *Mtb* dado que favorece la activación del perfil Th1, y por consiguiente la síntesis de IFN- γ . Además, esta citocina potencia la producción de IFN- γ por parte de las células NK. En pacientes con TB activa, la IL-12 fue detectada en infiltrados pulmonares, pleuresías y granulomas^{37,90}.

Dentro de las citocinas claves para el control de la TB también se halla el **TNF- α** , que es producido principalmente por monocitos, M ϕ y CD como consecuencia de la interacción con la micobacteria o productos micobacterianos. Esta citocina proinflamatoria participa de manera directa en la formación del granuloma, posee propiedades inmunorregulatorias, estimula la respuesta de fase aguda, favorece la activación de los M ϕ e induce la producción de quimiocinas y moléculas de adhesión que son importantes para el reclutamiento y retención de las células en el sitio de la infección. También se vio que la presencia del TNF- α favorece la apoptosis de las células infectadas con la micobacteria, aunque el exceso de esta citocina en el entorno puede llevar a la activación de la muerte celular por necrosis. Además, el TNF- α actúa en sinergia con el IFN- γ para favorecer la actividad antimicrobiana de los M ϕ induciendo la

síntesis de RNS y ROS. La importancia de esta citocina en la infección con TB se evidenció en modelos animales donde la falta de la misma se encontró asociada a una progresión fatal de la TB, fundamentalmente debido a una menor capacidad de respuesta antimicrobiana por parte de los M ϕ acompañada de una alteración en la estructura del granuloma⁹¹. En los pacientes con TB la principal producción de TNF- α tiene lugar en el sitio de la infección, el exceso de esta citocina genera efectos inflamatorios no deseados como fiebre, cansancio, pérdida de peso y daño tisular. El deterioro clínico temprano que presentan estos pacientes está asociado con un incremento en las concentraciones plasmáticas de esta citocina⁹².

La **IL-1 β** es producida principalmente por monocitos, M ϕ y CD, también se encuentra en exceso en el sitio de la infección en pacientes con TB y actúa como mediador de la respuesta inflamatoria del hospedero. Es sintetizada como forma inactiva (pro-IL-1 β), la cual necesita de la activación del inflammasoma para ser procesada y secretada en su variedad biológicamente activa (IL-1 β). Este mediador incrementa el procesamiento y presentación antigénica, y la producción de otras citocinas sobre las CPA, así como la fagocitosis y mecanismos efectores de los M ϕ ^{93,94}.

La **IL-6** también ha sido implicada en la respuesta del hospedero frente al *Mtb*. Este mediador posee propiedades pro y antiinflamatorias, es producido tempranamente durante la infección micobacteriana y se encuentra en grandes cantidades en el sitio de la infección. IL-6 es sintetizada principalmente por los fagocitos mononucleares en respuesta a la bacteria y a otras citocinas tales como IL-1 y TNF- α . Muestra un importante pleiotropismo, en la inmunidad innata estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y contribuye a los efectos sistémicos de la inflamación conocida como respuesta de fase aguda; estimula la producción de NE a partir de sus progenitores en la médula ósea en coordinación con el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Se evidenció un rol protector de la IL-6 ya que los ratones deficientes en la producción de este mediador presentaban una mayor susceptibilidad frente a infecciones con *Mtb*^{37,95}.

La **IL-2**, producida por los LT, constituye un factor de crecimiento autócrino y parácrino para los linfocitos estimulados por antígenos. Favorece la diferenciación y proliferación de las NK y los LB, así como de las células Treg en el timo. La producción de IL-2 se encuentra aumentada en pacientes con TB respecto de controles sanos frente al estímulo de antígenos micobacterianos⁹⁶.

La familia de **IL-17** se encuentra integrada por las isoformas IL-17 A, B, C, D y E. Las células capaces de responder a esta citocina incluyen CD, M ϕ , linfocitos, células epiteliales,

queratinocitos y fibroblastos. Ante la infección con *Mtb*, diversos estudios sugieren que las células T- $\gamma\delta$ son una importante fuente de producción temprana de IL-17, mientras que durante la RI adaptativa serían los LT CD4+, correspondientes a la subpoblación Th17, los principales productores⁹⁷.

IL-23 es producida por CD y M ϕ que son activados por TLR-2. A su vez, estas células pueden ser activadas por esta citocina en forma directa, favoreciendo la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL-1 β . Una de las funciones más importantes de IL-23 es su habilidad para sostener la actividad de los linfocitos T- $\gamma\delta$ y favorecer la expansión de los clones de Th17. Ambos tipos celulares son componentes esenciales de una inmunidad protectora contra *Mtb*, temprana y tardía respectivamente. En ausencia de IL-23 las células Th17 muestran una menor capacidad en la producción de citocinas proinflamatorias y un aumento en la síntesis de IL-10, por lo que la presencia de esta citocina es requerida para que las células Th17 maduren alcanzando su potencial plenamente inflamatorio. Sin embargo, un exceso de producción de IL-23 e IL-17 conduciría a un gran reclutamiento y cambios fenotípicos en las células proinflamatorias con el consecuente daño tisular. Por consiguiente es indispensable un fino balance Th1-Th17 para lograr una respuesta efectiva contra el *Mtb*⁹⁸.

La **Proteína C reactiva** (CRP-del inglés *C reactive protein*), si bien no es una citocina, es uno de los componentes inflamatorios producidos por el hígado en respuesta a procesos infecciosos o inflamatorios, e integra el grupo de las denominadas "Proteínas de fase aguda". Su síntesis a nivel hepático es estimulada por IL-6, TNF- α , IL-1 β y glucocorticoides (GCs). La CRP une con alta afinidad residuos de fosfocolina presentes en polisacáridos de virus, bacterias, hongos y parásitos; a su vez, las membranas celulares de los mamíferos también expresan fosfocolina, aunque esta sólo es accesible para su reconocimiento por la CRP en células necróticas o apoptóticas. Por consiguiente, es capaz de reconocer no sólo microorganismos, sino también células propias que requieren ser eliminadas. Además, esta proteína de fase aguda cuando se encuentra interaccionando con el ligando es capaz de unir C1q e inducir la activación del complemento por vía clásica, lo que lleva a la deposición de C3b sobre el patógeno favoreciendo su fagocitosis. La CRP también puede ser reconocida por los receptores Fc de la IgG presentes en M ϕ y NE, actuando como opsonina e induciendo la fagocitosis⁹⁹.

Las concentraciones plasmáticas de CRP y la velocidad de eritrosedimentación (ERS) son los indicadores de proceso inflamatorio agudo más utilizados. En pacientes con TB pulmonar las concentraciones plasmáticas de CRP se encuentran incrementadas y asociadas con los niveles bacterianos y el grado de afección de la enfermedad¹⁰⁰.

Citocinas reguladoras y antiinflamatorias

La respuesta inflamatoria iniciada por la micobacteria es antagonizada por mecanismos antiinflamatorios, así como reguladores de la respuesta en curso.

La **IL-10**, que en líneas generales ejerce efectos antiinflamatorios, es producida principalmente por los M ϕ activados luego de la fagocitosis de la micobacteria, también puede ser liberada por las CD y por LB y LT durante la respuesta adaptativa. Mediante estudios *in vitro* se demostró que la IL-10 antagoniza la respuesta de citocinas proinflamatorias inhibiendo la producción de TNF- α e IL-12, así como del IFN- γ . También disminuye la actividad lítica de los LT CD4+ y LT CD8+, inhibe el procesamiento y presentación de antígenos y la expresión de moléculas coestimuladoras sobre monocitos y M ϕ ; sobre estas últimas células, antagoniza los efectos activadores del IFN- γ . Diversos trabajos postulan que la micobacteria estaría induciendo la producción de esta citocina con el objeto de suprimir la RI efectiva. O'Leary y colaboradores demostraron que M ϕ alveolares humanos infectados con *Mtb* producían niveles elevados de IL-10, y que el aumento de esta citocina inhibía la maduración del fagosoma, permitiendo la sobrevida del patógeno en estas células¹⁰¹. Por lo que en el contexto de la infección con *Mtb*, esta citocina jugaría un doble rol ya que por un lado contribuiría con el control de la exuberante respuesta proinflamatoria limitando de este modo el daño en el hospedero, mientras que producida en exceso favorecería la sobrevida de la micobacteria al alterar la RI de protección.

El **TGF- β** frente a una infección con *Mtb* también parece contrarrestar la inmunidad protectora. Los productos micobacterianos inducen la síntesis de este mediador por parte de monocitos, M ϕ y CD. Al igual que la IL-10 suele producirse en grandes cantidades en el sitio de la infección³⁷. Esta citocina suprime la inmunidad celular: en las células T inhibe su proliferación y la producción del IFN- γ , mientras que en M ϕ interfiere con la presentación antigénica, la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y la activación celular. Además, está involucrada en el daño pulmonar y la fibrosis producida durante la TB¹⁰².

En algunos sujetos con TB se ha detectado una producción incrementada de **IL-4** asociada a la severidad. La IL-4 antagoniza los efectos activadores del IFN- γ sobre los M ϕ y por consiguiente inhibe la RI celular. Esta citocina es producida por células Th2, mastocitos y basófilos entre otras. La presencia de IL-4 estimula la diferenciación de los LT vírgenes hacia un perfil Th2 y actúa como un factor de crecimiento autócrino para esta subpoblación¹⁰³.

En resumen, la RI protectora frente a la infección por *Mtb*, que previene la progresión de la enfermedad activa puede ser atribuida al correcto equilibrio entre los mecanismos proinflamatorios e inmunoreguladores.

1.9 ¿Cómo la inflamación crónica en la DBT contribuye a la disregulación del SI?

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica multifactorial caracterizada por la resistencia a insulina, intolerancia a la Glc e hiperglicemia. La DBT se diferencia etiológicamente de los demás tipos de diabetes y se encuentra estrechamente relacionada a la epidemia global de obesidad simultánea¹⁰⁴. Su etiología involucra una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales que predisponen a la resistencia a insulina y a altos niveles de Glc y ácidos grasos libres (AGL) circulantes. Las alteraciones en el metabolismo de la Glc y de los lípidos tanto en adipocitos como hepatocitos conducen a un estado pro inflamatorio progresivo caracterizado por una expansión de la población de M1¹⁰⁵. El estrés de las células β -pancreáticas, ocasionado por estos cambios metabólicos y de la respuesta inflamatoria, conduce a una deficiencia en los niveles y funcionamiento de insulina y a la hiperglicemia^{106,107}. La hiperglicemia crónica acelera la producción de productos finales de glicación avanzada (AGE) generados por proteínas de glicación no enzimáticas. Altos niveles de AGE y AGL, derivados por un consumo dietario excesivo y el incremento de la lipólisis como consecuencia de la resistencia a insulina, estimulan la producción de mediadores inflamatorios y ROS^{108,109}. Los ROS también son generados por el excesivo metabolismo de la Glc a través de la vía de fosforilación oxidativa¹¹⁰.

En individuos sanos, el balance de la producción de ROS es mediado principalmente por el glutatión, el regulador redox más abundante de las células eucariotas. Neutraliza los ROS a través de su reducción (glutatión reducido-GSH) y oxidación (glutatión oxidado-GSSG). Una relación GSH/GSSG disminuida es señal de estrés oxidativo y ha sido descrita en pacientes diabéticos no controlados^{111,112}.

Actualmente está ampliamente aceptado que la obesidad, particularmente el exceso de tejido adiposo visceral (TAV), se caracteriza por un estado crónico inflamatorio de bajo grado debido a la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de los adipocitos y M ϕ residentes del tejido adiposo¹¹³⁻¹¹⁵. La sobreexpresión de TNF- α en el tejido adiposo de sujetos obesos fue el hallazgo clave que asoció los cambios metabólicos a la inflamación¹¹⁶. Los M1 son reclutados al tejido adiposo donde secretan grandes cantidades de mediadores inflamatorios como TNF- α , CRP, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12¹¹⁷. Además, los altos niveles de IFN- γ encontrados en este tejido, contribuirían a la conversión de los macrófagos desde un perfil M2 a M1. Otros estudios utilizando modelos *in vitro* han evidenciado una secreción basal incrementada de TNF- α , IL-6 e IL-8 por parte de los NE y monocitos de individuos diabéticos^{118,119}. Todos estos antecedentes permitirían concluir que la activación del SI y la alta concentración de citocinas proinflamatorias

circulantes serían el eje central para el desarrollo de la resistencia a insulina y conducirían a los cambios micro y macro vasculares observados en los pacientes diabéticos¹²⁰.

La explicación inmunológica de la mayor susceptibilidad a la TB de aquellos pacientes con DBT todavía no está muy bien esclarecida. Sin embargo, el hecho de presentar una cierta desregulación o “deterioro” de la RI podría contribuir o facilitar la infección primaria, así como contribuir a una reactivación de la TB latente.

1.9.1 Inmunidad innata frente a *Mtb* de un huésped con la comorbilidad TB-DBT

Se han realizado diversos estudios con el objeto de simular el primer encuentro entre la micobacteria y la RI innata en pacientes TB-DBT.

Gómez y colaboradores fueron los primeros en reportar que los monocitos de individuos con DBT tienen una menor capacidad de reconocimiento y fagocitosis de la bacteria que aquellos individuos sin DBT. Este defecto podría atribuirse a una alteración de los propios monocitos como así también a la proteína C3^{121,122}.

Además, Kumar y colaboradores mostraron que individuos con TB pulmonar y DBT presentaban menores frecuencias de monocitos del perfil clásico (CD14++CD16-, con alta capacidad fagocítica) e intermedio (CD14++CD16+)¹²³. Sin embargo, al analizar el fenotipo de los subtipos de monocitos luego de completado el tratamiento anti-TB, observaron un incremento en la frecuencia de los monocitos clásicos e intermedios, lo que indicaría que esta alteración en los pacientes con la comorbilidad sería reversible¹²⁴.

El análisis de los marcadores de superficie de monocitos de pacientes TB-DBT y TB, encontró una asociación entre la comorbilidad y un aumento en la expresión del receptor de quimiocina CCR2, lo que podría restringir el tráfico de los monocitos al pulmón. Otras variables del hospedero asociadas a las modificaciones en los monocitos fueron una mayor edad (asociada a menores niveles de CD11b) y la obesidad (asociada con mayores niveles del receptor de los AGE)¹²⁵. Dado que los pacientes DBT suelen presentar estas variables, sus monocitos presentarían una disfuncionalidad que afectaría el reconocimiento del *Mtb*.

Estudios *in vitro* utilizando M ϕ humanos de sujetos sanos estimulados con *Mtb* bajo condiciones hiperglicémicas, revelaron un incremento en la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10¹²⁷. Sin embargo, el análisis de marcadores de activación plasmáticos solubles de monocitos/M ϕ (sCD163-sCD14), no presentó modificaciones entre pacientes TB-DBT y TB¹²⁸.

En lo que respecta a CD, nuevamente Kumar y colaboradores trataron de dilucidar la influencia de la DBT en estas células. El fenotipo *ex vivo* de las CD de pacientes TB-DBT mostró

un disminución en la frecuencia de los subtipos mieloide y plasmocitoide respecto de individuos sólo con TB¹²³. Sin embargo, y como sucedió con la población monocítica, el tratamiento anti-TB revirtió estas diferencias¹²⁹.

La comorbilidad TB-DBT se caracteriza por un importante incremento en el contaje absoluto de NE¹²⁸. Aunque estudios recientes en NE de pacientes DBT han reportado una menor capacidad fagocítica de estas células al enfrentarlas con *Mtb*¹³⁰.

El análisis de las células NK (CD56+CD3-) de pacientes TB-DBT sometidas a antígenos de *Mtb*, mostró una mayor frecuencia de células productoras de citocinas de tipo 1 (TNF- α) y 17 (IL-17A e IL-17F). En contraste, este estudio encontró una menor frecuencia de NK que expresan CD107a (un marcador que denota la capacidad citotóxica) en respuesta a los antígenos CFP-10 (siglas del término en inglés *culture filtrate protein-10*) y ESAT-6 (siglas del término en inglés *early secreted antigenic target-6*) en los pacientes con la comorbilidad, respecto de pacientes TB sin DBT¹³¹.

Toda esta información pone en evidencia que la RI innata de los individuos DBT se encuentra alterada en diversos aspectos y prácticamente involucra a todas las células que forman parte de ella.

1.9.2 Inmunidad adaptativa frente a *Mtb* de un hospedero TB-DBT

Existen numerosos estudios en pacientes con la comorbilidad TB-DBT que indican una respuesta inflamatoria exacerbada frente a antígenos de *Mtb* respecto de aquellos pacientes sin DBT.

Restrepo y colaboradores han reportado que la respuesta *ex vivo* de células sanguíneas, al ser estimuladas con antígenos micobacterianos, resulta en un patrón celular del tipo Th1-Th17 incrementado, con altos niveles de producción de IFN- γ e IL-17. Otras citocinas que se encontraron aumentadas fueron la IL-2 y el GM-CSF^{132,133}.

Estos resultados fueron confirmados y ampliados por Kumar y colaboradores quienes estudiaron cómo repercutía la DBT en la respuesta mediada por LT CD4+. En células de sangre entera de pacientes con la comorbilidad, observaron una mayor frecuencia de células CD4+ del perfil Th1 produciendo una o 2 citocinas, así como incremento de células del perfil Th17 y disminución de Treg, luego de la estimulación antigénica (vs TB)¹³³. Otro estudio llevado a cabo por este grupo, analizando los niveles plasmáticos de citocinas, reportó que los pacientes TB-DBT se caracterizan por elevados niveles circulantes de citocinas de tipo 1 (IFN- γ , TNF α , IL-2), de tipo 2 (IL-5) y de tipo 17 (IL-17A), con bajos niveles de IL-22. Este perfil también se encontró asociado a otras citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-18) como antiinflamatorias (IL-10)

pero no con IFNs de tipo 1. Las citocinas Th1 y Th17 detectadas en plasma se correlacionaron con los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), marcando la asociación entre una DBT descontrolada y el entorno proinflamatorio. Al realizar un análisis multivariado esta asociación no se vio influenciada por edad, sexo u otro parámetro metabólico¹³⁴.

No todos los estudios muestran incrementos de citocinas Th1 o del tipo proinflamatorias en pacientes TB-DBT. Gan y colaboradores no encontraron diferencias significativas en los niveles de IFN- γ al analizar las células T de los pacientes¹³⁵. Por otro lado, un estudio realizado por Stalenhoef y colaboradores, en una población de indonesios que padecían TB con o sin DBT, mostró una disminución significativa de la producción IL-10 de las células sanguíneas estimuladas con antígenos de *Mtb*, en el grupo con DBT¹³⁶.

Los resultados divergentes de dichas investigaciones podrían deberse a las propias diferencias de las poblaciones en estudio, el tiempo de evolución de la TB, la cepa de *Mtb*, la procedencia y tipo de antígenos utilizados, las técnicas analíticas, entre otros.

Los sujetos diabéticos también presentaron una deficiencia en los niveles de GSH, lo que afectaría la producción de IL-17p70 e IFN- γ , al someter sus células mononucleares periféricas (CMP) a antígenos de *Mtb*. Esta deficiencia fue revertida con el agregado de GSH a los cultivos, sin embargo el estudio no reportó el rol directo de la GSH en la comorbilidad¹³⁷.

Las células CD8+ participan en la producción de citocinas proinflamatorias en la TB, incluyendo las del tipo 1 y 17, pero la contribución frente a la comorbilidad no es muy bien conocida. Un estudio reciente en pacientes TB-DBT, encontró un aumento en la frecuencia de células CD8+ que expresan citocinas de tipo 1 (IFN- γ e IL-2) y de tipo 17 (IL-17F) frente a estímulos con antígenos micobacterianos. Los autores además, reportaron una menor expresión de los marcadores citotóxicos Perforina, Granzima B y CD107a, en estas células al someterlas o no al estímulo¹³¹. Nuevamente vemos compromiso de otro tipo celular en los pacientes con la comorbilidad, donde los LT CD8+ presentan una alteración en su potencial citotóxico.

Uno de los factores que podría estar contribuyendo a la exagerada respuesta celular podría deberse a la disminución en la frecuencia y funcionalidad de las Treg. Kumar y colaboradores evidenciaron una disminución de la frecuencia de estas células en la comorbilidad comparada con pacientes sólo con TB¹³³. En contraste, otro estudio informó aumento de las Treg en el sitio de la infección, con niveles incrementados de IL-10 y disminución de IFN- γ ¹³⁸.

En términos generales, la comorbilidad se caracteriza por una respuesta T hiperreactiva antígeno específica respecto de los pacientes sólo con TB, lo que podría contribuir a la severidad de la patología evidenciada en estos individuos.

1.9.3 Disfuncionalidad de la RI frente a *Mtb* en pacientes DBT

La eficiencia de los antibióticos antimicobacterianos depende de la cooperación entre la RI innata y adaptativa, como se expresó anteriormente. Los pacientes diabéticos presentan una RI hiperreactiva, sin embargo, esta no sería efectiva para eliminar al *Mtb* ya que estos pacientes presentan una menor ocurrencia de evolución favorable de la patología. Algunas de las posibles explicaciones al respecto serían:

- La alta respuesta Th1-Th17 encontrada a nivel periférico (CMP) en pacientes TB-DBT, en contraposición a una respuesta mayoritariamente antiinflamatoria en el sitio de la lesión;
- El incremento en cuanto a la producción de IFN- γ a nivel lesional (modelo de ratón) que no es efectiva para la activación de los M ϕ o LT citotóxicos, necesarios para matar al *Mtb*;
- Una respuesta exacerbada frente a antígenos de *Mtb* la cual sería perjudicial en el sentido de contribuir a un mayor daño del tejido pulmonar, y por lo tanto una TB de mayor severidad.

1.10 Interacción neuroinmunoendócrina

Es de amplio conocimiento que el SI y el neuroendocrino forman una parte integrada de nuestra fisiología manteniendo la homeostasis y el estado de salud del individuo.

Existe una regulación recíproca entre ellos. Por su parte el sistema nervioso central (SNC) se comunica con el SI a través de vías de señalizaciones hormonales y neuronales las cuales son esenciales para la supervivencia durante situaciones de estrés, control de la infección y modulación de la respuesta inflamatoria¹³⁹. A su vez el SI al activarse, libera mediadores al torrente circulatorio que, entre otras funciones, estimulan tanto a los ejes hipotalámico-pituitario (HP) -adrenal (HPA), -gonadal (HPG), -tiroideo (HPT), como al eje hipófisis-sistema nervioso simpático-adrenal (HSA)¹⁴⁰.

La principal vía hormonal que participa en la regulación del SI es el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), el cual está formado por el núcleo paraventricular (NPV) en el hipotálamo, adenohipófisis localizada en la base del cráneo y las glándulas adrenales. El NPV secreta la hormona liberadora de corticotropina a la sangre portal hipofisaria y estimula la síntesis de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en la adenohipófisis. La ACTH circula por el

torrente sanguíneo y en la glándula adrenal induce la síntesis y liberación de hormonas esteroideas como GCs y dehidroepiandrosterona (DHEA), entre otras. El eje HPA puede ser regulado por retroalimentación negativa a través de los productos de su activación como la ACTH y GCs. Pero a su vez, el SI también regula al SNC por medio de la liberación de citocinas, siendo aquellas que lo estimulan: IL-1, IL-2, TNF- α , IL-6 e IFN- α , β y γ ^{139,141}. La alteración del eje HPA lleva a un desequilibrio en las interacciones entre los Sistemas endócrino e Inmune, conduciendo a una mayor susceptibilidad a infecciones, enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Es así como una estimulación crónica del eje, acompañada de niveles elevados y sostenidos de GCs, produce supresión de la RI, hechos que se asocian con una mayor susceptibilidad a infecciones virales y/o bacterianas. Mientras que una baja estimulación resulta en bajos niveles circulantes de GCs, con mayor riesgo a padecer procesos inflamatorios¹³⁹.

Durante muchos años se han realizado diversos estudios en torno al funcionamiento del eje HPA en pacientes con DBT. En su mayoría concuerdan con una hiperactivación del eje¹⁴²⁻¹⁴⁴, encontrándose altos niveles de ACTH¹⁴⁵ y de cortisol sérico, antes y después del tratamiento con dexametasona¹⁴⁶, así como incremento de los niveles de cortisol salival¹⁴⁷. Aunque otros reportes no han evidenciado estas alteraciones^{148,149}. Esta discordancia podría deberse en parte a la heterogeneidad de las poblaciones analizadas considerando la diversidad de complicaciones que presentan los pacientes diabéticos. Sin embargo es importante destacar la creciente cantidad de publicaciones en los últimos años que señalan la asociación entre la alteración del eje con la presencia de retinopatía¹⁵⁰, neuropatía¹⁵¹ y macroangiopatía diabética^{152,153}, así como con los altos niveles de HbA1c¹⁴⁴.

1.10.1 Glucocorticoides

Los GCs endógenos son esenciales para la vida y regulan una miríada de procesos fisiológicos y de desarrollo. Al igual que todas las hormonas esteroides, los GCs se sintetizan a partir del colesterol a través de un proceso enzimático llamado esteroidogénesis, que se produce en las mitocondrias. La biosíntesis de GCs ocurre en la corteza suprarrenal (zona fascicular), aunque también se ha informado de la producción local en el timo, el intestino y la piel¹⁵⁴. El principal GC en el hombre es el cortisol (corticosterona en roedores).

Los GCs se relacionaron en primera instancia con el metabolismo al observar que la eliminación de la glándula suprarrenal en animales diabéticos reducía los niveles de Glc en la sangre¹⁵⁵. Los GCs en el hígado estimulan la gluconeogénesis de manera directa, actuando sobre las enzimas glucosa-6-fosfatasa, fructosa-1,6-bifosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa¹⁵⁶. Adicionalmente, estimulan la proteólisis en el músculo esquelético y la lipólisis en el tejido

adiposo, lo que eleva los niveles de aminoácidos y glicerol circulantes y por lo tanto, se generan más sustratos para la gluconeogénesis^{157,158}.

Los GCs también antagonizan la acción metabólica de la insulina, contribuyendo indirectamente en la vía de producción de Glc. Uno de sus principales mecanismos fisiológicos es regular la secreción de insulina, por parte de las células β pancreáticas, para garantizar una homeostasis de la glicemia adecuada. Cuando son secretados de manera crónica, los GCs generan resistencia a la insulina, de manera indirecta favoreciendo la acumulación de TAV, aunque también tienen acción directa sobre diversos tejidos. En músculo esquelético disminuyen los niveles transcripcionales de la molécula sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) mientras que aumentan los de dos proteínas que contrarrestan la acción de la insulina (PTP1B y p38MAPK)¹⁵⁹. También se han reportado alteraciones similares en la vía de señalización de la insulina en hígado y tejido adiposo¹⁶⁰⁻¹⁶². Además, en hígado, los GCs promueven la proteólisis, lipólisis y la producción de AGL así como la acumulación de grasa¹⁶³. La deficiente capacidad de respuesta a la insulina en los tejidos periféricos estimula su demanda y por consiguiente una mayor síntesis en los islotes pancreáticos¹⁵⁷. Investigaciones realizadas en torno al efecto de los GCs sobre las células β pancreáticas muestran resultados inconsistentes. La mayor parte de los estudios *in vitro* indicarían un efecto inhibitorio en la secreción de insulina por parte de estas hormonas^{166,167}, mientras que análisis *in vivo* sugerirían que la falla en las células β pancreáticas se debería al agotamiento funcional o a la glucotoxicidad^{157,168}.

Entre sus diversas funciones, los GCs también afectan la función cardiovascular en las arterias coronarias y alteran los estados mentales y emocionales a través de la acción en el SNC. Estas acciones son especialmente importantes durante periodos de estrés agudo, cuando la liberación elevada de GCs en el torrente sanguíneo ayuda a movilizar el combustible almacenado para la respuesta de "lucha o huida". De esta forma mantienen un suministro de energía (Glc) preparado para el cerebro y mantiene la estabilidad vascular para prevenir una hipotensión potencialmente mortal¹⁶⁵.

Por último y no menos importante, este esteroide tiene importantes funciones inmunomoduladoras.

Efectos inmunomoduladores del cortisol

Los primeros indicios sobre los efectos de esta hormona en el SI surgieron de investigaciones en pacientes con patologías que presentan alteración del eje HPA como por

ejemplo pacientes con síndrome de Cushing (enfermedad que se caracteriza por exceso de GC) y con enfermedad de Addison (caracterizada por deficiencia de este esteroide).

Como previamente se expresó, la activación del eje HPA inducida por citocinas proinflamatorias promueve la secreción de GCs, que, a su vez, suprimen la expresión de las mencionadas citocinas. Estudios recientes han demostrado que la interacción de TLR2 y TLR4 con PAMPs bacterianos y virales en células adrenocorticales induce la producción de GC, y esto es indicativo de una vía inflamatoria involucrada en la producción de GCs paralela al eje HPA¹⁶⁹.

Además, los GCs en condiciones fisiológicas basales (ausencia de estrés), son liberados con un ritmo circadiano, caracterizado por niveles máximos (fase activa) durante la mañana, que declinan a través del día, alcanzando los menores niveles por la noche¹⁷⁰. Estos cambios en las concentraciones de GCs modulan la RI y la migración de leucocitos. A modo de ejemplo, las fluctuaciones en los recuentos de linfocitos en sangre en humanos, se correlacionan inversamente con los patrones diurnos de secreción de GCs, de modo que hay una disminución del 40% en el número de células T circulantes de la noche a la mañana como resultado de la modificación del *homing* celular¹⁷¹. Se han documentado anormalidades o pérdidas del ritmo circadiano en numerosas situaciones de depresión severa, estrés, o infecciones crónicas, con importantes modificaciones en las funciones del SI^{171,172}.

Con respecto a los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los GCs, estos se conocen desde hace más de 70 años. En monocitos y M ϕ los GCs estimulan la capacidad fagocítica frente a blancos potencialmente peligrosos como bacterias, células muertas, restos celulares, etc., pero a su vez suprimen la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, RNS y ROS, a través de mecanismos genómicos y no genómicos¹⁷³. Es así como promueven un fenotipo antiinflamatorio y favorecen la actividad migratoria y la supervivencia de estas células mieloides. El efecto de este esteroide sobre las CD es similar al observado en los monocitos y M ϕ , y además modifica su capacidad inmunogénica ya que inhibe la expresión de moléculas del CMH II y coestimuladoras como CD86 y CD40, restringiendo de este modo la estimulación de los LT. A su vez los GCs promueven la expresión del factor de transcripción GILZ (del inglés *glucocorticoid-induce leucine zipper*), requerido para la inducción de CD tolerogénicas, las que a su vez favorecen la generación de células Treg¹⁷³.

Con respecto a los NE, los GCs producen neutrofilia al favorecer el egreso de estas células desde médula ósea a la circulación e impidiendo la transmigración endotelial hacia el sitio de la infección¹⁷³. A su vez concentraciones elevadas de la hormona reducen los niveles de células T

circulantes ya que favorecerían su migración hacia medula ósea y los órganos linfáticos secundarios¹⁷⁴.

El cortisol como ya se comentó, reprime la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17, IFN γ , TNF- α , GM-CSF). Respecto a los mediadores característicos del perfil Th, en concentraciones fisiológicas este esteroide favorece aquel de tipo Th2, mientras que en concentraciones farmacológicas reduce tanto la síntesis de las citocinas IL-2 e IFN- γ , así como de IL-4 e IL-5. Además las concentraciones farmacológicas de GC reducen el número de LB en los órganos linfoides secundarios, atenúan la proliferación de precursores B y favorecen la producción de IgE en detrimento de IgG¹⁷⁵.

Más allá de sus propiedades inmunosupresoras, existe considerable evidencia sobre la participación de los GCs en la estimulación tanto de la inflamación como de la RI, efectos que no sólo dependerían de la concentración¹⁷⁶ sino también de la relación temporal entre la exposición a estas hormonas y un estímulo nocivo^{177, 178}. Mediante estudios de la expresión del genoma completo de M ϕ humanos, se ha observado que los GCs favorecen vías de genes asociadas a la RI innata, pero suprimen selectivamente aquellas que involucran la RI adaptativa. Por ejemplo, el tratamiento con GCs de CMP aumenta los niveles de varios RRP, receptores de citocinas y quimiocinas, componentes del complemento, entre otros, y disminuye la expresión de genes que codifican para componentes del TCR, como se expuso anteriormente¹⁷⁹.

Señalización mediada por glucocorticoides y biodisponibilidad

Los GCs liberados en la sangre ejercen efectos sistémicos al unirse a sus receptores: receptor de mineralocorticoides (MR) y de GCs (GR). El primero de ellos se localiza a nivel renal e interacciona fundamentalmente con aldosterona, mientras que el segundo se encuentra presente en las células de todo el cuerpo, incluidas las células del hipotálamo y la glándula pituitaria, formando parte de un ciclo de retroalimentación negativa que controla la producción de GCs.

El gen que codifica el GR en el hombre está ubicado en el cromosoma 5. En este receptor, al igual que los demás receptores nucleares, se distinguen tres regiones: el dominio N-terminal, involucrado en el proceso de transactivación; una sección media conocida como dominio de unión al ADN, que está implicada en la unión de ADN mediada a través de dos dedos de zinc; y un dominio C-terminal o dominio de unión al ligando. A través de una regulación post transcripcional del ARNm de GR, se produce el “*splicing*” alternativo del transcripto primario del receptor generando distintas isoformas con alto grado de homología, siendo las más

significativas GR α y GR β . Estas dos isoformas coinciden en los primeros 8 exones del gen, difiriendo sólo en la secuencia del último en la región 3'¹⁸⁰. La isoforma GR α es la que media las funciones biológicas de los GCs, modulando la expresión de genes que responden a estos por medio de la unión a secuencias de ADN o regiones *cis* conocidas como elementos de respuesta específicos de GC (GREs), o mediante el secuestro de factores de transcripción (transrepresión). En contraste, GR β no se une a los GCs y es transcripcionalmente inactivo, pero sí se une a los sitios GRE actuando como inhibidor negativo de GR α . Esta inhibición estaría mediada por su capacidad de formar heterodímeros con la isoforma activa GR α (GR α /GR β), impidiéndole ejercer sus funciones biológicas naturales¹⁷³. Los niveles elevados de GR β se han correlacionado positivamente con resistencia a los GCs en diversas enfermedades como Asma, Artritis Reumatoidea y Colitis Ulcerosa. Además este receptor tiene una vida media mayor que la isoforma GR α , y su expresión se ve incrementada en presencia de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β ¹⁸¹.

Retomando el accionar de los GCs, al ser lipofílicos los mismos ingresan al citoplasma por difusión pasiva y allí se unen a los GR. Este receptor reside principalmente en el citoplasma asociado con proteínas del choque térmico de 90 kDa (hsp90) e inmunofilinas. Seguido de la activación por el ligando, el receptor experimenta una serie de alteraciones conformacionales, dando lugar a su disociación de las chaperonas citoplasmáticas dejando expuestas sus señales de localización nuclear. Estas, son reconocidas por un grupo de proteínas de translocación nuclear, que transportan activamente al receptor hacia el núcleo. Una vez dentro, los homodímeros del receptor reconocen e interactúan con los sitios GRE, localizados en promotores de los genes diana favoreciendo o reprimiendo su transcripción. Además el complejo receptor-hormona puede modificar las funciones de otros factores de transcripción como AP-1, NF- κ B y JAK-STAT, relacionados con la síntesis de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y otros relacionados con la diferenciación celular, proliferación y apoptosis^{173,180}.

La concentración tisular de cortisol no depende sólo de los niveles circulantes de la hormona, ya que a fin de satisfacer sus propias necesidades la mayoría de los tejidos deben regular la disponibilidad de este esteroide a nivel local. Las diferencias en el número de isoformas del receptor, en la afinidad, o en las vías de señalización afectan la sensibilidad de cada célula al GC; pero la habilidad de catabolizar el cortisol es otro factor muy importante para tener en cuenta. Las enzimas que tienen la capacidad de ajustar localmente la disponibilidad de cortisol son la 11-beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (11 β HSD) tipo 1 y 2¹⁸².

La 11 β HSD1, localizada en el retículo endoplasmático celular, es una oxidoreductasa que está presente en casi todos los tejidos, y convierte la cortisona en cortisol. Esta enzima es casi indetectable en monocitos sanguíneos humanos, pero está altamente expresada cuando estos se diferencian en CD o M ϕ . En una gran variedad de tipos celulares (llamativamente no en las células inmunes), la expresión de 11 β HSD1 se ve incrementada rápidamente en presencia de TNF- α e IL-1 β ¹⁸³.

La inhibición de 11 β HSD1 a nivel hepático conduce a la reducción en la liberación de Glc¹⁸⁴. En tejido adiposo esta enzima está preferentemente expresada en los depósitos viscerales¹⁸⁵ controlando la diferenciación, mediada por GC, de los adipocitos¹⁸⁶. Un estudio reciente utilizando un modelo experimental de ratón mostró que la 11 β HSD1 genera resistencia a la insulina en los adipocitos mediante la activación de la vía JNK¹⁸⁷. Por consiguiente, la 11 β HSD1 podría jugar un rol crucial no sólo modulando los efectos reguladores del cortisol sobre la homeostasis de la Glc y el balance energético sino en la distribución del tejido adiposo en el organismo.

Por su parte, la 11 β HSD2 está involucrada en la conversión del cortisol a cortisona. En adultos su distribución está anatómicamente restringida, con una alta expresión confinada a los órganos blanco de la aldosterona para favorecer la unión de esta hormona a su receptor específico, el MR, receptor que también une cortisol y cuya presencia se ve disminuida por acción de esta enzima. Es así que la 11 β HSD2 se encuentra localizada en riñón, colon, glándulas salivales, además en ciertas regiones del cerebro, y con menor expresión en tejido vascular, adipocitos y algunas poblaciones de células inmunes¹⁸⁸.

1.10.2 Dehidroepiandrosterona

La DHEA es una hormona secretada fundamentalmente por la zona reticular de la corteza adrenal. Es un precursor de los andrógenos y estrógenos, constituye un intermediario en la biosíntesis de la testosterona, el estradiol y androstenediol. La DHEA circula en sangre principalmente como éster conjugado bajo la forma de sulfato (DHEA-S) o prohormona. Como hormona activa sólo se la puede encontrar en bajas concentraciones en circulación y a nivel tisular en aquellos tejidos que expresen sulfatasa (STS), enzima distribuida heterogéneamente en los órganos linfoides. Bajo circunstancias normales la DHEA es secretada sincrónicamente con el cortisol en respuesta a la hormona liberadora de corticotropina y a la ACTH¹⁸⁹.

Tanto la DHEA como la DHEA-S muestran variaciones diurnas, sin embargo, las de esta última son muy limitadas. La falta de variación se debe a que es secretada en gran cantidad en el plasma, posee una vida media más larga y la depuración es menor que para la DHEA. En

humanos las concentraciones circulantes de DHEA se encuentran en un rango de 0,003-0,15 μ M, mientras que las de DHEA-S son de 250 a 500 veces mayores en mujeres y hombres respectivamente. Los niveles de DHEA en suero alcanzan su pico máximo alrededor de los 20-30 años y luego disminuyen a lo largo de la vida del individuo¹⁸⁹. Esta hormona posee una evolución tan paralela al envejecimiento humano, que algunos autores la han propuesto como marcador biológico del envejecimiento o *aging*¹⁹⁰ llegando incluso a ser considerada como la hormona "fuente de la juventud"¹⁹¹.

En enfermedades de compromiso sistémico también se observan descendidos los niveles de DHEA y DHEA-S. Asimismo están disminuidas las concentraciones de testosterona y androstenediona, mientras que los niveles de GCs se mantienen elevados¹⁹². En enfermedades inflamatorias crónicas como la Artritis Reumatoidea y Lupus Eritematoso se ha observado el mismo fenómeno, niveles bajos de DHEA y DHEA-S en presencia de concentraciones elevadas de cortisol^{193,194}.

Particularmente en el caso de la DBT diversos estudios muestran una asociación negativa entre bajos niveles circulantes de DHEA e intolerancia a la Glc, hiperglicemia y resistencia insulínica¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Sin embargo, el diseño de corte transversal de tales investigaciones generaba incertidumbre sobre el verdadero rol de la DHEA en esta patología. Un estudio de cohorte prospectivo recientemente publicado, concluyó que niveles séricos más altos de DHEA se asocian de forma independiente con un menor riesgo de desarrollar DBT en poblaciones sanas de hombres y mujeres posmenopáusicas, lo que sugiere que la DHEA podría desempeñar un papel en la patogénesis de esta enfermedad¹⁹⁸.

DHEA como modulador de la respuesta inflamatoria e inmune

Trabajos realizados por Padgett y colaboradores demostraron que la DHEA protegía a los ratones contra infecciones virales letales, como así también de las bacterianas. Asimismo, observaron que la DHEA inhibía la respuesta Th2 inducida por GC en un modelo murino, sugiriendo un efecto contra regulatorio de la DHEA a la acción de los GCs sobre la RI¹⁹⁹. El efecto contra regulatorio de la DHEA también fue sugerido por Rook y colaboradores utilizando un modelo de infección con *Mtb* en ratones²⁰⁰. Además del efecto inmunomodulador de la DHEA en la respuesta Th2, pudo comprobarse que el tratamiento *in vitro* con esta hormona incrementaba la producción de IL-2 por parte de LT CD4+ humanos activados, y que además favorecía la acción citotóxica de las células TCD8+²⁰¹. Este sesgo hacia un incremento en la RI celular, también se observó al estimular CD humanas con antígenos de *Mtb*, donde el

tratamiento con DHEA favoreció la producción de IL-12 por parte de estas células, así como el incremento en la síntesis de IFN- γ por LT autólogos cocultivados con las CD²⁰². Esta modulación por parte de la DHEA hacia un perfil Th1 también fue evidenciada en modelos murinos¹⁹⁴.

La DHEA, además de favorecer la RI celular posee efectos antiinflamatorios, inhibiendo la producción de TNF- α e IL-6²⁰³, evidenciando el rol modulador de esta hormona sobre la función macrofágica. En modelos *in vitro* se ha demostrado que DHEA inhibiría la expresión de moléculas involucradas en procesos inflamatorios como AP-1 y NF- κ B²⁰⁴. Sin embargo, en situaciones patológicas con elevada producción de TGF- β e IL-10, DHEA inhibiría la síntesis de estos mediadores^{202,205}.

Con la edad los niveles de DHEA y DHEA-S disminuyen, mientras que los de cortisol se mantienen constantes, lo que lleva a un incremento en la relación cortisol/DHEA (Cort/DHEA). Tanto en humanos como en modelos murinos se evidenció que este incremento en la relación Cort/DHEA, con el paso de los años, resulta en una disminución de la inmunidad celular. Además, se asoció con un dramático cambio en la expresión de citocinas por parte de los LT, donde los niveles de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) se vieron disminuidos, mientras que la producción de las del perfil Th2 (IL-4 e IL-5) se encontraron aumentadas²⁰⁶. En relación con lo expuesto, Danenberg H.D. y colaboradores demostraron en ratones viejos que la administración de DHEA restablece la producción de citocinas por parte de las células T a niveles equivalentes a aquellos encontrados en ratones adultos²⁰⁷.

1.10.3 Interrelación inmuno-endócrina-metabólica

Frente a diferentes estímulos como el trauma, estrés, inflamación o una enfermedad infecciosa como la TB el individuo reacciona con una respuesta defensiva denominada la respuesta de fase aguda (RFA), caracterizada por alteraciones inmunológicas, metabólicas, neuroendócrinas y hasta conductuales²⁰⁸, con el objetivo de redireccionar los recursos energéticos en pos de favorecer la supervivencia del huésped²⁰⁹. Considerando que las reservas energéticas no son un recurso ilimitado, cuando la infección no logra ser controlada se produce un déficit metabólico que, repercutirá sobre la respuesta defensiva y, en consecuencia sobre el desenlace de la enfermedad²¹⁰.

Los cambios metabólicos vinculados con una respuesta neuroinmunoendócrina que tiende al hipercatabolismo, la ingesta reducida de alimentos y la consecuente reducción del peso corporal durante procesos de naturaleza infecciosa, pueden estar mucho más modificados en

pacientes que de por sí ya se ven afectados por un trastorno metabólico como la DBT. Los mecanismos subyacentes deben implicar una compleja serie de interacciones, habida cuenta de la interconexión entre la red neuroinmunoendócrina, metabolismo y el tejido adiposo blanco (TAB). Respecto a este último, representa una parte sustancial de la reserva energética a utilizar durante periodos prolongados de poco aporte calórico y por consiguiente tiene un rol muy importante en el mantenimiento de procesos fisiológicos de alta demanda de energía, por ejemplo la RI^{211,212,213}. Entre los diversos mediadores que secreta y que hacen de nexo entre inmunidad y balance energético se deben destacar las adipocitocinas.

La **leptina**, un polipéptido secretado fundamentalmente por los adipocitos. Sumado a su accionar sobre la homeostasis energética, la leptina es una suerte de hormona/citocina en virtud de los variados procesos fisiológicos en que interviene tales como inflamación, RI, reproducción y angiogénesis. Bien puede afirmarse entonces que es un mediador crucial en la interrelación entre inmunidad y nutrición. Su importancia en la RI aparece ilustrada por una serie de hechos: el deterioro de la inmunidad mediada por células en ratones homocigotas para la mutación en el gen o receptor de leptina, el efecto potenciador para la proliferación de células T vírgenes, el redireccionamiento hacia respuestas Th1 y la inducción de la síntesis de NO y varias citocinas proinflamatorias en monocitos/M ϕ ^{214,215,216}. En cierta medida la leptina se desempeña como una citocina proinflamatoria²¹⁷. Respecto de su acción hormonal, la leptina regula el peso corporal y relaciona el estado nutricional con las funciones neuroendócrina e inmunológica²¹⁸. Se ha comprobado que los niveles de leptina se correlacionan positiva y negativamente con los de insulina²¹⁹ y GCs, respectivamente²²⁰. Así como la leptina actúa sobre la síntesis de GCs, éstos son potentes reguladores de su expresión produciendo un efecto estimulante sobre los adipocitos tanto para su síntesis como liberación²²¹. Los mecanismos involucrados en infecciones agudas conjuntamente con los mediadores proinflamatorios liberados durante esta respuesta estimulan la síntesis de leptina²²², mientras que la estimulación crónica con estos mediadores suprime su producción²²³.

La **adiponectina** pertenece a la familia de proteínas que comparte homología estructural con el factor del complemento C1q y TNF- α . Esta adipocitocina reduce la liberación de citocinas proinflamatorias a la vez que aumenta la producción de mediadores antiinflamatorios en células inmunes activadas²²⁴. Sus niveles están descendidos en pacientes con obesidad, diabetes/insulino resistencia, aterosclerosis o con un elevado contenido adiposo, por lo que desempeñaría un papel en la regulación de la sensibilidad a la insulina con propiedades antiaterogénicas, y antiinflamatorias. Su producción se centra fundamentalmente a nivel de los

adipocitos, los cuales también pueden sintetizar TNF- α , IL-6 o leptina²²⁵. El TNF- α inhibiría la producción de adiponectina, y ésta a su vez reduce la síntesis y actividad del TNF- α e IL-6, a la vez que promueve la síntesis de IL-10 e IL-1ra²²⁶.

Otros mediadores para considerar con una importante participación en la interrelación inmuno endócrino metabólica, secretados principalmente por la adenohipófisis, son la **hormona de crecimiento humana (hGH)** y la **prolactina**.

La **hGH** es una hormona anabólica que estimula el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. Se encuentra involucrada en la mineralización ósea, en la división y diferenciación de miocitos, así como también en el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos. Actúa principalmente a través de la estimulación de la síntesis y secreción de factores de crecimiento, siendo el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) el más conocido de ellos. Su función metabólica es muy diversa y difiere entre tejidos. Particularmente en el tejido adiposo: induce la lipólisis principalmente de los depósitos viscerales y subcutáneos^{227,228}; estudios recientes han demostrado que modula la acción de los GCs a través de la disminución de la expresión de la enzima 11 β HSD1^{229,230}; en modelos de roedores la deficiencia y exceso de GH se ha visto asociada a niveles elevados y disminuidos de adiponectina, respectivamente^{231,232}. Su rol como hormona contrarreguladora de los efectos de la insulina fue reportado por Houssay y colaboradores, donde animales hipofisectomizados presentaban una mayor sensibilidad a los efectos hipoglicemiantes de la insulina y que esta sensibilidad disminuía luego de la administración de extractos provenientes de la adenohipófisis²³³. El efecto diabetogénico de la hGH fue también demostrado por la alta prevalencia de diabetes en pacientes con acromegalia²³⁴. Por otra parte, se ha reportado que la hGH participa en el desarrollo, regulación y función del SI. Estudios realizados en ratones deficientes en GH mostraron atrofia tímica y esplénica, una disminución del número de células hematopoyéticas y alteraciones en la inmunidad mediada por células. La administración de GH revirtió estos defectos^{235,236}. Se ha demostrado que favorece la RI celular y humoral incrementando la producción de anticuerpos por parte de los LB, la actividad de las células NK y de los M ϕ , y modulando la función de los LT y NE^{237,238}.

Por su parte la **prolactina** es una hormona polipeptídica con amplias funciones que se pueden categorizar en reproductivas, metabólicas, osmorreguladoras e inmunorreguladoras²³⁹. En lo que respecta a su accionar metabólico, éste no sólo se confina a la glándula mamaria, sino que promueve la síntesis de insulina, favorece la adipogénesis y la síntesis de adipocitocinas, entre otros²⁴⁰. Por otro lado tiene una contribución meramente estimuladora sobre el SI:

participa en la diferenciación y maduración de los LB y LT, estimula la proliferación de linfocitos y la función de los M ϕ e incrementa la respuesta inflamatoria así como la producción de inmunoglobulinas^{241–243}.

Entre los mecanismos relacionados con la modulación del estado inmuno-endocrino-metabólico, los **Receptores Activados por Factores de Proliferación Peroxisomal (PPAR)** también podrían jugar un rol sustantivo. Se han reportado 3 subtipos de estos receptores nucleares: PPAR α , PPAR $\beta\delta$ y PPAR γ , son factores de transcripción ligando dependientes que forman heterodimeros con el receptor X retinoide y regulan la expresión de genes diana mediante su unión a elementos de respuesta específicos. Cada PPAR regula la expresión de conjuntos definidos de genes implicados en diversos procesos fisiológicos y patológicos que influyen sobre la inflamación, la homeostasis lipídica, adipogénesis, metabolismo de Glc, sensibilidad a insulina, entre otros²⁴⁴. A modo de ejemplo en un modelo murino se ha demostrado que la activación de PPAR γ lleva a la diferenciación de los adipocitos y a la sensibilidad a insulina²⁴⁵. Asimismo, se ha demostrado que PPAR α interviene en el metabolismo lipídico y en el proceso inflamatorio. Con respecto al primero induce apolipoproteína A1 clave en la generación de partículas HDL, y lipoproteína lipasa enzima central en el metabolismo de triglicéridos. Además inhibe al factor de transcripción NF-kB y por consiguiente la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6²⁴⁶.

Como previamente se comentó el M ϕ alveolar es el hospedero por excelencia del *Mtb* y la contención y/o eliminación de la micobacteria dependerán de su correcta activación. Al respecto, trabajos recientes indican que los PPAR inducirían la activación alternativa de los M ϕ , con incremento de la actividad de la enzima 11 β HSD1²⁴⁷. A su vez se observó que las infecciones micobacterianas provocan un aumento de la expresión y activación de PPAR γ lo que conlleva a un incremento en la formación de gotas lipídicas (M ϕ espumoso) y modificaciones en el perfil de activación del M ϕ , favoreciendo la sobrevida del *Mtb*²⁴⁸.

Los PPARs además de inducir la respuesta antiinflamatoria en las células de la inmunidad innata, también parecen hallarse involucrados en la RI adaptativa participando: en la diferenciación de los LT CD4⁺^{249,250}, favoreciendo el perfil Th2 sobre el Th1 y Th17^{251–253}; en la función de los LB efectoros y en la expresión de citocinas²⁵⁴; así como en la inducción de células Treg, su función y su sobrevida^{255,256}.

1.11 Construcción de la hipótesis de trabajo

Como fue mencionado previamente, la manifestación clínica pulmonar de la infección con *Mtb* en el hombre dependerá fundamentalmente de la interacción entre el agente etiológico y

la RI que pueda generar el hospedero. Es así que el grado de compromiso de la infección puede oscilar desde un proceso banal y asintomático hasta una franca patología pulmonar con formación de cavidades y marcada carga bacilar²⁵⁷.

Estudios realizados en el Laboratorio de Fisiopatología de la TB en el IDICER, han demostrado que los pacientes con formas leves de TB presentan un patrón de respuesta Th1 el cual va disminuyendo gradualmente con mayor preponderancia de respuesta Th2 (por ej. IL-4) a medida que la enfermedad progresa⁷⁶. Sumado a su accionar inmunológico “*per se*” las citocinas proinflamatorias liberadas durante la RI (fundamentalmente TNF- α , IL-6 e IFN- γ) estimulan el eje HPA para provocar una importante respuesta hormonal, que a su vez repercute sobre esta RI. Es así como, investigaciones del grupo indican que los esteroides adrenales influyen sobre la funcionalidad de las células inmunocompetentes en pacientes TB. Particularmente dosis de cortisol, simulando una situación de estrés agudo, mostraron un efecto inhibitorio sobre la respuesta proliferativa específica y la síntesis de IFN- γ por parte de CMP tanto de pacientes con TB como de HCo²⁰⁵.

El estudio en torno a las alteraciones inmunoendócrinas durante la TB llevado a cabo por este grupo demostró que los pacientes que padecían TB presentaban niveles plasmáticos aumentados de IL-6, IFN- γ , cortisol y hormonas tiroideas en relación con HCo, conjuntamente con bajos niveles de DHEA, correspondiéndole a las formas avanzadas los valores más descendidos²⁵⁸. En paralelo, se observó una marcada elevación en los niveles de GH que no estuvo acompañada de un aumento de IGF-1 lo que sugeriría un estado de resistencia a la GH²⁵⁸. Este perfil de cambios hormonales compromete la RI del paciente y su estado clínico ya que favorece una situación hipercatabólica²⁵⁸.

El estado clínico del paciente con TB se manifiesta, en parte, con un descenso del IMC el cuál se comprobó guardaba relación con la disminución de la RI específica *in vitro* que presentaban estos pacientes²⁵⁹. Además, un análisis más exhaustivo de la interrelación inmuno-endócrina-metabólica mostró niveles reducidos de leptina y DHEA, y concentraciones aumentadas de IL-6, IL-1 β , IFN- γ , cortisol, GH y adiponectina, donde se evidenció una asociación negativa entre los niveles de IL-6 y el IMC. Frente a la progresión de la enfermedad el IMC y la leptina descendían aún más, mientras que se elevaban las concentraciones de IL-6, CRP, IL-1 β , ghrelina y cortisol^{259,260}. Estos hallazgos denotan que frente a una patología crónica como la TB la resultante de la respuesta inmuno-endócrino-metabólica del hospedero contribuiría a la progresión de la patología.

Retomando la respuesta del eje HPA en TB, los pacientes mostraron un aumento significativo en los niveles sistémicos de cortisol, aunque no tan elevados como podría esperarse por la gran respuesta inflamatoria existente^{258,261}, lo que llevó a suponer un cierto estado de resistencia a la acción biológica de los GCs. Es así que en CMP de pacientes se observó una disminución en la relación de los niveles de los transcritos GR α /GB β y un aumento en los de 11 β HSD1, constatándose resistencia a la acción de los GCs endógenos, fundamentalmente en pacientes con TB severa^{246,262}.

Otros factores transcripcionales, además del GR, pueden intervenir como moduladores del metabolismo celular y de la respuesta inflamatoria, entre ellos los PPARs. Al respecto, se observó en CMP de pacientes con TB, aumento en los niveles de expresión de los transcritos de PPAR α y PPAR γ encontrándose este último correlacionado positivamente con los niveles de cortisol plasmático²⁶³.

En lo concerniente a la DBT, desde hace mucho tiempo se conoce que esta enfermedad es uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la TB, y las cifras hablan de una triplicación en la posibilidad de presentar esta patología⁹⁻¹¹, sumado al hecho que la enfermedad puede ser más grave en los casos con DBT mal controlada⁵⁻⁷. Respecto de la DBT en sí, tanto la OMS como la Federación Internacional de Diabetes señalan que el número de diabéticos podrá llegar a 630 millones en el 2045, con la mayor cantidad de casos localizados en países en vías de desarrollo donde la TB es más prevalente⁸. Frente a esta situación es necesario retomar los conceptos señalados anteriormente respecto a la DBT como enfermedad inflamatoria crónica, donde la obesidad toma un rol fundamental dada la gran cantidad de mediadores, mayoritariamente proinflamatorios (CRP, IL-6, IL-1 β , TNF- α , leptina, etc), secretados por el TAV²⁶⁴, sin dejar de lado que diversos reportes señalan una hiperactivación del eje HPA¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Ante la presencia de DBT y la intrincada red de interacciones inmuno-endocrino-metabólicas que subyacen a la fisiopatología de la TB, es posible pensar que esta comorbilidad podría estar asociada en la generación de un mayor desbalance en los mecanismos de regulación cruzados entre citocinas proinflamatorias, adipocitocinas, esteroides adrenales y hormonas vinculadas al control de la glicemia cuya resultante contribuiría aún más al deterioro de la RI anti-TB y por consiguiente a la instauración de la patología.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El curso de la TB se acompaña de importantes alteraciones en la RI, endócrina y metabólica con una repercusión negativa no sólo en cuanto al desarrollo de inmunidad protectora sino también para la situación clínica del paciente, en particular el desbalance energético al generar un estado hipercatabólico²¹⁰. A su vez la DBT como “pandemia” se ha constituido en un factor de riesgo reemergente de la TB. Estos pacientes muestran una RI innata y adaptativa disfuncional con respecto a los pacientes no diabéticos: la capacidad fagocítica de los M ϕ se encuentra disminuida, en modelos animales se observa un mayor retardo en la migración de las CD y en la presentación antigénica, la respuesta inflamatoria está hiperactivada, la estimulación *in vitro* de CMP con antígenos micobacterianos induce una importante respuesta de tipo Th1 y Th17 y si bien hay producción de IFN- γ , los macrófagos no son capaces de eliminar a la micobacteria^{123,128,134}. En adición a lo descrito, si bien es conocido que los pacientes diabéticos con complicaciones presentan un incremento en la actividad del eje HPA¹⁴²⁻¹⁴⁴, no se conoce cuál es su participación en el paciente diabético infectado.

A partir de esta base, el presente trabajo se enmarca en profundizar los conocimientos sobre los procesos fisiopatológicos que subyacen en la asociación entre TB-DBT mediante el análisis del perfil inmuno-endócrino-metabólico en pacientes con la comorbilidad.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 En una muestra de pacientes con TB pulmonar, con presencia o no de DBT y respectivos controles (HCo y pacientes sólo con DBT) se propuso:

- Conocer las variaciones producidas en los niveles circulantes de mediadores que participan en la interrelación inmuno-endócrino-metabólica (IL-1 β , IL-6, CRP, IFN- γ , IL-10, IL-4, cortisol, DHEA, DHEA-S, GH, prolactina, leptina, adiponectina e insulina); así como la capacidad blastogénica específica de las CMP de los distintos grupos en estudio.
- Explorar las modificaciones de los niveles de los transcriptos relacionados a la funcionalidad de los GCs como las isoformas GR α y GR β y las enzimas 11 β HSD tipo 1 y 2, y de factores transcripcionales involucrados con procesos metabólicos e

inflamatorios como las isoformas PPAR α y PPAR γ , en CMP de los distintos voluntarios.

- Definir si los parámetros previamente cuantificados se correlacionan entre sí y con otras variables vinculadas al estado metabólico de los sujetos (IMC y parámetros del laboratorio clínico que se detallan en la sección Materiales y Métodos).

2.2.2 El accionar de las células inmunocompetentes depende de una serie de factores que conforman el microambiente en que se hallan. Al respecto, el cortisol es un conocido inhibidor de la RI²⁰⁵ y regula el metabolismo de la Glc, por su parte la hiperglicemia es el signo más prominente que caracteriza a la DBT, y a su vez contribuye a la disfuncionalidad de los leucocitos de los pacientes diabéticos^{265,266}. Es así como resultó de interés conocer la modulación de la RI anti-TB de CMP provenientes de los distintos grupos en estudio (ítem 2.2.1) frente a un microambiente hiperglicémico y/o de estrés mediado por cortisol. Para cumplimentar este objetivo se propuso:

- Analizar la respuesta proliferativa frente a *Mtb* irradiado y la producción de citocinas involucradas en la RI anti-TB (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-17) ante el tratamiento con dosis suprafisiológicas de Glc, en presencia o no de cortisol.
- Conocer las potenciales correlaciones entre los parámetros inmunológicos cuantificados.

2.2.3 Dado el rol central que desempeña el M ϕ en la RI frente a *Mtb* y que los PPARs modulan el tipo de diferenciación y funcionalidad de estas células se planteó:

- Comparar los niveles de expresión de los transcritos para PPAR α y PPAR γ , en cultivos de M ϕ derivados de la línea celular humana pro monocítica THP1, frente *Mtb* irradiado y bajo la presencia de dosis fisiológicas o suprafisiológicas de Glc y/o de cortisol.
- Analizar los niveles citocinas pro y antiinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-10) en los sobrenadantes de los mencionados cultivos y explorar su asociación con los niveles de expresión de los transcritos antes mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Grupos de estudio

3.1.1 Pacientes con TB (con y sin diabetes tipo 2)

La muestra de pacientes se seleccionó entre enfermos adultos (18 a 65 años) que previamente no habían recibido fármacos antibacilares. Los mismos fueron seleccionados por médicos especialistas de entre los enfermos que concurrieron a los Servicios de Neumonología del Hospital Provincial del Centenario, del Hospital Provincial Eva Perón de Granadero Baigorria y al Servicio de Tisioneumonología del Policlínico Intendente Carrasco de Rosario.

Todos fueron pacientes con serología negativa para VIH, y el diagnóstico de TB pulmonar se realizó sobre la base de criterios clínicos y radiológicos sumado a la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo y/o cultivo del mismo. Se excluyeron del estudio aquellos sujetos que habían iniciado tratamiento para la TB, o que pudieran presentar patologías con compromiso de la glándula suprarrenal. Tampoco se incluyeron mujeres embarazadas, mujeres que estuvieran amamantando o menores de 18 años, ni personas que presentaban patologías que comprometían el eje HPA o que estuviesen medicadas con corticosteroides, inmunosupresores o inmunomoduladores.

Es importante considerar que la TB puede causar hiperglicemia transitoria y por lo tanto un sobrediagnóstico de DBT es posible²⁶⁷, sin embargo los pacientes incorporados que padecían ambas patologías tuvieron un diagnóstico de DBT previo al de TB y se encontraban bajo tratamiento con antiglicemiantes e hipolipidemiantes.

La muestra de sangre se obtuvo antes del inicio del tratamiento específico. En todos los pacientes con TB se tuvo en cuenta el grado de compromiso pulmonar (según la extensión y tipo de lesión radiológica) y se incluyeron pacientes con enfermedad leve (pacientes con único lóbulo pulmonar involucrado, sin cavidades visibles), moderada (pacientes con compromiso unilateral de 2 o más lóbulos y las cavidades, de hallarse presentes, que no excedan un diámetro total de 4 cm) y avanzada o severa (enfermedad bilateral con afectación masiva y cavidades múltiples).

3.1.2 Controles sanos (HCo)

Este grupo lo conformaron voluntarios sanos similares en sexo y edad al grupo de pacientes, vacunados con BCG, que no registraron contactos con pacientes con TB, enfermedades inmunológicas o trastornos endocrinológicos. También se excluyeron del estudio mujeres

embarazadas y menores de 18 años, manteniendo los criterios de exclusión descriptos para los pacientes con TB.

3.1.3 Pacientes con DBT sin TB

Conformado por un grupo de pacientes con diagnóstico de DBT de características similares a las de aquellos pacientes enrolados que presentaron ambas patologías (TB y DBT), en cuanto a edad, sexo, antropometría y características del tratamiento de la metabopatía. Entre los criterios de exclusión, además de los ya descriptos, se consideraron insuficiencia cardíaca, hepática o renal severa.

3.2 Parámetros clínicos y bioquímicos

Las siguientes variables de laboratorio clínico fueron cuantificadas por el Laboratorio Central del Hospital del Centenario: hemograma completo con recuento de plaquetas, glicemia, uremia, creatininemia, uricemia, proteínas totales plasmáticas, albuminemia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, apolipoproteína A-1, apolipoproteína B, trigliceridemia, lipoproteína a, bilirrubinemia total, directa e indirecta, fosfatasa alcalina total, pseudocolinesterasa sérica, GOT, GTP, LDH, HbA_{1c}, insulinemia basal y velocidad de eritrosedimentación.

Con el propósito de analizar potenciales factores de confusión sobre las variables de impacto se recabaron datos clínicos en relación con edad y sexo, antecedentes de alcoholismo, uso de drogas no permitidas, uso de medicamentos o enfermedad pulmonar obstructiva crónica vinculada al tabaquismo. Además, se determinaron el peso y la talla, con las que se calculó el índice de masa corporal [IMC (kg/m^2) = $\text{peso}/\text{talla}^2$], y se recabó información acerca de otras variables vinculadas a la TB como síndrome de impregnación bacilar, frecuencia cardíaca y respiratoria. También se registraron, cuando correspondiera, datos respecto de las características de la DBT (antigüedad de la enfermedad, tratamientos y adherencia a los mismos, antecedentes de complicaciones agudas (cetoacidosis y/o hipoglucemias) y/o crónicas (p.ej. nefropatía, retinopatía, neuropatía, macrovasculopatía). Para su diagnóstico se tomaron en cuenta los criterios de la Asociación Americana de Diabetes de 2009 (dos glicemias en ayunas superiores a 125 mg/dl, dos glicemias postcarga oral de glucosa superiores a 199 mg/dl, y/o una glicemia al azar superior a 199 mg/dl acompañada de la presencia de síntomas característicos de diabetes descompensada –poliuria, polidipsia, pérdida de peso, etc.). La calidad del control de la glicemia se evaluó a través de la medición de los niveles de HbA_{1c} en sangre circulante^{268,269}. La resistencia a la insulina se estimó en base al método de HOMA_{IR}: insulinemia basal ($\mu\text{U}/\text{ml}$) x

glicemia (mmol/l)/22,5²⁷⁰. Este cálculo es un procedimiento simple, poco invasivo, y que permite mediante una fórmula validada y bien establecida, precisar un valor numérico expresivo de la resistencia a la insulina, característica preponderante de la DBT. De acuerdo a la bibliografía disponible, se consideró resistencia a insulina a un valor de índice HOMA_{IR}≥3,2²⁷¹.

La incorporación de los voluntarios se efectuó luego de que otorgaran su libre consentimiento por escrito a participar del proyecto. Todos ellos fueron previamente informados de los objetivos del estudio, el cual se ajustó a las normas éticas nacionales e internacionales que regulan la investigación en seres humanos y fue aprobado por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (Res C.D. N° 1073/2011, expediente 44120/0025, FCM, UNR).

3.3 Recolección de muestras y separación de células mononucleares periféricas

A primera hora de la mañana, se obtuvo una muestra de sangre (50 ml) anticoagulada con EDTA (Wiener Lab. Rosario, Argentina) en una proporción de 100µl cada 10ml de sangre. Una alícuota de la misma se utilizó para obtener los resultados del laboratorio clínico y hemograma.

En el Área de cultivo del Instituto las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 rpm, se retiró el plasma al cual se le adicionó Trasylol (Bayer Pharmaceuticals Corporation, Alemania) para una mejor conservación de las proteínas y se fraccionó y conservó a -20° C hasta su utilización. Luego se extrajo la capa de leucocitos ubicados en la interfase del paquete de glóbulos rojos y el plasma, la cual se resuspendió en igual volumen de solución salina de buffer fosfato (PBS, pH=7,4) adicionado con penicilina-estreptomicina (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria, 500µl/100ml de PBS) el que se designó como PBS*. Estas suspensiones celulares se agregaron en una proporción 2:1 a tubos que contenían Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA. $\delta=1,077\text{g/ml}$), los mismos se centrifugaron durante 30 minutos a 1800 rpm. El aislamiento de las CMP se realizó teniendo en cuenta la diferencia de densidades que existe entre los elementos figurados de la sangre. A tal efecto, sólo se retiraron las células mononucleares que permanecían en la interfase entre el Ficoll-Paque y el plasma diluido con PBS*.

Las CMP se lavaron 3 veces con PBS*, centrifugando durante 15 minutos a 1200 rpm. Por último, el paquete celular se resuspendió en PBS*, asegurando una buena dispersión por agitación y se realizó el conteo y evaluación de la viabilidad de las células mediante el colorante de exclusión azul Tripán.

Una parte de las CMP se diluyeron en medio de cultivo completo [MCC: RPMI 1640 adicionado con ATB y 5 % de suero humano AB (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria),

inactivado en baño de agua a 56°C durante 30 minutos con agitación constante] hasta obtener una suspensión de 2×10^6 células/ml, las que se utilizaron en cultivos celulares. El resto de las CMP se preservaron en TRI Reagent® (Genbiotech) a -80°C en una concentración de entre 5 a 8×10^6 Células/ml de TRI Reagent® hasta su utilización.

Las distintas subpoblaciones linfocitarias y monocitos se identificaron y cuantificaron por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos de una fracción de la muestra de sangre, mientras que las células Treg CD4+CD25+FoxP3+ a partir de una alícuota de las CMP como se describe en las secciones 3.5 y 3.6 respectivamente

3.4 Análisis de la capacidad proliferativa de las CMP de los distintos voluntarios

A fin de analizar la capacidad de respuesta de las CMP, obtenidas de los diferentes grupos de estudio, frente al estímulo específico con *Mtb* cepa H37Rv muerto por radiación gamma (*Mtbi*, 8µg/ml, Colorado University, Co, USA), se realizaron cultivos en microplacas de fondo plano de 96 pocillos por triplicado. En cada pocillo se sembraron 100µl (2×10^5 células) de las células resuspendidas en MCC y se estimularon con *Mtbi*. Como control positivo de proliferación se utilizó Concanavalina A (ConA, 2,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Al finalizar las siembras, conteniendo un volumen final de 200 µl/pocillo, las placas se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera de aire humidificada con 5% de CO₂. Dieciocho horas previas a la finalización del cultivo se agregó 1µC de ³[H]timidina en cada pocillo. Las células se cosecharon en papel de fibra de vidrio y posteriormente se procedió a la medición de la radioactividad incorporada en contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Raskbeta). Los resultados se expresaron como Índice de Estimulación (IE: cuentas por minuto -cpm- promedio de los cultivos estimulados/ cpm promedio de los cultivos sin estimular).

3.5 Determinación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de superficie de leucocitos humanos: CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-PE, CD8-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD45-FITC/CD14-PE (Simultest LeucoGATE, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y CD3-FITC/CD19-PE (Simultest CD3/CD19, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). La inmunotinción de los antígenos de superficie se realizó tomando 3 alícuotas de 50µl de sangre entera a la que se le adicionaron las respectivas combinaciones de los anticuerpos monoclonales correspondientes y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Luego se procedió a la lisis de los eritrocitos mediante una solución de NaHCO₃/NH₄Cl. Tras dos lavados con el buffer de corrida (BD FACSflow, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) las muestras

fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSDiva II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) utilizando el programa Cellquest (version 3.1).

3.6 Determinación de células T reguladoras

Una fracción de las CMP fue reservada para la determinación de la población de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+). Para ello se procedió a la inmunotinción de los antígenos de superficie CD4 y CD25 (CD4-PEcyc5.5 y CD25-PE, Caltag, Invitrogen, Buckingham, UK), incubando las células con los anticuerpos monoclonales correspondientes durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras ello las células fueron lavadas con el buffer de corrida FACSflow y se procedió con la inmunotinción intracelular de FoxP3. Para ello las células fueron permeabilizadas y fijadas (buffer de permeabilización eBioscience, San Diego, CA, USA) según indicación del fabricante. Se realizó entonces la incubación con el anticuerpo monoclonal anti FoxP3-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA) en oscuridad y 4°C durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados y se procedió a la adquisición de los datos en un citómetro de flujo FACSDiva II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) utilizando el programa Cellquest (version 3.1).

3.7 Cuantificación de citocinas, hormonas y otros factores

Las cuantificaciones de las concentraciones plasmáticas de las citocinas IFN- γ (BD optEIA, BD Biosciences, San Jose, USA, Límite de detección -LD-: 4,7 pg/ml), IL-6 (Invitrogen, Carlsbad, USA, LD: 0,07 pg/ml), IL-4 (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, USA, LD: 7,8 pg/ml), IL-10 (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, USA, LD: 7,8 pg/ml), IL-1 β (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, USA, LD: 3,9 pg/ml) y de las hormonas cortisol, DHEA, DHEA-S, GH (DRG Systems, Alemania, LD: 2,5 ng/ml, 0,108 ng/ml, 0,1 μ g/ml, 0.17 μ IU/ml, respectivamente), prolactina (ACON laboratorios, San Diego, USA, LD: 1,0 ng/ml), adiponectina (Invitrogen, Camarillo, USA, LD: 100 pg/ml) y leptina (Invitrogen, Camarillo, USA, LD: 3,5 pg/ml) se realizaron utilizando Kits de ELISAs comerciales y siguiendo las indicaciones del fabricante. Los niveles plasmáticos de CRP se cuantificaron mediante PCR ultrasensible Turbitest, (Wiener Lab., Rosario, Argentina, LD: 2,5 mg/l).

3.8 Modulación de la respuesta al *Mtbi* por cortisol y/o glucosa

La mayor parte de las CMP obtenidas de acuerdo a lo descrito en el ítem previo 3.3, se cultivaron en policubetas de 96 y 24 pocillos (2×10^5 y 1×10^6 células/pocillo respectivamente) las que se trataron o no con cortisol (0,1 μ M y 1 μ M)^{205*}, adicionadas con D-Glucosa (Glc; concentraciones fisiológica -5mM- y suprafisiológicas -10, 20, 40mM- Sigma Aldrich, San Luis,

MO, USA) y además se estimularon o no con *Mtbi*. Luego se incubaron a 37°C en atmosfera de aire humidificada con 5% de CO₂. La modulación de la capacidad proliferativa frente a los distintos tratamientos se evaluó por incorporación al ADN de ³[H]timidina según lo descrito en el ítem 3.4.

A partir de los cultivos en policubetas de 24 pocillos, se obtuvieron los sobrenadantes (24h) que se fraccionaron y preservaron a -20°C hasta la determinación de los diferentes patrones de citocinas de LTCD4+ utilizando el Kit CBA (Cytometric Bead Array, ítem 3.9).

En síntesis, las CMP recibieron los siguientes tratamientos:

- Glc (5, 10, 20 ó 40 mM)
- Glc (5, 10, 20 ó 40 mM)+ *Mtbi*
- Glc (5, 10, 20 ó 40 mM) + Cortisol (0,1µM ó 1µM) + *Mtbi*

**Nota. La solución madre de cortisol (0.1M) se preparó de la siguiente manera: 18,125mg de Hidrocortisona (Sigma-Aldrich) se resuspendieron en 2,5ml de etanol absoluto. Luego de 30 min de incubación a 37°C en frasco tapado, se adicionaron 2,5ml de solución fisiológica a 37°C. La solución se fraccionó y conservó a 4°C previa esterilización con filtro de 0,2 µm.*

3.9 Detección de citocinas de los patrones Th1/Th2/Th17 por citometría de flujo

El Kit CBA (Cytometric Bead Array) Humano Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), se utilizó para la cuantificación en simultáneo de: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ e IL-17A (LD: 2,6; 4,9; 2,4; 4,5; 3,8; 3,7 y 18,9 pg/ml respectivamente). Para el procesamiento de los sobrenadantes de cultivo de CMP se siguieron las indicaciones del fabricante. Los niveles de las citocinas fueron calculados utilizando el Software para CBA de BD (versión 4.0, BD Biosciences).

3.10 Cultivo de la línea celular THP1

La línea celular monocítica humana THP1²⁷² se cultivó en RPMI 1640 sin Glc adicionado con: 5mM Glc, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, HEPES, L-glutamina y ATB (MCC_T). Las células, que crecen en suspensión, se sembraron en placas de 24 pocillos (8x10⁵ células/pocillo) y se diferenciaron a Mø por tratamiento con 30 ng/ml forbol-12-miristate-13-acetato (PMA, Sigma Aldrich, San Luis, MO, USA). Luego de 24 h se retiró el sobrenadante y se incubaron con MCC fresco.

Luego de 48 h las células diferenciadas a Mø se trataron con las distintas concentraciones de cortisol (0,1µM ó 1µM) y/o Glc (10, 20, 40mM) y se desafiaron con *Mtbi*. Se incubaron a 37°C en atmosfera de aire humidificada con 5% de CO₂ y a las 24h se obtuvieron los sobrenadantes

que se preservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la cuantificación de mediadores. Las células se preservaron en TRI-Reagent® para la posterior cuantificación de transcritos.

La cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultivos de THP1 se realizó por ELISA comerciales: IL-1 β (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, USA, LD: 3,9 pg/ml), IL-6 (Invitrogen, Carlsbad, USA, LD: 0,07 pg/ml), e IL-10 (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, USA, LD: 7,8 pg/ml).

3.11 Cuantificación de la apoptosis inducida por variaciones osmóticas y/o elevadas concentraciones de glucosa sobre CMP y M ϕ derivados de la línea THP-1 estimuladas o no con *Mtb*

Las altas dosis de Glc utilizadas modifican la osmolaridad del medio de cultivo (MCC $_T$) y además podrían tener un efecto tóxico, afectando ambas la viabilidad celular. Se analizó el efecto del incremento de la osmolaridad y de las concentraciones de Glc sobre la apoptosis de CMP de HCo y M ϕ derivados de la línea celular THP-1. Utilizando el kit comercial *FITC Annexin V Apoptosis Detection* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) se cuantificó el porcentaje de apoptosis por citometría de flujo, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Breve fundamentación de la técnica: La fosfatidilserina (PS) normalmente se encuentra ubicada en la cara interna de la membrana plasmática. La unión específica del conjugado Anexina V-FITC a la PS se observa en un estadio temprano de la apoptosis cuando la PS se transloca hacia la cara externa de la membrana, y durante estadios tardíos del fenómeno cuando las células ya presentan necrosis y ocurre la permeabilización de la membrana, lo cual permite la entrada del conjugado. Dado que otras causas además de la apoptosis pueden resultar en la necrosis de las células, es importante poder diferenciar estos dos fenómenos. Para ello, se utiliza la tinción conjunta con el fluoróforo Ioduro de Propidio (IP), el cual ingresa a la célula y se une al ADN al permeabilizarse la membrana. De esta forma, tal como se observa en la **Ilustración 1**, mediante este método de doble tinción con Anexina V-FITC/Ioduro de Propidio se pueden distinguir las poblaciones apoptóticas de las necróticas.

Para analizar el efecto del incremento de la osmolaridad sobre la apoptosis, se realizaron cultivos con y sin estímulo, tanto de CMP de HCo (n=3) como de M ϕ derivados de la línea celular THP-1 (n=3), a los que se les adicionó manitol (Sigma Aldrich, San Luis, MO, USA), un hidrato de carbono no metabolizable, en distintas concentraciones (5, 15 y 35mM) conjuntamente con la

dosis fisiológica de Glc (5mM) para obtener una osmolaridad final de 10, 20 o 40mOsm, respectivamente. Para estudiar el efecto de las altas concentraciones de Glc sobre la apoptosis se realizaron cultivos en paralelo de los tratamientos con y sin estímulo en las distintas concentraciones de Glc ya descritos en las secciones **3.8** y **3.10**.

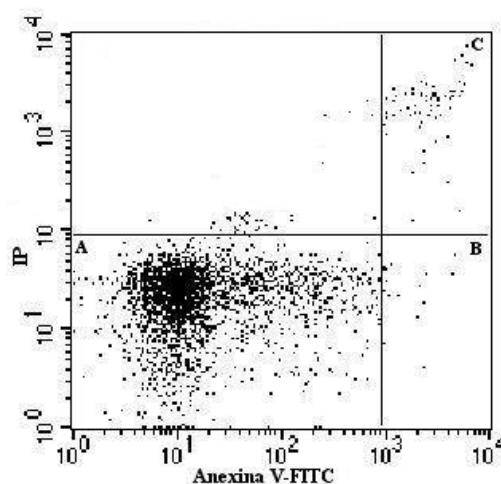


Ilustración 1: Análisis de la apoptosis de CMP en cultivos de 24 h por marcación con Anexina-V/Ioduro de propidio. (A) Células no apoptóticas: Anexina V-FITC negativas e IP negativas. (B) Células en apoptosis temprana: Anexina V-FITC positivas e IP negativas. (C) Células en apoptosis tardía o necróticas: Anexina V-FITC positivas e IP positivas.

3.12 Cuantificación en tiempo real de los ARNm de $GR\alpha$, $GR\beta$, $11\beta HSD1$, $11\beta HSD2$, $PPAR\gamma$ y $PPAR\alpha$

3.12.1 Protocolo general

La expresión de los transcritos **$GR\alpha$, $GR\beta$, $11\beta HSD1$, $11\beta HSD2$, $PPAR\gamma$ y $PPAR\alpha$** en CMP como la de **$PPAR\gamma$ y $PPAR\alpha$** en M ϕ derivados de la línea celular THP-1, se cuantificó mediante la técnica de transcripción reversa del ARN total seguido por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). El ARN total de las CMP o de los M ϕ derivados de la línea celular THP-1 en cultivo se aisló utilizando TRIreagent y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración, calidad e integridad del ARN se evaluó por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa, respectivamente. La síntesis de los ADNc se realizó a través de la extensión de oligos dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por medio de la transcriptasa reversa del virus de leucemia mamaria de ratón, el protocolo se describe en la sección 3.12.3. La amplificación en tiempo real de los transcritos de interés ($GR\alpha$, $GR\beta$, $11\beta HSD1$, $11\beta HSD2$, $PPAR\gamma$ y $PPAR\alpha$) se llevó a cabo en un StepOnePlus™ (96 well) Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™),

monitoreada mediante la determinación del colorante fluorescente Eva Green (Blocientífica). Como control interno para efectuar la normalización de los resultados se utilizó la expresión del gen peptidilpropil isomerasa A (cyclophilin A, CycA), cuyo ARNm fue retrotranscrito y amplificado para cada muestra²⁷³. El método permitió cuantificar los niveles relativos de expresión de los ARNm. En cada corrida se incluyeron curvas externas constituidas por diluciones seriadas de ADNc del transcripto a cuantificar, obtenido a partir de las líneas celulares Jurkat y NCI-H295R que expresan los mencionados transcriptos. La homogeneidad y especificidad de los productos de la PCR obtenidos en cada muestra se confirmó mediante el análisis de curvas de “melting” luego de finalizada la amplificación, y siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo.

El análisis de los resultados obtenidos en la cuantificación de los transcriptos se realizó mediante el “Método de Curva Estándar Relativa”²⁷⁴.

3.12.2 Diseño de cebadores

Los cebadores o *primers* utilizados fueron los mismos que en trabajos previos²⁷⁵ los cuales fueron diseñados utilizando el software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) en base a las secuencias disponibles *on line* en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. La lista de los cebadores utilizados se describe en la **Tabla 1**.

3.12.3 Condiciones de reacción de la retrotranscripción

Las retrotranscripciones se realizaron utilizando un termociclador **TC-5000 Techne** (Techne Inc., Burlington, USA), utilizando la enzima MMuLV (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Mezcla de reacción de cada tubo: 1 mM dNTP (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); 1µg oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 2µg ARN total; 8µl solución tampón 5X; 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); 200 U RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, Pittsburgh, PA, USA); H₂O c.s.p. volumen final de 40µl. El perfil térmico utilizado en la retrotranscripción se detalla en la **Figura 1**. Cabe mencionar que en la fase inicial de desnaturalización de los pasos 1 y 2 los tubos sólo contenían el ARN total, los dNTP y el oligo dT en un volumen final de 25 µl. En el paso 3 (**Figura 1**) se coloca el equipo en pausa, los tubos en hielo durante 5' y se adicionan el resto de los componentes de la mezcla de reacción, para evitar disminución de su actividad enzimática por calor. Luego se regresan los tubos al termociclador (paso 4, **Figura 1**) para realizar la retrotranscripción. El ADNc es guardado a -70°C hasta la realización de la PCR.

3.12.4 Condiciones de reacción de la PCR en tiempo real (PCRq)

Cada reacción de PCRq consistió en 3µl de la dilución correspondiente de ADNc; 0.4-0.5 µM de cada juego de *primers*; 3µl de 5x FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) y H₂O c.s.p. volumen final de 15µl.

Perfil térmico de la PCRq para **CycA**: un ciclo de iniciación de 12' a 95°C; 40 ciclos de elongación (7'' a 95°C, 25'' a 60°C, 25'' a 72°C, 10'' a 84°C). Cada transcripto presentó una temperatura de anillado y lectura particular detallados en la **Tabla 2**.

En las **Figuras 2, 3, y 4** se muestran de manera representativa la curva estándar, las curvas de amplificación y las de disociación, respectivamente, obtenidas en uno de los ensayos de PCRq (*CycA*). Cabe destacar que la cuantificación relativa de algunos de los transcriptos fue puesta a punto en la Tesis del Dr. D'Attilio²⁷⁶.

3.13 Análisis estadísticos

Las comparaciones se efectuaron por medio de procedimientos estadísticos para grupos independientes como las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Para el caso de muestras relacionadas, como los cultivos *in vitro* de CMP sometidas a los distintos tratamientos, las comparaciones se realizaron mediante las pruebas de Friedman y la de Wilcoxon.

Las correlaciones entre dos variables se efectuaron aplicando el método de correlación de Spearman. Los mencionados análisis estadísticos se realizaron por medio del programa Graphpad prism 4. El análisis multivariado de componentes principales se realizó utilizando el programa PC-ORD versión 4. El nivel de significación estadística se fijó a $p < 0.05$.

Tabla 1: Cebadores seleccionados para la amplificación de los transcritos de GR α y GR β , de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 y de la CycA

<i>Transcripto</i>	<i>Cebador Directo (Forward)</i>	<i>Cebador Reverso (Reverse)</i>	<i>Amplicón (pb)</i>
<i>CycA</i> PP1A, Gene ID: 5478	<i>CycA-F</i> 5'-gcatacgggtcctggcatcttg-3'	<i>CycA-R</i> 5'-tgccatccaaccactcagtcttg-3'	101
<i>GRα</i> NR3C1, Gene ID: 2908 <i>Transcript variant 1</i>	<i>GR-F</i> 5'-gaaggaaactccagccagaac-3'	<i>GRα-R</i> 5'-gatgatttcagctaacatctcg-3'	159
<i>GRβ</i> NR3C1, Gene ID: 2908 <i>Transcript variant 6</i>	<i>GR-F</i> 5'-gaaggaaactccagccagaac-3'	<i>GRβ-R</i> 5'-tgagcgccaagattgttg-3'	144
<i>11βHSD1</i> HSD11B1, Gene ID:3290	<i>11βHSD1-F</i> 5'-atgatattcaccatgtgcgca-3'	<i>11βHSD1-R</i> 5'-ataggcagcaaccattggataag-3'	158
<i>11βHSD2</i> HSD11B2, Gene ID:3291	<i>11βHSD2-F</i> 5'-tcgcgcggtgctcatcac-3'	<i>11βHSD2-R</i> 5'-gtacgcagctcgatggcacc-3'	132
<i>PPARγ</i> PPARG, Gene ID:5468	<i>PPARγ-F</i> 5'-tttcagaaatgccttgcatgg-3'	<i>PPARγ-R</i> 5'-ctttcctgtcaagatcgccctc-3'	222
<i>PPARα</i> PPARA, Gene ID: 5465	<i>PPARα-F</i> 5'-cctttttgtggctgctatc-3'	<i>PPARα-R</i> 5'-gtggagtctgagcacatgt-3'	106

CycA: peptidilpropil isomerasa A; GR α : gen del receptor para glucocorticoides alfa; GR β : gen del receptor para glucocorticoide beta; 11 β HSD: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; PPAR: receptor activado por factor de proliferación peroxisomal; pb: pares de bases.

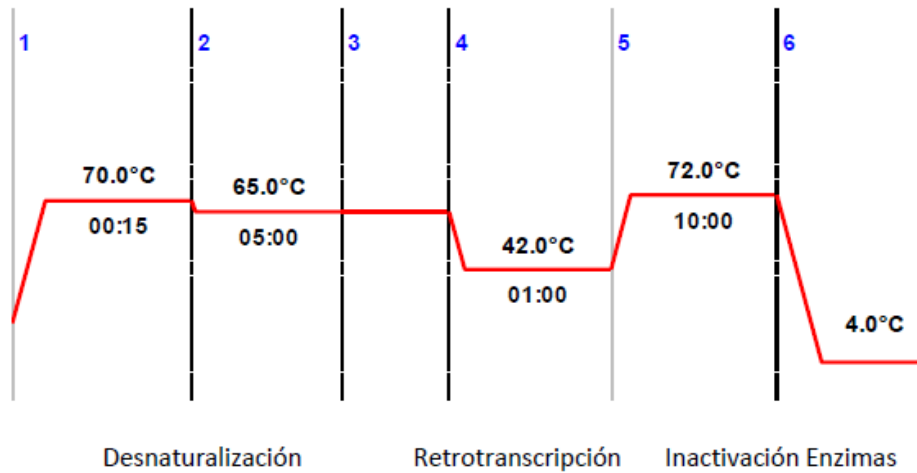


Figura 1: Perfil térmico de la retrotranscripción

Tabla 2: Temperaturas de anillado y de lectura de los perfiles térmicos utilizados en las PCRq de los transcritos en estudio

Transcripto	Temperatura de anillado	Temperatura de lectura
CycA	60°C	84°C
GR α	60°C	81°C
GR β	62°C	82°C
11 β HSD1	59°C	86°C
11 β HSD2	60°C	82°C
PPAR γ	60°C	85°C
PPAR α	60°C	80°C

CycA: ciclofilina A; GR α : receptor para glucocorticoides alfa; GR β : receptor para glucocorticoide beta; 11 β HSD: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, PPAR: receptor activado por factor de proliferación peroxisomal.

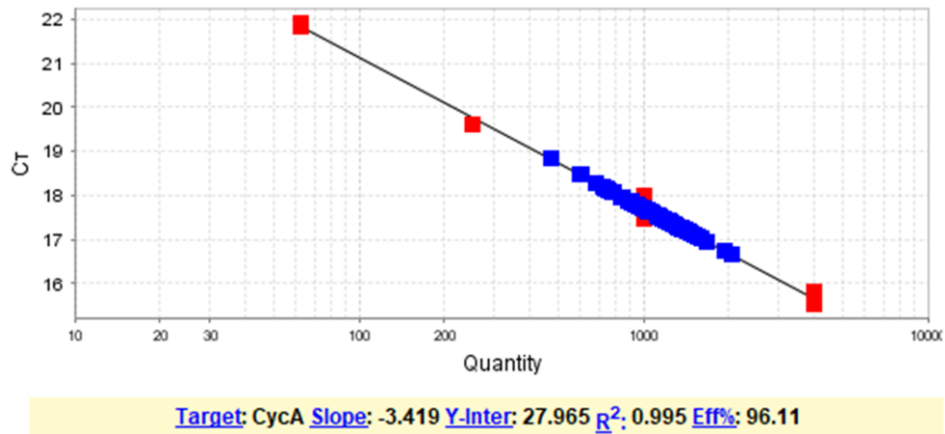


Figura 2: Curva estándar obtenida de la cuantificación del transcrito CycA

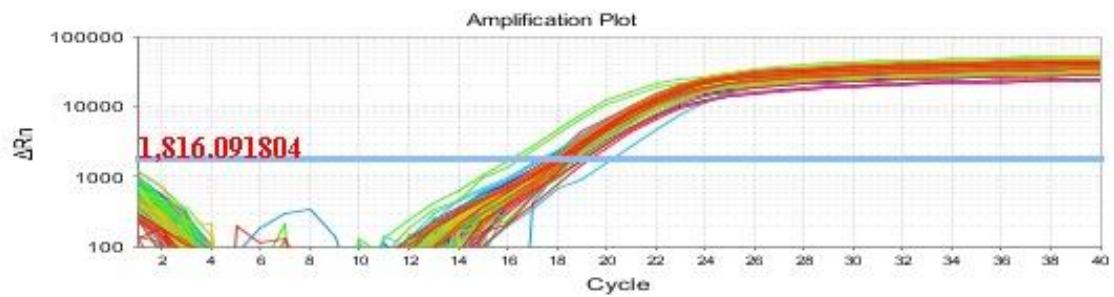


Figura 3: Curvas de amplificación obtenidas de la cuantificación del transcrito CycA

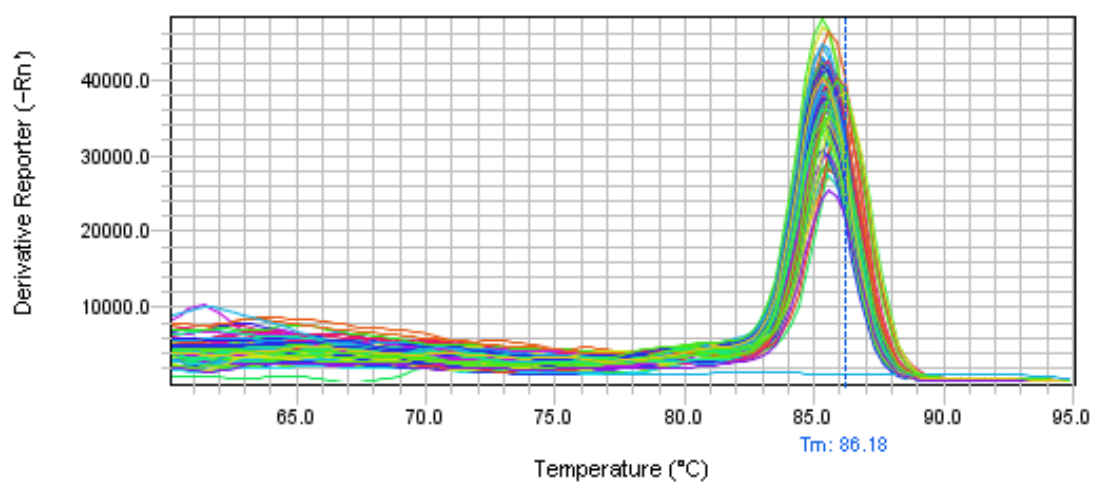


Figura 4: Curvas de disociación obtenidas de la cuantificación del transcrito CycA

RESULTADOS

4 RESULTADOS

SECCIÓN DE RESULTADOS 1

4.1 Análisis de la interrelación inmuno-endócrino-metabólica en el contexto de la comorbilidad Tuberculosis-Diabetes mellitus

4.1.1 Características generales y parámetros clínicos de la población en estudio

El diagrama de conformación de las muestras se esquematiza en la **Figura 5**. De los sujetos entrevistados, se invitó a participar del estudio a 134 voluntarios a los que se les comunicó sobre los alcances del mismo, previo a la firma del consentimiento escrito informado. En base a los criterios de inclusión, fueron efectivamente incorporados 122 individuos. Los grupos en estudio se conformaron de la siguiente manera: 44 HCo, 19 pacientes con DBT, 48 sólo con TB y 11 con la comorbilidad TB+DBT.

En la **Tabla 3** se muestran los parámetros: sexo, edad, vacunación con BCG e IMC de los distintos grupos en estudio. Se vio un menor porcentaje de vacunación con BCG en los grupos DBT y TB+DBT con respecto a HCo, a su vez el de TB+DBT también difirió del de TB y del de DBT. Debido a que en procesos de naturaleza infecciosa y crónica como la TB se observa una reducción del peso corporal, se realizó el cálculo del IMC a fin de evaluar la magnitud de este signo clínico. El grupo TB presentó una disminución significativa de esta variable respecto de HCo y de TB+DBT. Los pacientes con DBT fueron los que mostraron el mayor IMC. Cabe destacar que el 73% de los HCo, 80% de los DBT y 60% de los TB+DBT presentaron valores de IMC considerados de sobrepeso para la población de acuerdo a la OMS, mientras que el 67% de los pacientes TB se encontraron dentro de la categoría de normopeso y un 10% en la de insuficiencia ponderal²⁷⁷. No se vieron diferencias significativas respecto al sexo entre los distintos grupos en estudio. En lo concerniente a la edad, cabe destacar que ambos grupos de pacientes con DBT presentaron rangos etarios significativamente superiores respecto de HCo y a su vez el grupo TB+DBT difirió del de TB.

Ante la marcada diferencia entre las edades de los pacientes con DBT y aquellas de pacientes con TB y HCo, sumando a que los valores hallados en algunas de las variables cuantificadas podrían estar asociados con la edad, se decidió aparear los grupos teniendo en cuenta éste último parámetro en cada uno de los voluntarios. La conformación final de los

mismos se esquematiza en la **Figura 5**: 22 HCo, 18 pacientes con DBT, 21 sólo con TB y 11 sujetos con la comorbilidad TB+DBT.

En la **Tabla 4** se observan las características generales de los grupos de estudio equiparados por sexo y edad. Respecto al IMC, las diferencias en los grupos TB y TB+DBT se mantuvieron, perdiéndose la diferencia significativa del grupo DBT respecto de HCo, debido a que en este último el porcentaje de individuos considerados de sobrepeso incrementó a un 82%.

El análisis de todas las variables se realizó para ambas muestras previamente descriptas. De aquí en adelante, los resultados mostrados pertenecen a aquella que no presentó diferencias en edad y sexo.

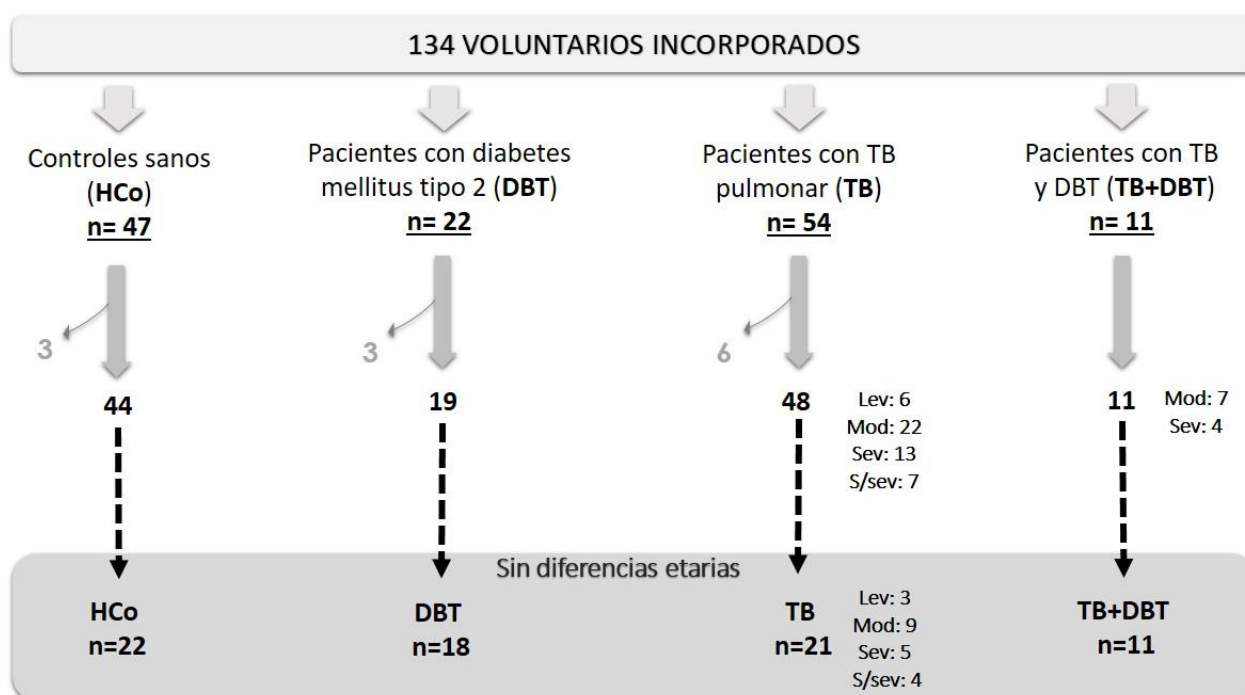


Figura 5: Diagrama de conformación de las muestras en estudio. Del total de individuos entrevistados, se incorporaron efectivamente aquellos que cumplían con los criterios de inclusión mencionados en la sección 3.1. Sin embargo luego de la incorporación debieron excluirse algunos voluntarios por presentar diagnóstico dudoso de TB, serología positiva para VIH y VHB, disfuncionalidad adrenal, entre otras. En la parte inferior del diagrama se observa la conformación final de las muestras apareadas por edad. HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Lev., Mod. y Sev.: grado de compromiso pulmonar leve, moderado y severo, respectivamente. S/sev: se desconoce la severidad.

Tabla 3: Características generales de los distintos grupos en estudio

Parámetros	HCo (n=44)	DBT (n=19)	TB (n=48)	TB+DBT (n=11)	p global
Edad (años)	32 (23-47)	55 (51-61)*	29 (24-35)	50 (41-62)* &	<0,0001
Sexo (F/M)	19/25	10/9	20/28	6/5	n.s.
BCG (%)	97,7	78,9*	87,5	45,5 * # &	0,0001
IMC (kg/m ²)	25,9 (23,5-27,7)	28,0 (25,5-31,5)*	20,0 (18,6-23,3)*	26,9 (23,4-31,9)&	<0,0001

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; F: femenino; M: masculino; BCG: vacunación con Bacilo Calmette-Guerin; IMC: índice de masa corporal. Edad e IMC mostrados como mediana y rango intercuartil. * $p < 0,05$ vs. HCo; & $p < 0,05$ vs. TB; # $p < 0,05$ vs. DBT.

Tabla 4: Características generales de los distintos grupos en estudio equiparados por edad y sexo

Parámetros	HCo (n=22)	DBT (n=18)	TB (n=21)	TB+DBT (n=11)	p global
Edad (años)	45 (35-62)	54 (51-61)	41 (34-59)	50 (41-62)	n.s.
Sexo (F/M)	9/13	10/8	8/13	6/5	n.s.
BCG (%)	95,4	78,9	76,2	45,5 * # &	0,001
IMC (kg/m ²)	27,0 (25,9-29,6)	28,0 (25,1-31,5)	20,9 (19,4-23,9)*	26,9 (23,4-31,9)&	<0,0001

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; F: femenino; M: masculino; BCG: vacunación con Bacilo Calmette-Guerin; IMC: índice de masa corporal. Edad e IMC mostrados como mediana y rango intercuartil. * $p < 0,05$ vs. HCo; & $p < 0,05$ vs. TB; # $p < 0,05$ vs. DBT.

Los valores de las poblaciones leucocitarias obtenidas a partir del hemograma se encuentran representados en la **Tabla 5**. En ambos grupos de pacientes con TB y en aquellos con DBT, se observó un aumento significativo en el recuento de leucocitos respecto de HCo, el cual se debió a expensas del aumento de NE en el caso de los TB y TB+DBT. Además, se constató una disminución del porcentaje de linfocitos en ambos grupos de pacientes con TB respecto de HCo, donde los TB+DBT también difirieron del grupo DBT. Un comportamiento similar se observó para el caso de eosinófilos donde los pacientes con la comorbilidad presentaron el menor porcentaje difiriendo además del grupo sólo con TB. El porcentaje de monocitos se encontró disminuido en el grupo DBT respecto de HCo, mientras que no se hallaron diferencias en basófilos.

Tabla 5: Recuento y porcentaje de poblaciones leucocitarias

Parámetros	HCo (n=22)	DBT (n=18)	TB (n=21)	TB+DBT (n=11)	p global
Leucocitos (10 ³ /μl) [4000-9000]	6,1 (5,1-7,2)	7,9 * (6,6-8,5)	9,0 * (7,6-11,2)	9,5 ** (6,9-12,1)	<0,0001
Linfocitos (%) [25-35]	31,4 (29,3-34,7)	30,5 (26,1-34,0)	15,0 * (10,5-25,5)	19,7 ** (10,8-28,6)	<0,0001
Monocitos (%) [0-12]	8,0 (7,3-8,9)	6,7 * (5,9-8,2)	8,9 (8,2-9,8)	7,8 (6,7-9,9)	0,008
Neutrófilos (%) [45-65]	56,1 (54,8-60,7)	59,1 (54,2-64,7)	73,0 * (65,3-78,6)	69,2 ** (62,8-76,0)	<0,0001
Eosinófilos (%) [0-4]	2,2 (1,7-2,6)	1,9 (1,2-2,9)	1,5 * (0,9-1,9)	0,6 **& (0,3-1,0)	<0,0001
Basófilos (%) [0-1]	0,5 (0,2-0,8)	0,5 (0,2-0,6)	0,5 (0,2-0,8)	0,2 (0,1-0,5)	n.s

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Resultados mostrados como mediana y rango intercuartil.* $p < 0,05$ vs. HCo; & $p < 0,05$ vs. TB; # $p < 0,05$ vs. DBT. Los valores de referencia se muestran entre corchetes.

Los distintos parámetros bioquímicos analizados se muestran en la **Tabla 6**. No se observaron diferencias en el recuento de eritrocitos, aunque ambos grupos de pacientes con TB mostraron una disminución de los niveles de hemoglobina, así como del hematocrito respecto de HCo, mientras que el grupo TB+DBT también difirió en estos parámetros del grupo DBT.

El recuento de plaquetas fue superior en todos los grupos de pacientes respecto del de HCo, encontrándose el mayor valor en los pacientes sólo con TB, el cual difirió además del de TB+DBT. Este último también presentó mayores niveles de plaquetas respecto de los de DBT.

La ERS, parámetro indicativo de un proceso inflamatorio, presentó niveles muy aumentados en los grupos con TB respecto de HCo. Resulta relevante que los pacientes con DBT también mostraron un aumento de este parámetro respecto de HCo aunque significativamente inferior a los valores de TB+DBT.

Por otro lado, en los sujetos con TB y TB+DBT se observó una disminución en los niveles de uremia no encontrándose diferencias en creatinemia y uricemia.

Las proteínas totales mostraron un incremento en sendos grupos de pacientes con TB difiriendo significativamente de los respectivos grupos controles, sin embargo, los niveles de albúmina tuvieron un comportamiento inverso.

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total y HDL se encontraron disminuidas en los grupos con TB respecto a los correspondientes grupos controles. A su vez, los pacientes con la comorbilidad presentaron los menores niveles de colesterol HDL.

Ambos grupos de pacientes con DBT mostraron un incremento en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, a su vez los TB+DBT difirieron de aquellos sólo con TB. Si bien la lipoproteína (a) mostró un aumento sólo en los TB respecto de HCo, la apolipoproteína A1 se vio disminuida en ambos grupos de pacientes con TB respecto de sendos grupos controles.

En base a estos resultados se realizaron los cálculos de las relaciones: Colesterol total/Colesterol HDL, denominada índice Castelli o aterogénico, y ApoB/ApoA1. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en estudio. Sin embargo para el índice Castelli un 27% de los sujetos TB+DBT, un 29% de los DBT, 14% de TB y 18% de HCo presentaron valores $>4,5$ lo que indicaría riesgo coronario.

Cabe destacar que las variables analizadas para los distintos grupos de trabajo oscilaron dentro del rango de valores normales del Laboratorio Central del Hospital Provincial del Centenario, a excepción de aquellos obtenidos para el recuento de plaquetas en el grupo TB, ERS en ambos grupos con TB, colesterol HDL en el grupo de pacientes con TB+DBT y colesterol LDL en HCo. En este último caso la diferencia observada entre ambos grupos de pacientes con TB respecto de HCo se atribuiría al incremento observado en este último grupo (**Tabla 6**).

Otros parámetros de laboratorio clínico analizados, que reflejan una posible afectación hepática, se muestran en la **Tabla 7**. Si bien, se encontraron diferencias en las variables fosfatasa alcalina, pseudocolinesterasa sérica, GPT, bilirrubina total e indirecta en los grupos con TB, estas modificaciones no denotan daño hepático en los distintos sujetos analizados ya que se ubican dentro de los rangos normales.

Por otro lado, en la **Tabla 8** se encuentran representados los parámetros involucrados en el diagnóstico y control de la diabetes. Como era de esperarse los grupos DBT y TB+DBT presentaron niveles elevados de glicemia, siendo estos mayores para el grupo con la comorbilidad. El porcentaje de Hb1AC fue superior en ambos grupos de pacientes con DBT respecto de HCo, observándose también diferencias entre los grupos TB+DBT y TB. Los niveles de insulinemia basal se encontraron aumentados sólo en el grupo TB+DBT, los cuales difirieron significativamente de los del grupo TB y HCo.

Al analizar el índice $HOMA_{IR}$, el cual se relaciona con la resistencia a insulina cuando el mismo es $\geq 3,2^{271}$, ambos grupos de pacientes con DBT presentaron un aumento respecto de HCo, donde los TB+DBT difirieron también de los grupos TB y DBT. Es así como el 67% de los pacientes DBT y un 73% de los TB+DBT mostraron resistencia a insulina.

Es necesario mencionar que, si bien los pacientes con DBT en su mayoría estaban medicados con antiglicemiantes e hipolipidemiantes, como metformina y fenofibratos, los resultados del laboratorio indicaron que tanto el grupo TB+DBT como DBT mostraban un control deficiente de esta patología metabólica.

Tabla 6: Parámetros del laboratorio clínico de los distintos grupos en estudio

Parámetros	HCo (n=22)	DBT (n=18)	TB (n=21)	TB+DBT (n=11)	p global
Eritrocitos (10 ⁶ /μl) [3,7-5,5]	4,7 (4,3-5,0)	4,6 (4,4-4,9)	4,4 (4,0-4,8)	4,6 (4,1-4,9)	n.s
Hemoglobina (g/dl) [11-16]	14,1 (13,3-14,0)	13,6 (13,1-14,8)	12,0 * (10,3-13,2)	12,5 ** (11,5-13,8)	0,0002
Hematocrito (%) [35-50]	40,9 (38,5-43,0)	39,9 (37,2-42,1)	37,2 * (31,6-40,0)	36,5 * (35,0-41,0)	0,006
Plaquetas (10 ³ /μl) [150-400]	231,5 (178,8-250,3)	263,0 * (217,0-315,0)	417,5 * (347,3-504,8)	298,5 **& (281,8-361,8)	<0,0001
Eritrosedimentación (mm/1 ^o hs) [1-15]	5,0 (2,3-9,3)	10,0 * (7,8-20,5)	57,5 * (34,5-89,5)	60,0 ** (36,0-92,0)	<0,0001
Uremia (mg/dl) [10-50]	32,5 (27,8-36,3)	36,5 * (30,3-46,3)	26,0 * (19,0-35,0)*	24,5 ** (19,5-30,5)	<0,002
Creatininemia (mg/dl) [0,5-0,9]	0,8 (0,7-0,9)	0,7 (0,6-0,8)	0,7 (0,6-0,9)	0,7 (0,6-0,8)	n.s
Uricemia (mg/dl) [3,4-7,0]	4,9 (3,9-6,0)	4,7 (3,4-6,1)	7,1 (3,5-8,5)	4,9 (3,9-5,7)	n.s
Proteínas totales (g/dl) [6,6-8,7]	7,3 (7,1-7,6)	7,6 (7,2-7,8)	7,9 * (7,4-8,2)	7,9 ** (7,3-8,5)	0,008
Albúmina (g/dL) [3,4-4,8]	4,5 (4,3-4,8)	4,5 (4,2-4,6)	3,7 * (3,3-4,1)	3,9 ** (3,4-4,1)	<0,0001
Colesterol total (mg/dL) [50-200]	172,0 (157,0-188,5)	180,0 (144,5-205,0)	144,5 * (124,8-163,5)	142,0 ** (122,0-176,0)	0,006
Colesterol HDL (mg/dL) [40-100]	52,0 (39,5-60,5)	44,0 * (34,0-55,5)	43,0 * (39,0-50,5)	33,5 **& (27,0-43,8)	0,009
Colesterol LDL (mg/dL) [4-100]	116,0 (99,0-124,5)	95,5 (79,5-131,5)	91,0 * (71,0-104,0)	79,0 * (62,0-113,0)	0,009
Triglicéridos (mg/dL) [50-150]	95,0 (89,0-118)	122* (92,0-160)	86,0 (72,0-109)	139 * & (99,0-169)	0,003
Lipoproteína a (nmol/L) [7-50]	11,1 (4,3-19,8)	6,6 (3,9-25,2)	37,0 * (8,3-74,9)	26,7 (5,4-41,2)	0,03
Apolipoproteína A-1 (mg/dl) [108-225]	157,4 (144,3-177,9)	148,9 (132,5-161,3)	132,3 * (101,4-138,7)	113,2 ** (100,1-137,5)	<0,0001
Apolipoproteína B (mg/dl) [60-117]	85,1 (77,2-88,8)	79,8 (70,0-99,5)	76,4 (69,4-107,1)	93,3 (75,7-106,6)	n.s

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Resultados mostrados como mediana y rango intercuartil. * $p < 0,05$ vs. HCo; & $p < 0,05$ vs. TB; # $p < 0,05$ vs. DBT. Los valores de referencia se muestran entre corchetes.

Tabla 7: Parámetros de afectación hepática en los distintos grupos en estudio

Parámetros	HCo (n=22)	DBT (n=18)	TB (n=21)	TB+DBT (n=11)	p global
Fosfatasa alcalina (UI/L) [35-104]	67,5 (56,5-81,3)	64,0 (55,8-78,5)	85,5 * (67,3-96,3)	113,0 **& (82,5-131,5)	0,0007
Pseudocolinesterasa sérica (UI/L) [6400-15500]	8012 (7110-9940)	8916 (8000-10513)	5735 * (4874-6669)	7124 ** (4839-8673)	<0,0001
GOT (UI/L) [10-38]	20,0 (17,0-25,5)	18,5 (14,3-20,8)	16,0 (13,5-22,0)	23,0 (11,0-33,0)	n.s
GPT (UI/L) [10-41]	18,0 (14,5-29,5)	19,0 (16,0-25,0)	13,0 * (7,0-18,0)	19,0 & (15,5-26,3)	0,04
LDH (UI/L) [240-480]	334,0 (298,3-356,5)	325,5 (286,3-343,8)	321,0 (303,0-398,5)	330,0 (288,0-3870)	n.s
Bilirrubina total (mg/dL) [0-1,5]	0,36 (0,27-0,58)	0,40 (0,30-0,46)	0,21 * (0,18-0,27)	0,31 & (0,25-0,72)	0,0003
Bilirrubina directa (mg/dL) [0-0,3]	0,14 (0,11-0,24)	0,16 (0,14-0,19)	0,11 (0,09-0,18)	0,16 (0,13-0,41)	n.s
Bilirrubina indirecta (mg/dL) [0-0,8]	0,23 (0,16-0,43)	0,21 (0,16-0,28)	0,12 * (0,09-0,16)	0,19 & (0,14-0,29)	0,001

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; GOT: glutamato-oxalacetato transaminasa; GPT: glutamato-piruvato transaminasa; LDH: lactato deshidrogenasa. Resultados mostrados como mediana y rango intercuartil. * $p < 0,05$ vs. HCo; & $p < 0,05$ vs. TB; # $p < 0,05$ vs. DBT. Los valores de referencia se muestran entre corchetes.

Tabla 8: Niveles de glicemia, Hb1A_{1c}, insulinemia basal y HOMA_{IR} de los distintos grupos en estudio

Parámetros	HCo (n=22)	DBT (n=18)	TB (n=21)	TB+DBT (n=11)	p global
Glicemia (mg/dl) [70-100]	89,5 (84,3-106)	111 * (94,5-129)	87,0 (81,0-104)	213,0 **& (161-285)	<0,0001
HbA _{1c} (%) [4,8-6]	5,5 (5,0-5,8)	7,5 * (6,0-10)	5,8 (5,4-6,3)	9,7 **& (7,0-11)	<0,0001
Insulinemia basal (μUI/ml) [2,6-25]	6,7 (5,4-9,8)	7,4 (5,7-13)	7,0 (3,9-8,6)	14 **& (6,4-29)	0,0003
HOMA _{IR} [≤3,2]	1,43 (1,08-2,12)	3,22 * (1,32-4,45)	1,51 (0,832-2,20)	6,51 **& (2,31-15,8)	0,0003

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; Índice HOMA_{IR} = [insulinemia basal (μUI/ml)*glicemia (mmol/L)]/22,5²⁷¹. Resultados mostrados como mediana y rango intercuartil. * $p < 0,05$ vs. HCo; & $p < 0,05$ vs. TB; # $p < 0,05$ vs. DBT. Los valores de referencia se muestran entre corchetes.

4.1.2 Análisis de la capacidad proliferativa específica de las CMP de los distintos grupos en estudio

Los resultados obtenidos de los cultivos *in vitro* de las CMP estimuladas con *Mtbi* se muestran en la **Figura 6** como IE.

Al igual que en resultados previos obtenidos por el grupo de investigación, los pacientes sólo con TB presentaron una menor capacidad proliferativa respecto de los HCo. Al contrario, los pacientes con TB+DBT tuvieron un incremento en el IE difiriendo significativamente de los pacientes con TB y de HCo.

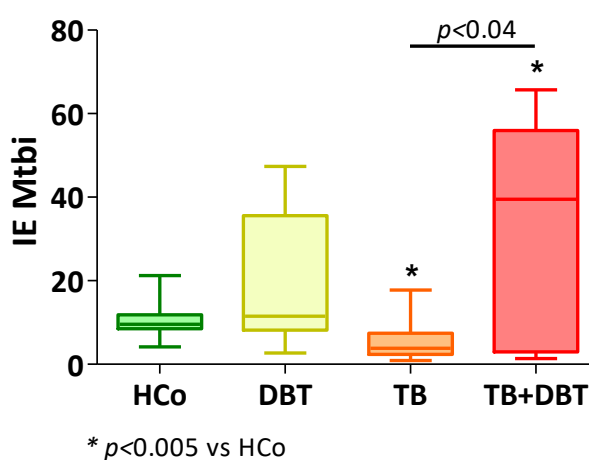


Figura 6: Capacidad proliferativa frente a *Mtbi* de células mononucleares provenientes de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE): cociente entre cuentas por minuto (cpm) de cultivos estimulados y cpm de cultivos sin estimular. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

4.1.3 Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo de las poblaciones leucocitarias reflejó un descenso en el porcentaje de linfocitos (**Figura 7** panel **A**) y aumento en el de polimorfonucleares (**Figura 7** panel **C**) en ambos grupos de pacientes con TB respecto de HCo, difiriendo los TB+DBT también del grupo DBT, coincidiendo con los resultados obtenidos a partir de los hemogramas. Es de mencionarse que el porcentaje de polimorfonucleares también se vio incrementado en pacientes DBT. Además, pudo observarse un aumento significativo en el porcentaje de monocitos en el grupo de pacientes sólo con TB respecto de HCo (**Figura 7** panel **B**).

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias mostró una disminución en el porcentaje de CD3+ para el grupo TB+DBT respecto de HCo (**Figura 8 panel A**), mientras que para los pacientes únicamente con TB se observó una disminución del porcentaje de CD19+ y CD4+, con un aumento de CD8+ (**Figura 8 paneles B, C y D** respectivamente) respecto de HCo. La subpoblación de células CD4+CD25+Foxp3+ o Treg (**Figura 8 panel D**) no mostró diferencias entre los distintos grupos en estudio.

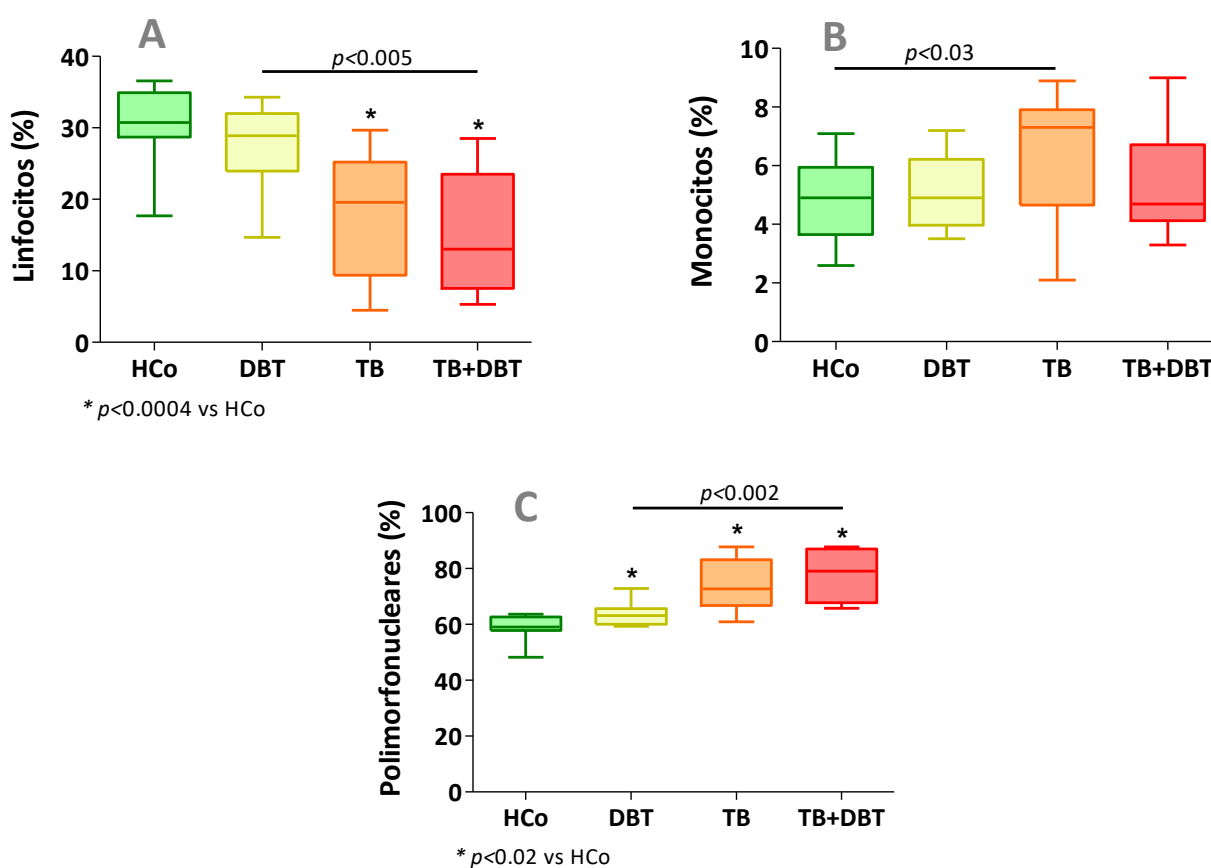


Figura 7: Porcentaje de linfocitos (A), monocitos (B) y células polimorfonucleares (C) de sujetos sanos (HCo) y de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

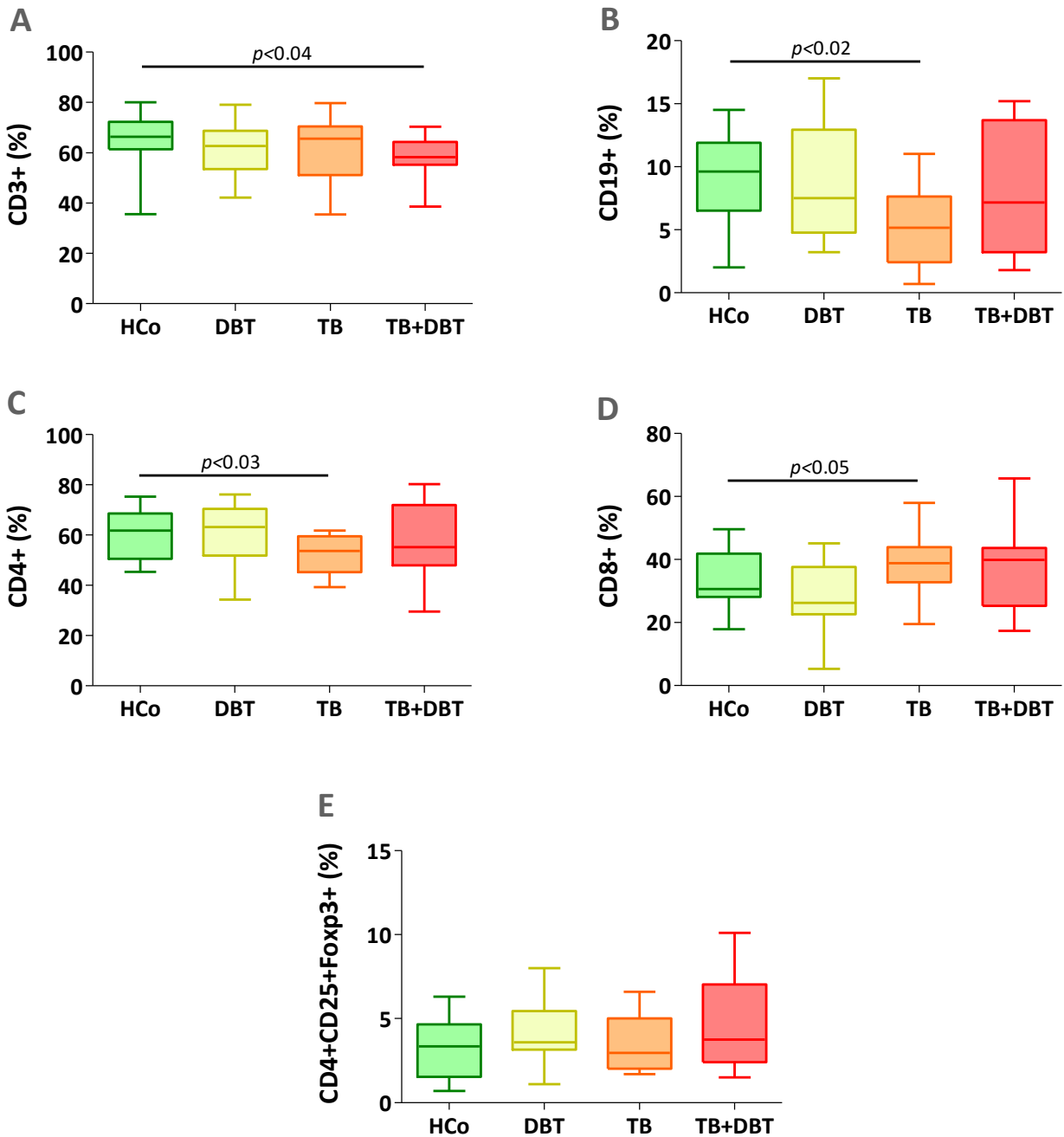


Figura 8: Porcentaje de linfocitos CD3+ (A), CD19+ (B), CD4+ (C); CD8+ (D) y CD4+CD25+Foxp3+ (E) de sujetos sanos (HCo) y de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

4.1.4 *Cuantificación en plasma de mediadores y hormonas*

Niveles plasmáticos de citocinas pro y antiinflamatorias

Los niveles plasmáticos de las citocinas IL-6, IFN- γ e IL-10, además de CRP de los distintos grupos en estudio se encuentran representados en la **Figura 9**. Como era de esperarse, ambos grupos de pacientes con TB mostraron valores elevados de IL-6 (**Figura 9** panel **A**), CRP (**Figura 9** panel **C**) e IFN- γ (**Figura 9** panel **B**) difiriendo significativamente de los respectivos grupos controles. A su vez, este último mediador se vio más incrementado en el grupo con la comorbilidad respecto de los pacientes sólo con TB. Cabe destacar, que también los pacientes con DBT presentaron niveles elevados de CRP respecto de los de HCo.

Del análisis de asociaciones entre concentraciones de citocinas (**Tabla 9**) se observó que: los niveles de IL-6 se correlacionaron positivamente con los de CRP en ambos grupos de pacientes con TB (TB: $p < 0,0001$; TB+DBT: $p < 0,01$), así como con los de IFN- γ en los grupos DBT ($p < 0,01$), TB ($p < 0,04$) y TB+DBT ($p < 0,03$). Así mismo, los niveles de estos mediadores se asociaron directamente con los de ERS: con CRP en DBT ($p < 0,05$), en TB ($p < 0,003$) y en TB+DBT ($p < 0,02$); con IL-6 en TB ($p < 0,0004$) y en TB+DBT ($p < 0,0001$); con IFN- γ en TB+DBT ($p < 0,04$).

Respecto a la citocina antiinflamatoria IL-10, ésta se encontró incrementada en ambos grupos de pacientes con DBT al compararse con HCo (**Figura 9** panel **D**), y se asoció positivamente con los niveles de IL-6 ($p < 0,04$) e IFN- γ ($p < 0,05$) en el grupo con la comorbilidad (**Tabla 9**). También se cuantificaron los niveles plasmáticos de las citocinas IL-4 e IL-1 β , cuyos resultados no se muestran ya que la mayor parte de las muestras presentaron valores por debajo de los límites de detección de los ensayos comerciales.

Al analizar la relación entre la proporción de células circulantes de la RI adaptativa y su capacidad funcional con respecto a los niveles de mediadores pro y antiinflamatorios se observó una asociación negativa entre la capacidad proliferativa y los niveles de IL-6 ($p < 0,002$ - **Tabla 9**) y CRP ($p < 0,0005$ - **Tabla 9**) en el grupo de pacientes con TB+DBT y con los de IL-10 en el grupo sólo con TB ($p < 0,03$ - **Tabla 9**). Además, los niveles de IFN- γ se correlacionaron positivamente con los porcentajes de LT CD4+ ($p < 0,03$) y negativamente con los de las células Treg ($p < 0,05$) en los pacientes que presentaban la comorbilidad (**Tabla 9**).

Dado que en estudios previos se demostraron variaciones en los niveles de mediadores relacionados con la severidad de la TB pulmonar, éstos se analizaron teniendo en cuenta el grado de compromiso pulmonar en ambos grupos de pacientes con TB. Es así que los niveles de IL-6, IFN- γ y CRP se encontraron incrementados en ambos grupos de pacientes con TB respecto a los del grupo HCo, para todos los grados de compromiso pulmonar (datos no mostrados). Por su parte la IL-10 se encontró incrementada en ambos grupos de pacientes con compromiso pulmonar severo, donde el grupo TB+DBT difirió significativamente de los HCo (**Figura 10**).

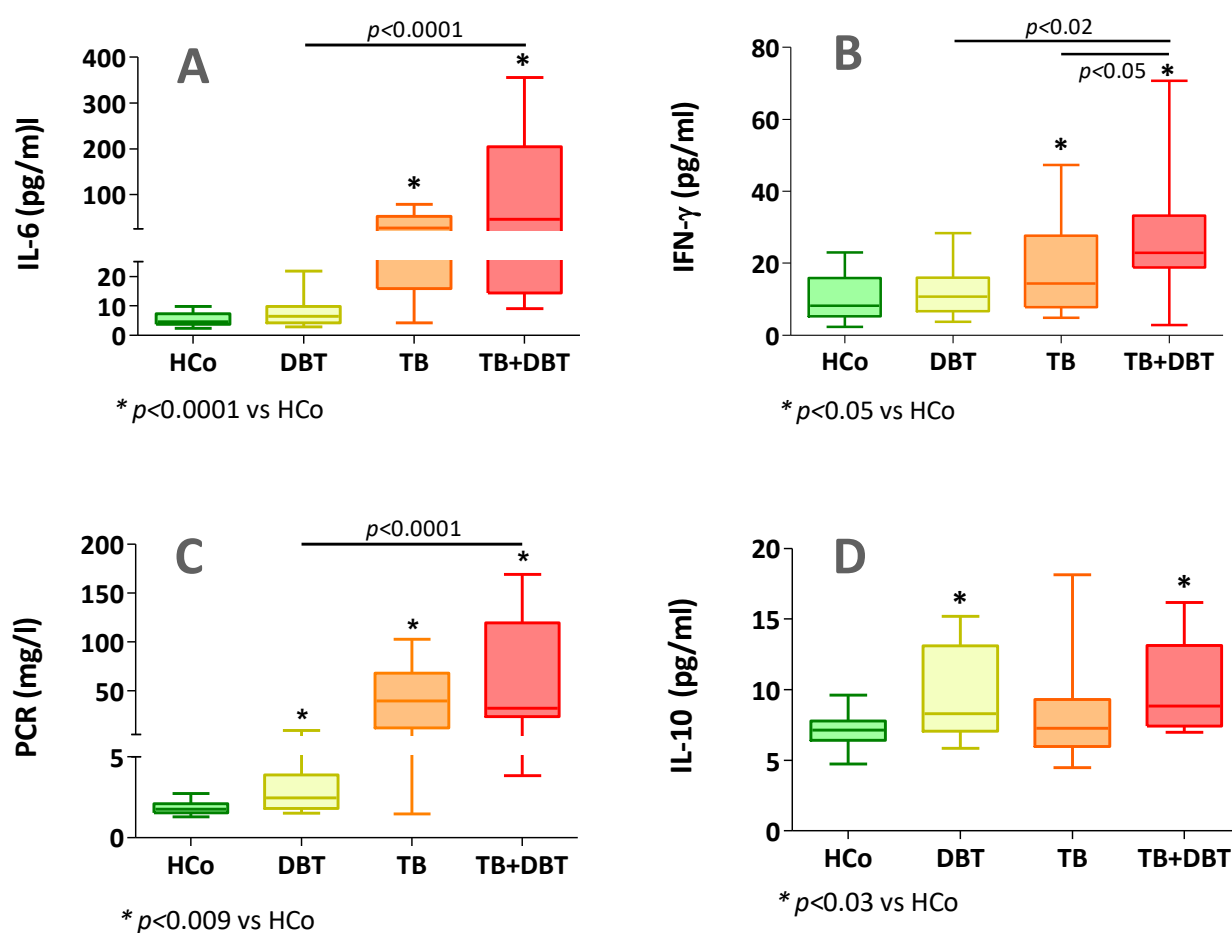


Figura 9: Niveles plasmáticos de IL-6 (A), IFN- γ (B), proteína C reactiva (CRP-C) e IL-10 (D) de sujetos sanos (HCo) y de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

Tabla 9: Asociaciones significativas entre variables inmunológicas para los distintos grupos de pacientes en estudio

Asociaciones	DBT			TB			TB+DBT		
	r	p	n	r	p	n	r	p	n
IL-6 vs CRP				0,84	0,0001	18	0,75	0,01	10
IL-6 vs IFN- γ	0,62	0,01	14	0,5	0,04	18	0,61	0,03	10
CRP vs ERS	0,54	0,05	15	0,68	0,003	17	0,70	0,02	10
IL-6 vs ERS				0,76	0,0004	17	0,94	0,0001	10
IFN- γ vs ERS							0,56	0,04	10
IL-10 vs IL-6							0,63	0,04	10
IL-10 vs IFN- γ							0,60	0,05	10
IL-6 vs IE <i>Mtbi</i>							-0,88	0,002	10
CRP vs IE <i>Mtbi</i>							-0,92	0,0005	10
IL-10 vs IE <i>Mtbi</i>				-0,54	0,03	16			
IFN- γ vs LT CD4+ (%)							0,75	0,03	10
IFN- γ vs Treg (%)							-0,71	0,05	9

DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; CRP: Proteína C reactiva; ERS: eritrosedimentación; IE: Índice de estimulación; LT: linfocito T; Treg: células T reguladoras. r=Coefficiente de Spearman.

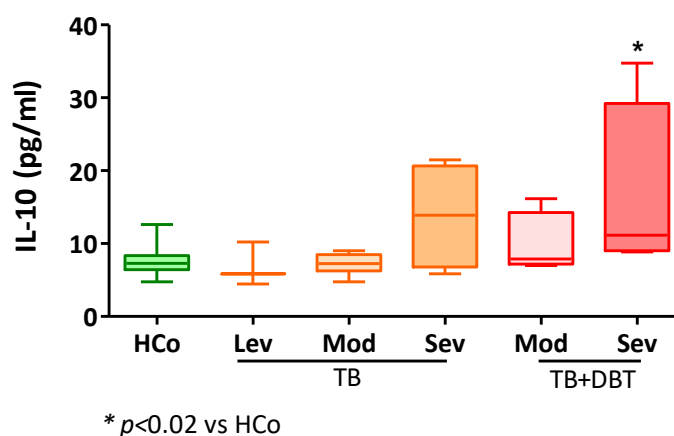


Figura 10: Niveles plasmáticos de IL-10 de ambos grupos con TB pulmonar separados por el grado de compromiso pulmonar. HCo: sujetos sanos; Lev: leves; Mod: moderados; Sev: severos; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y diabetes mellitus tipo 2. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

Niveles plasmáticos de adipocitocinas

Como fuera descrito en la sección 1.10.3, dado el componente inmunometabólico de las patologías en estudio, se analizaron además los niveles de adiponectina y leptina, dos adipocitocinas que median efectos antagónicos tanto inmunológicos como metabólicos.

El análisis de los niveles plasmáticos de estos mediadores se muestra en la **Figura 11**. Las concentraciones de adiponectina fueron similares en los distintos grupos de estudio (panel **A**), mientras que las de la leptina se encontraron disminuidas en ambos grupos de pacientes con TB respecto de las de HCo, donde los pacientes sólo con TB presentaron los menores niveles (panel **B**).

Al estudiar la asociación entre las adipocitocinas y variables inmunológicas (**Tabla 10**) se observó que en ambos grupos de pacientes con TB los niveles de leptina se encontraban asociados positivamente con el porcentaje de linfocitos (TB: $p < 0,001$; TB+DBT: $p < 0,05$), y en el grupo sólo con TB con la capacidad proliferativa ($p < 0,005$). A su vez, la leptina se correlacionó positivamente con el IMC ($p < 0,04$) aunque sólo en el grupo DBT. Por su parte, el IMC de los pacientes con TB se asoció negativamente con los niveles de IL-6 ($p < 0,01$), CRP ($p < 0,02$) e IL-10 ($p < 0,03$).

Dado que estas adipocitocinas presentan dimorfismo sexual^{278,279} y las mujeres son las que presentan mayores niveles de estos mediadores, se analizaron los niveles plasmáticos realizando la subdivisión de cada grupo considerando el sexo. Respecto a la adiponectina no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre mujeres de los distintos grupos en estudio (**Figura 12** panel **A**), sin embargo los hombres sólo con TB presentaron mayores niveles de adiponectina respecto de HCo (**Figura 12** panel **B**). Para el caso de la leptina, las comparaciones entre mujeres de los distintos grupos tampoco mostraron diferencias (**Figura 13** panel **A**), mientras que los resultados obtenidos en los hombres fueron similares a los observados en la muestra completa (**Figura 11** panel **B**).

Debido que al separar los distintos grupos en estudio en base al sexo se reduce considerablemente el número de voluntarios en cada uno, el análisis de los mismos teniendo en cuenta la severidad de la TB pulmonar no se realizó.

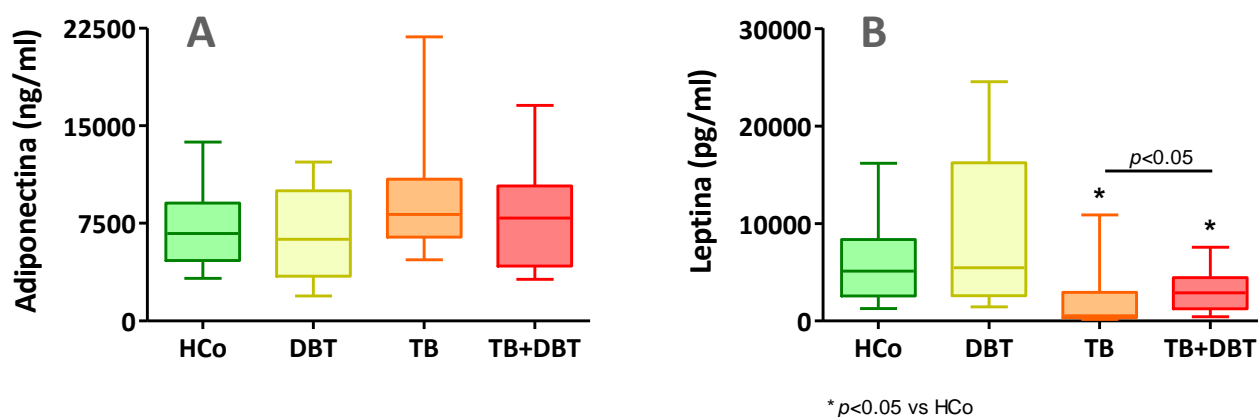


Figura 11: Niveles plasmáticos de adiponectina (A) y leptina (B) de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

Tabla 10: Asociaciones significativas entre adipocitocinas, IMC y demás variables inmunológicas para los distintos grupos de pacientes en estudio

Asociaciones	DBT			TB			TB+DBT		
	r	p	n	r	p	n	r	p	n
Leptina vs LI (%)				0,83	0,0001	18	0,6	0,05	10
Leptina vs IE <i>Mtbi</i>				0,64	0,005	18			
Leptina vs IMC	0,54	0,04	15						
IMC vs IL-6				-0,57	0,01	18			
IMC vs CRP				-0,54	0,02	18			
IMC vs IL-10				-0,56	0,03	16			

DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; LI: linfocitos; IE: Índice de estimulación; IMC: Índice de masa corporal; CRP: Proteína C reactiva. r=Coeficiente de Spearman.

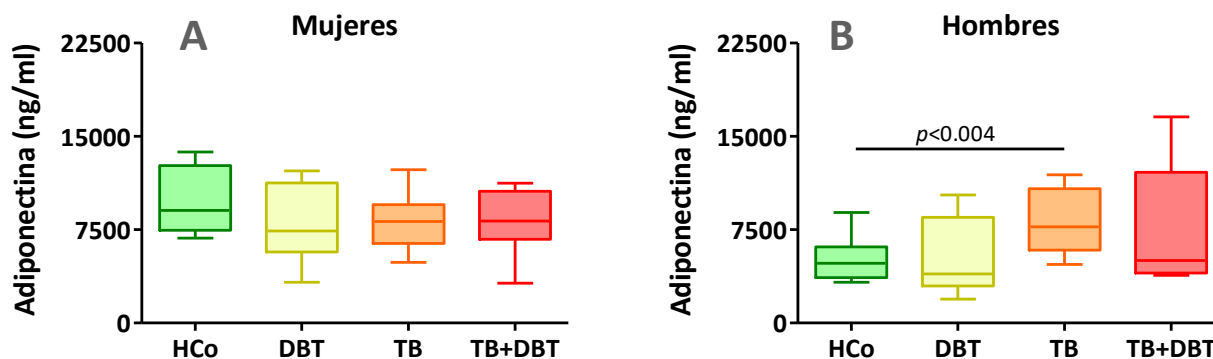


Figura 12: Niveles plasmáticos de adiponectina en mujeres (A) y hombres (B) de los distintos grupos en estudio. HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. **Mujeres (A) vs Hombres (B):** HCo $p < 0.0007$; DBT $p < 0.03$.

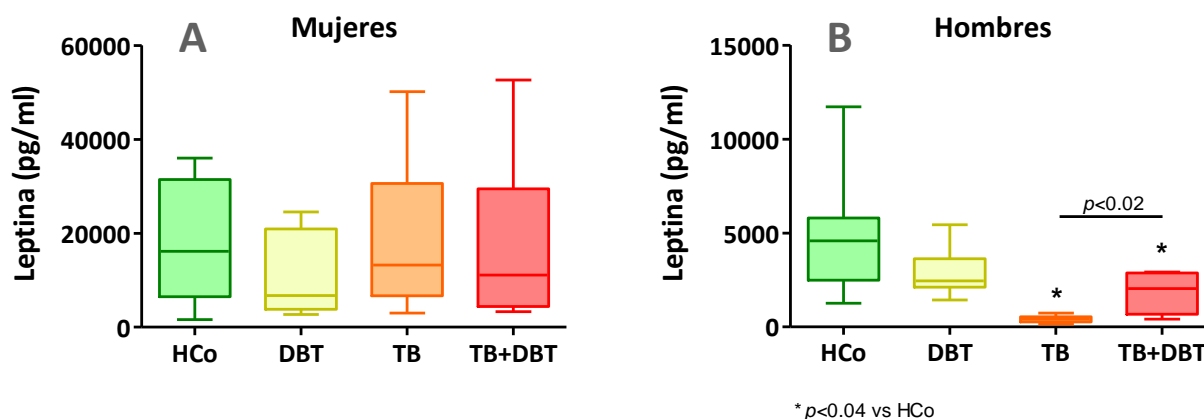


Figura 13: Niveles plasmáticos de leptina en mujeres (A) y hombres (B) de los distintos grupos en estudio. HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. **Mujeres (A) vs Hombres (B):** HCo $p < 0.008$; DBT $p < 0.03$; TB $p < 0.0001$; TB+DBT $p < 0.004$.

Niveles plasmáticos de prolactina y hGH

Prolactina y hGH son dos hormonas secretadas por la adenohipófisis, que no sólo desempeñan una importante función en el metabolismo sino también en el desarrollo de la RI celular. Atento a ello, se cuantificaron los niveles plasmáticos de estos mediadores (**Figura 14**). Como puede observarse en el panel **A**, las concentraciones de prolactina no se encontraron modificadas entre los distintos grupos en estudio. Sin embargo, los niveles de hGH se hallaron incrementados en ambos grupos de pacientes con TB respecto de sendos grupos controles,

presentando los TB+DBT los mayores valores (**Figura 14** panel **B**). Los niveles de esta hormona se asociaron negativamente con la insulinemia ($r=-0,69$, $p<0,03$, $n=10$) y por consiguiente con el índice $HOMA_{IR}$ ($r=-0,68$, $p<0,03$, $n=10$), así como positivamente con los niveles de cortisol ($r=0,91$, $p<0,0006$, $n=10$), en los pacientes con ambas patologías.

Al igual que con las adipocitocinas, es conocido que la hGH presenta dimorfismo sexual⁴ mientras que diversos estudios en modelos animales han mostrado diferencias atribuidas al sexo en la prolactina^{5,6}. Por ello se realizó un nuevo análisis teniendo en cuenta esta variable. Si bien las mujeres presentaron los mayores valores de hGH (**Figura 15** panel **A**) para los grupos HCo y DBT, fueron los hombres TB+DBT quienes mostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de esta hormona respecto de aquellos hombres pertenecientes al grupo HCo (**Figura 15** panel **B**). En lo que respecta a la prolactina, en nuestro estudio no se observaron diferencias atribuibles al sexo.

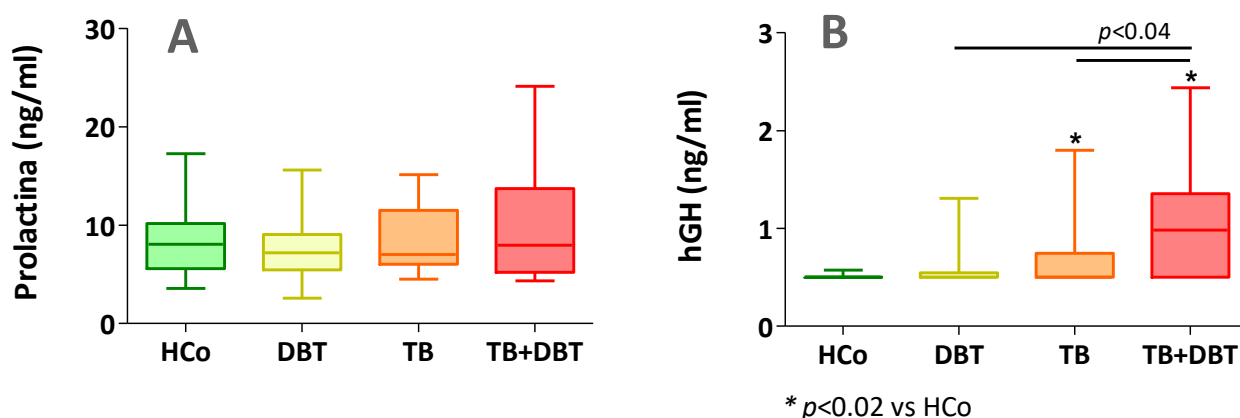


Figura 14: Niveles plasmáticos de prolactina (A) y hormona de crecimiento (hGH; B) de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

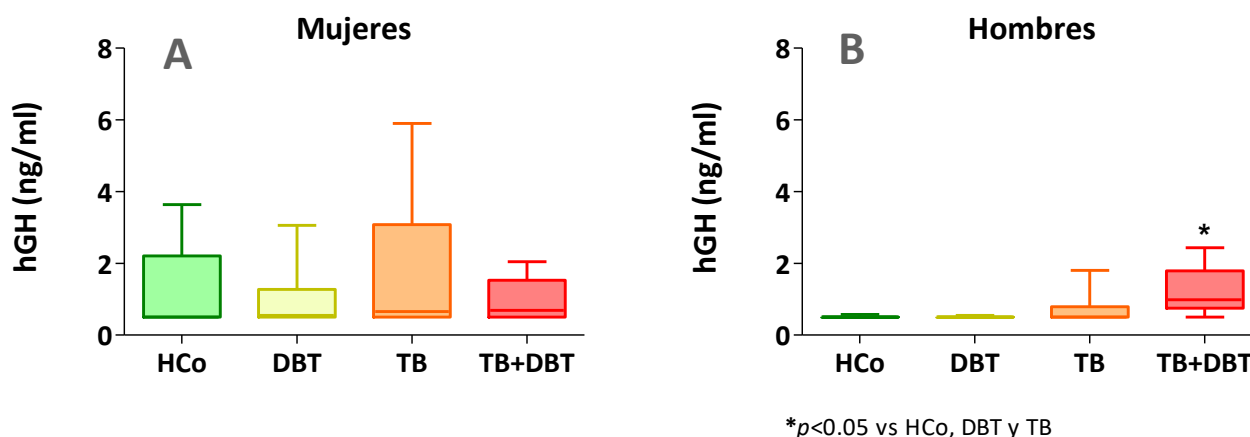


Figura 15: Niveles plasmáticos de hGH en mujeres (A) y hombres (B) de los distintos grupos en estudio. HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. Mujeres (A) vs Hombres (B): HCo $p < 0.05$; DBT $p < 0.03$.

Niveles plasmáticos de cortisol, DHEA y DHEA-S

Se analizaron los niveles plasmáticos de los esteroides adrenales involucrados en el eje HPA (**Figura 16**): cortisol (panel A), DHEA (panel B) y DHEA-S (panel C). Al igual que en trabajos previos, los pacientes únicamente con TB presentaron una mayor concentración de cortisol respecto de la obtenida en HCo. Así mismo, los pacientes con TB+DBT también evidenciaron aumento de esta hormona, con diferencias respecto de HCo y DBT. A su vez, en los TB+DBT se observó correlación entre los niveles de cortisol y el IMC ($r = -0,78$, $p < 0,01$); la insulinemia ($r = 0,72$, $p < 0,03$); los niveles de leptina ($r = -0,63$, $p < 0,04$); de hGH ($r = 0,91$, $p < 0,0006$) y como era de esperarse con el porcentaje de NE ($r = 0,64$, $p < 0,04$). Con respecto a los pacientes DBT, los niveles de cortisol se correlacionaron positivamente con los niveles de glicemia ($r = 0,79$, $p < 0,002$) y el porcentaje HbA1c ($r = 0,84$, $p < 0,0006$), denotando la participación de esta hormona en el metabolismo de la Glc.

Las concentraciones plasmáticas de DHEA, como era de esperarse, fueron significativamente menores en el grupo de pacientes con TB respecto de HCo, sin embargo, fue llamativo observar que este descenso no se evidenció en pacientes con TB+DBT, quienes incluso mostraron valores superiores a los del grupo sólo con TB.

Sin embargo, los niveles de DHEA-S sí se vieron disminuidos en ambos grupos de pacientes con TB y aún en aquellos voluntarios que sólo presentaban DBT. Es de mencionarse que los

pacientes con la comorbilidad mostraron menores niveles de esta hormona respecto de los del grupo DBT.

Al analizar la relación Cort/DHEA (**Figura 16** panel **D**) se evidenció un incremento significativo de los valores en los tres grupos de pacientes comparado con los de HCo, aunque aquellos del grupo TB+DBT fueron menores a los del grupo TB. En lo referente a la relación Cort/DHEA-S (panel **E**), ésta se vio aumentada en todos los grupos de pacientes en relación con los valores de HCo, difiriendo a su vez TB+DBT de DBT.

Ante el conocido dimorfismo sexual que presentan las hormonas esteroideas²⁸⁰, se realizó un análisis teniendo en cuenta el sexo. En este estudio, no se observaron diferencias significativas en los niveles tanto de cortisol como de DHEA entre hombres y mujeres para los distintos grupos de trabajo (datos no mostrados). Sin embargo, con respecto a DHEA-S (**Figura 17** paneles **A** y **B**) las mujeres exhibieron los menores valores en todos los grupos experimentales excepto en el grupo con DBT. Si bien tanto en hombres como en mujeres se vio un descenso en los niveles de DHEA-S entre los grupos de pacientes con TB, sólo los hombres con DBT presentaron valores inferiores a los de HCo, sin diferencias con los pacientes TB+DBT.

Al analizar los niveles de cortisol, DHEA y la relación Cort/DHEA de acuerdo con la severidad de la TB, no se observaron diferencias atribuibles al grado de compromiso pulmonar (datos no mostrados).

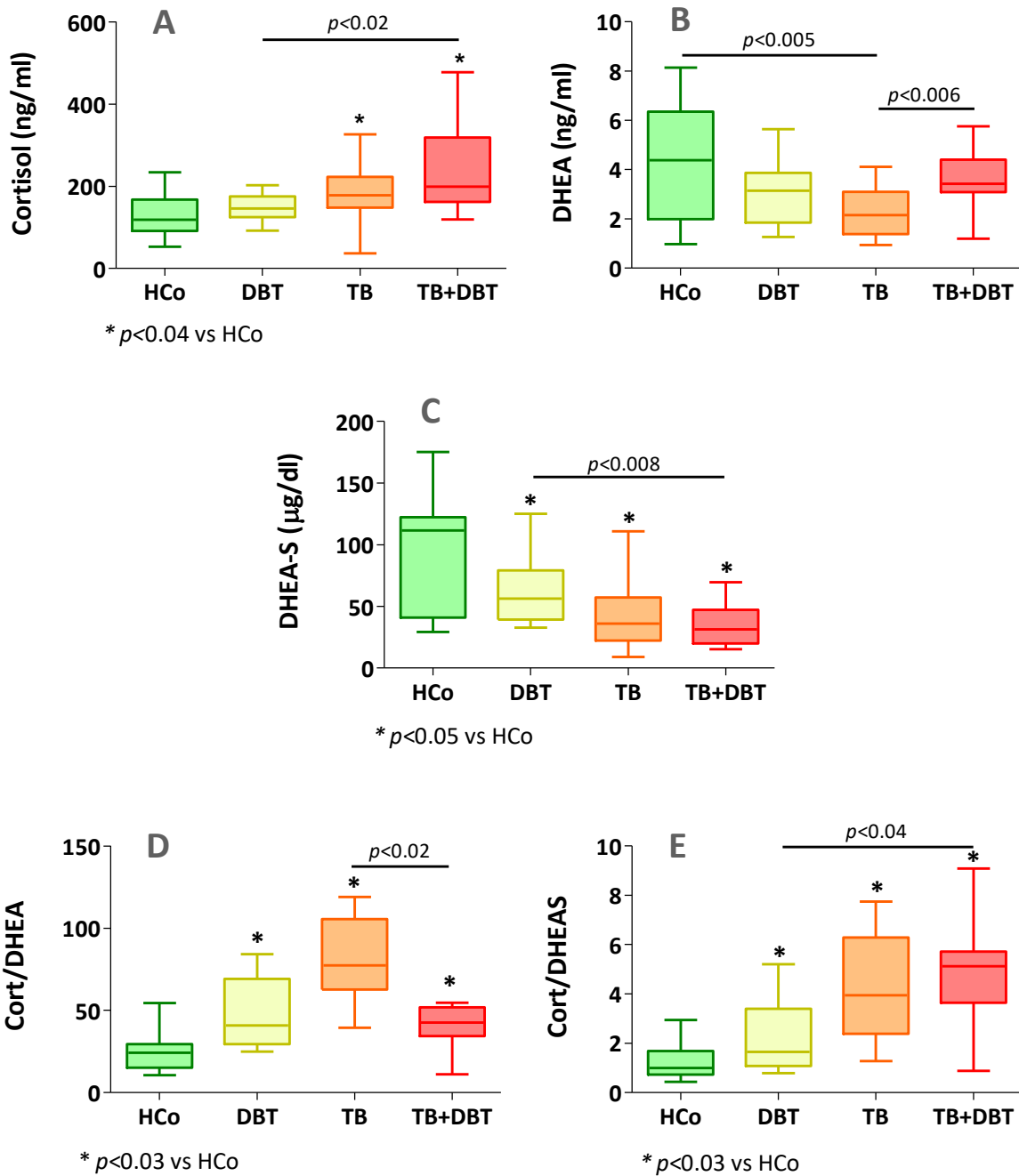


Figura 16: Niveles plasmáticos de cortisol (A), dehidroepiandrosterona (DHEA-B), dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S-C), relación Cort/DHEA (D) y Cort/DHEAS (E) de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

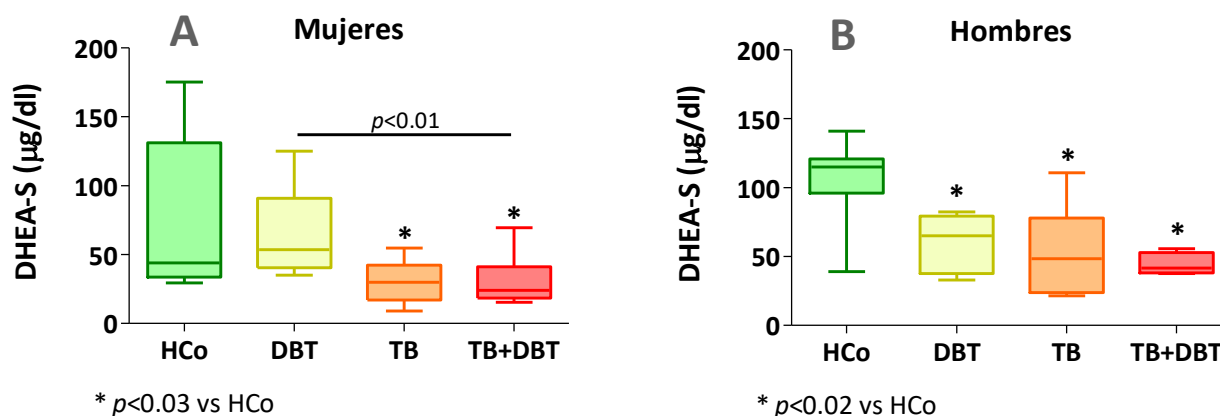


Figura 17: Niveles plasmáticos de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) en mujeres (A) y hombres (B) de los distintos grupos en estudio. HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. **Mujeres (A) vs Hombres (B): HCo $p < 0.05$; TB $p < 0.04$; TB+DBT $p < 0.03$**

4.1.5 Niveles relativos de expresión de los ARNm de $GR\alpha$, $GR\beta$, $PPAR\gamma$, $PPAR\alpha$ y de las enzimas $11\beta HSD1$ y $11\beta HSD2$ en CMP de los distintos grupos en estudio

Como fuera referido en la introducción (sección 1.10.1), la función biológica del cortisol depende de su interacción con el receptor para GCs formado por el dímero $GR\alpha$, mientras que el heterodímero $GR\alpha$ - $GR\beta$ actuaría como dominante negativo. En trabajos previos del grupo se evidenció que los pacientes con TB severa presentaban cierto grado de resistencia a la acción de los GC. Lo que nos indujo a analizar el nivel de expresión de ambas isoformas del receptor y de las enzimas responsables de la interconversión cortisol-cortisona ($11\beta HSD1$ y $11\beta HSD2$) en CMP de pacientes con la comorbilidad TB+DBT y de los demás grupos en estudio.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los transcritos para $GR\alpha$ y $GR\beta$ (Figura 18 paneles A y B), sin embargo al analizar la relación $GR\alpha/GR\beta$ (Figura 18 panel C), ésta se encontró disminuida en los pacientes con TB al compararla con HCo. Respecto al ARNm de la enzima $11\beta HSD1$ (Figura 18 panel D), sus niveles de expresión presentaron un incremento en ambos grupos de pacientes con DBT, respecto de los de HCo, al igual que los pacientes TB+DBT comparado con los TB. En cuanto a la cuantificación del transcrito de la enzima $11\beta HSD2$, este no se expresó en la mayoría de las muestras (aún con las condiciones de reacción optimizadas).

En la **Figura 19** se muestran los niveles de expresión de las isoformas PPAR α y PPAR γ . Ambos grupos de pacientes con TB presentaron niveles incrementados de PPAR γ respecto de HCo (**Figura 19** panel **B**), sin encontrarse modificaciones en la isoforma α (**Figura 19** panel **A**). A su vez, el grupo TB+DBT presentó mayores niveles de PPAR γ al compararse con DBT.

Respecto de las correlaciones (**Tabla 11**), en los pacientes con la comorbilidad los niveles de expresión de PPAR γ se asociaron negativamente con el porcentaje de linfocitos ($p<0,03$) así como con la capacidad proliferativa ($p<0,01$), mientras que positivamente con los niveles de IL-10 ($p<0,004$) y cortisol ($p<0,05$), y en ambos grupos de pacientes con TB, con los de CRP (TB: $p<0,002$; TB+DBT: $p<0,01$) e IL-6 (TB: $p<0,002$; TB+DBT: $p<0,01$). Es importante destacar que en todos los grupos de pacientes este transcrito presentó una asociación directa con el porcentaje de monocitos (DBT: $p<0,02$; TB: $p<0,04$; TB+DBT: $p<0,02$).

Al analizar los niveles de expresión de los mencionados transcritos considerando la severidad de la TB, no se observaron diferencias atribuibles al grado de compromiso pulmonar (datos no mostrados).

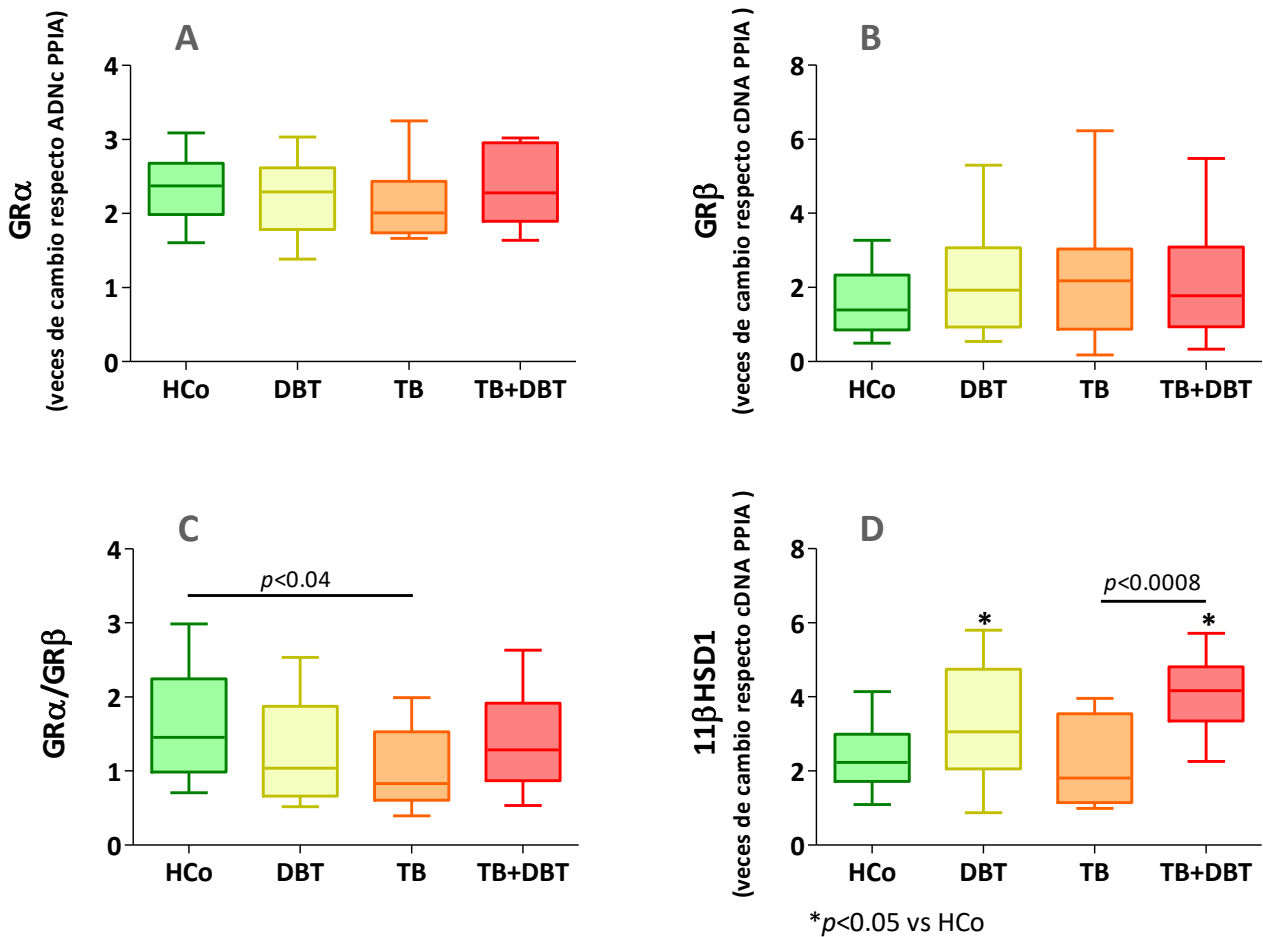


Figura 18: Expresión relativa de los transcritos GRα (A), GRβ (B), 11βHSD (D) y relación GRα/GRβ (C) en células mononucleares periféricas de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los resultados se expresan como veces de cambio respecto al ADNc del gen endógeno PPIA. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio

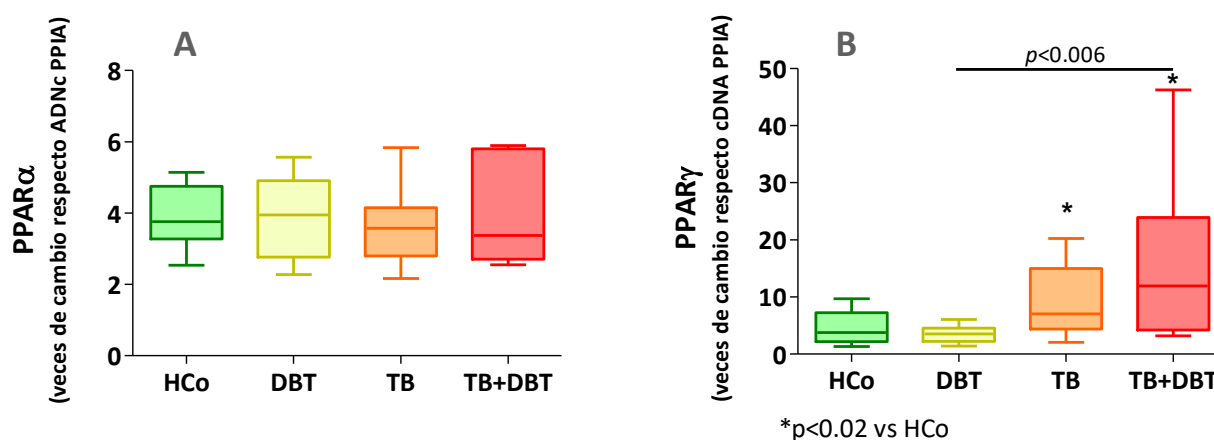


Figura 19: Expresión relativa de los transcritos PPAR α (A) y PPAR γ (B) en células mononucleares periféricas de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los resultados se expresan como veces de cambio respecto al ADNc del gen endógeno PPIA. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio.

Tabla 11: Asociaciones significativas entre los niveles de PPAR γ y variables inmunológicas y endócrinas para los distintos grupos de pacientes en estudio

Asociaciones	DBT			TB			TB+DBT		
	r	p	n	r	p	n	r	p	n
PPAR γ vs LI (%)							-0,72	0,03	9
PPAR γ vs IE <i>Mtbi</i>							-0,83	0,01	10
PPAR γ vs IL-10							0,82	0,004	9
PPAR γ vs Cortisol							0,60	0,05	9
PPAR γ vs CRP				0,75	0,002	16	0,76	0,01	10
PPAR γ vs IL-6				0,76	0,002	16	0,78	0,01	10
PPAR γ vs MO (%)	0,64	0,02	14	0,51	0,04	16	0,77	0,02	10

DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; LI: linfocitos; IE: Índice de estimulación; ERS: eritrosedimentación CRP: Proteína C reactiva; MO: monocitos. r=Coeficiente de Spearman.

4.1.6 Análisis multivariado de componentes principales

Dado que tanto la DBT como una enfermedad infecciosa como la TB presentan componentes claramente multifactoriales en su génesis, su abordaje se torna cada vez más complejo. Con el propósito de lograr una visión más integradora de la comunicación entre metabolismo e inmunidad, se realizó un análisis multivariado de componentes principales, con inclusión de un conjunto de variables vinculadas al estado metabólico e inmuno-endócrino, que pudieran generar agrupamientos asociados con las patologías investigadas. Es necesario destacar que el número de variables incluidas está en estrecha relación con el total de voluntarios que conformaron el estudio y que las mismas debieron encontrarse cuantificadas en todos los individuos.

Es así como se seleccionaron las variables más relevantes que presentaron diferencias en el análisis univariado entre los distintos grupos en estudio y dado que el número de voluntarios del grupo TB+DBT fue limitante, las variables debieron agruparse en un número máximo de seis para realizar los diferentes abordajes multivariados. De las combinaciones de variables analizadas, sólo la que incluía IMC, leptina, IFN- γ , PPAR γ , DHEA-S, Cort/DHEA-S logró explicar el 75,6% de la variancia total al combinar las tres primeras componentes principales obtenidas.

La primera componente principal (PC1) explicó el 32,2% de la variancia total observada y se correlacionó en forma positiva y significativa con el IMC ($r=0,671$) y DHEA-S ($r=0,521$), mientras que negativa y significativa con la relación Cort/DHEA-S ($r=-0,767$) y con PPAR γ ($r=-0,656$). La segunda componente principal (PC2) explicó el 25,8% de la variancia total observada y se correlacionó en forma positiva y significativa con DHEA-S ($r=0,741$) y negativa y significativamente con los niveles de leptina ($r=-0,765$). Por lo tanto, las dos primeras componentes principales explican, en conjunto, el 59% de la variancia total observada (**Figura 20** panel **A**). Por otro lado, la tercera componente (PC3) explicó el 16,63% de la variancia total y se correlacionó negativa y significativamente con los niveles de IFN- γ ($r=-0,911$) (**Figura 20** panel **B**). En conjunto PC1 y PC3 explican el 48,83% de la variancia total. Como se observa en ambos paneles de la **Figura 20**, los valores promedio de los grupos se distribuyen en cuadrantes identificables, sin embargo los agrupamientos no son terminantes debido a la gran dispersión de los datos. Si bien con esta combinación de variables se logró explicar la mayor proporción de la variancia total con el menor número de componentes, la misma no se asoció con

agrupamientos claramente diferenciables según las patologías presentadas por los pacientes incluidos en el modelo.

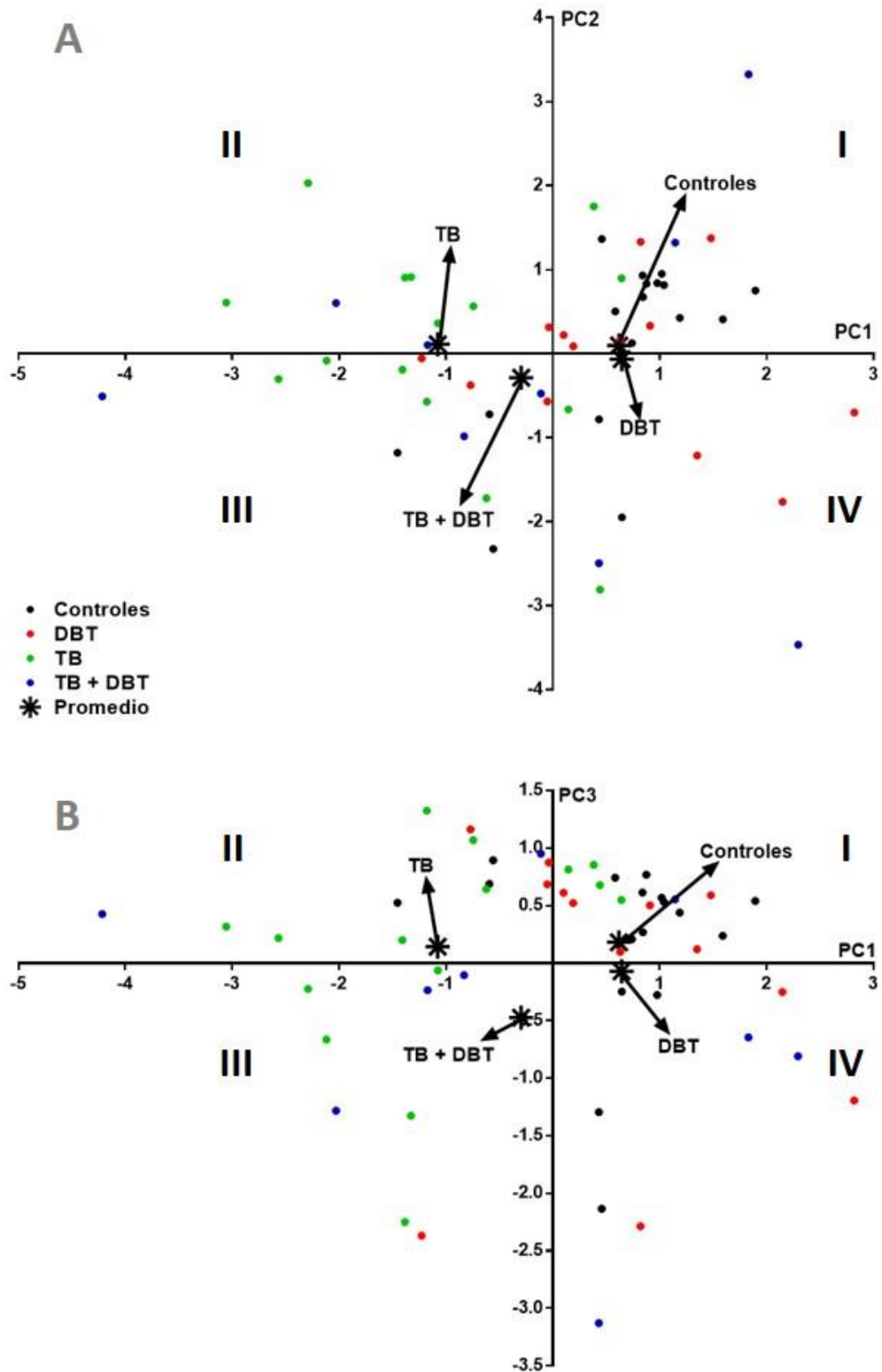


Figura 20: Representación de las componentes 1 y 2 (panel A) y de las componentes 1 y 3 (panel B) obtenidas del análisis multivariado. Los valores promedio de los grupos en estudio se distribuyen en cuadrantes identificables: controles sanos en cuadrante I, pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT) en cuadrante IV, pacientes sólo con tuberculosis (TB) en cuadrante II y con TB+DBT en cuadrante III.

SECCIÓN DE RESULTADOS 2

Respuesta inmune de células mononucleares periféricas y macrófagos frente a antígenos de *Mtb* en un ambiente hiperglicémico y/o de estrés mediado por cortisol

4.2 Efecto del cortisol y/o glucosa sobre la respuesta inmune de las células mononucleares periféricas frente a *Mtb*

Como se expresó anteriormente, ambos grupos de pacientes con TB presentan altos niveles plasmáticos de cortisol. Por otro lado, existen numerosos reportes donde se señala que el estado de hiperglicemia en los pacientes DBT afectaría su RI, tanto innata como adaptativa. Por tales motivos y a fin de simular estas condiciones, se decidió analizar los efectos de este esteroide en presencia de dosis suprafisiológicas de Glc sobre la RI específica de CMP provenientes de los voluntarios de los distintos grupos de estudio.

En la **Tabla 12** se describen algunas de las características de los voluntarios seleccionados para los ensayos *in vitro*, como puede observarse, no mostraron diferencias significativas en edad y sexo, sin embargo el menor porcentaje de individuos vacunados se evidenció en el grupo de pacientes con TB+DBT.

Tabla 12: Características generales de los sujetos seleccionados en cada grupo experimental, para los estudios *in vitro*

Parámetros	HCo (n=7)	DBT (n=9)	TB (n=7)	TB+DBT (n=6)	p global
Edad (años)	47 (43-62)	59 (53-62)	48 (32-60)	60 (45-66)	n.s.
Sexo (F/M)	3/4	4/5	5/2	4/2	n.s.
BCG (%)	100,0	100,0	71,0	35,0*	<0,01

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; F: femenino; M: masculino; BCG: Bacilo Calmette-Guerin. Edad expresada como mediana y rango intercuartil. * $p < 0,01$ vs HCo.

4.2.1 Estudio de la capacidad linfoproliferativa

En la **Figura 21** se representan los efectos de las diferentes dosis de Glc sobre la capacidad proliferativa frente a *Mtbi* de las CMP de voluntarios provenientes de cada grupo de estudio.

Independientemente de la dosis de Glc utilizada, la respuesta blastogénica de las células para cada grupo experimental fue similar a la descrita previamente en la sección 4.1.2 (**Figura 6**). Puede observarse que el IE del grupo TB fue inferior al de HCo, mientras que ambos grupos de pacientes con DBT mostraron las mayores respuestas, donde en los TB+DBT el incremento fue significativo (**Figura 21**).

A su vez, el aumento en las concentraciones de Glc no modificó significativamente la blastogénesis inducida por *Mtbi* en cada uno de los grupos de estudio. Aunque, como era de esperarse, aquellos sujetos con la comorbilidad, que presentaban los mayores IE, difirieron significativamente de los grupos TB y HCo para todas las dosis de Glc, y respecto de los pacientes con DBT sólo a la dosis fisiológica (**Figura 21**).

La **Figura 22** muestra el efecto del cortisol sobre la blastogénesis específica de los cuatro grupos de estudio ante las distintas concentraciones de Glc utilizadas. La mayor dosis de cortisol (1 μ M) disminuyó la capacidad proliferativa independientemente del grupo en estudio y de la concentración de Glc en el medio, difiriendo además de la menor dosis de cortisol utilizada (0,1 μ M) (**Figura 22** paneles **A**, **B**, **C** y **D**).

Es de notar que las diferencias observadas en la respuesta blastogénica entre los grupos de estudio mantuvo el mismo comportamiento al descrito en la **Figura 21**, independientemente de la dosis de cortisol y Glc utilizada (**Figura 22** paneles **A**, **B**, **C** y **D**). Asimismo pudo observarse que la hiperglicemia no modificó el efecto inhibitorio del cortisol (**Figura 23 A** y **B**).

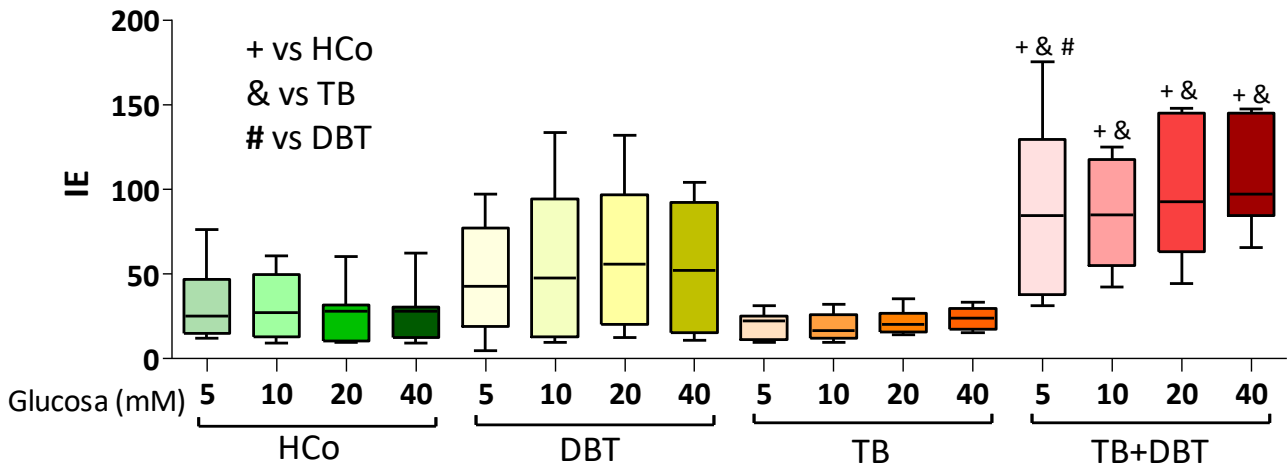


Figura 21: Efectos de las dosis suprafisiológicas de glucosa sobre la capacidad proliferativa frente a *Mtbi* de las células mononucleares periféricas provenientes de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los resultados se expresan como índice de estimulación-IE: cociente entre cuentas por minuto-cpm- de cultivos estimulados y cpm de cultivos sin estimular. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. + $p < 0,02$ diferente respecto a HCo, & $p < 0,003$ diferente respecto a TB, # $p < 0,05$ diferente respecto a DBT, en cada caso al comparar con la misma dosis de glucosa.

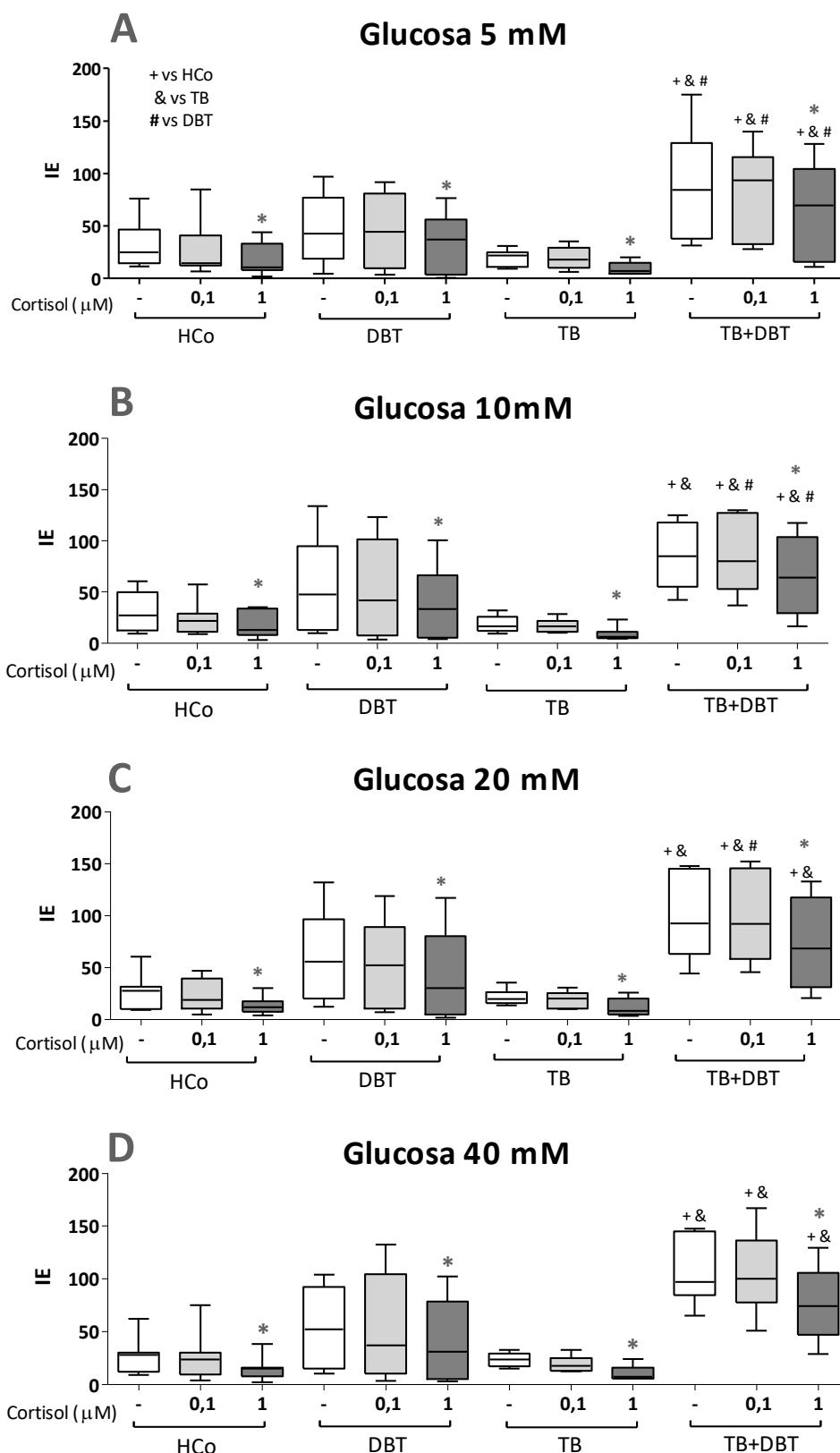


Figura 22: Efectos de las diferentes dosis de glucosa (5 mM-A, 10 mM-B, 20 mM-C, 40 mM-D) sobre la inhibición de la blastogénesis frente a *Mtbi* inducida por cortisol de las células mononucleares periféricas provenientes de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT). Los resultados se expresan como índice de estimulación-IE: cociente entre cuentas por minuto-cpm- de cultivos estimulados y cpm de cultivos sin estimular. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. + $p < 0,04$ diferente respecto a HCo, & $p < 0,02$ diferente respecto a TB, # $p < 0,05$ diferente respecto a DBT, en cada caso al comparar con la misma dosis de Glc; * $p < 0,05$ diferente respecto a tratamiento sin cortisol y con cortisol 0,1μM dentro del mismo grupo.

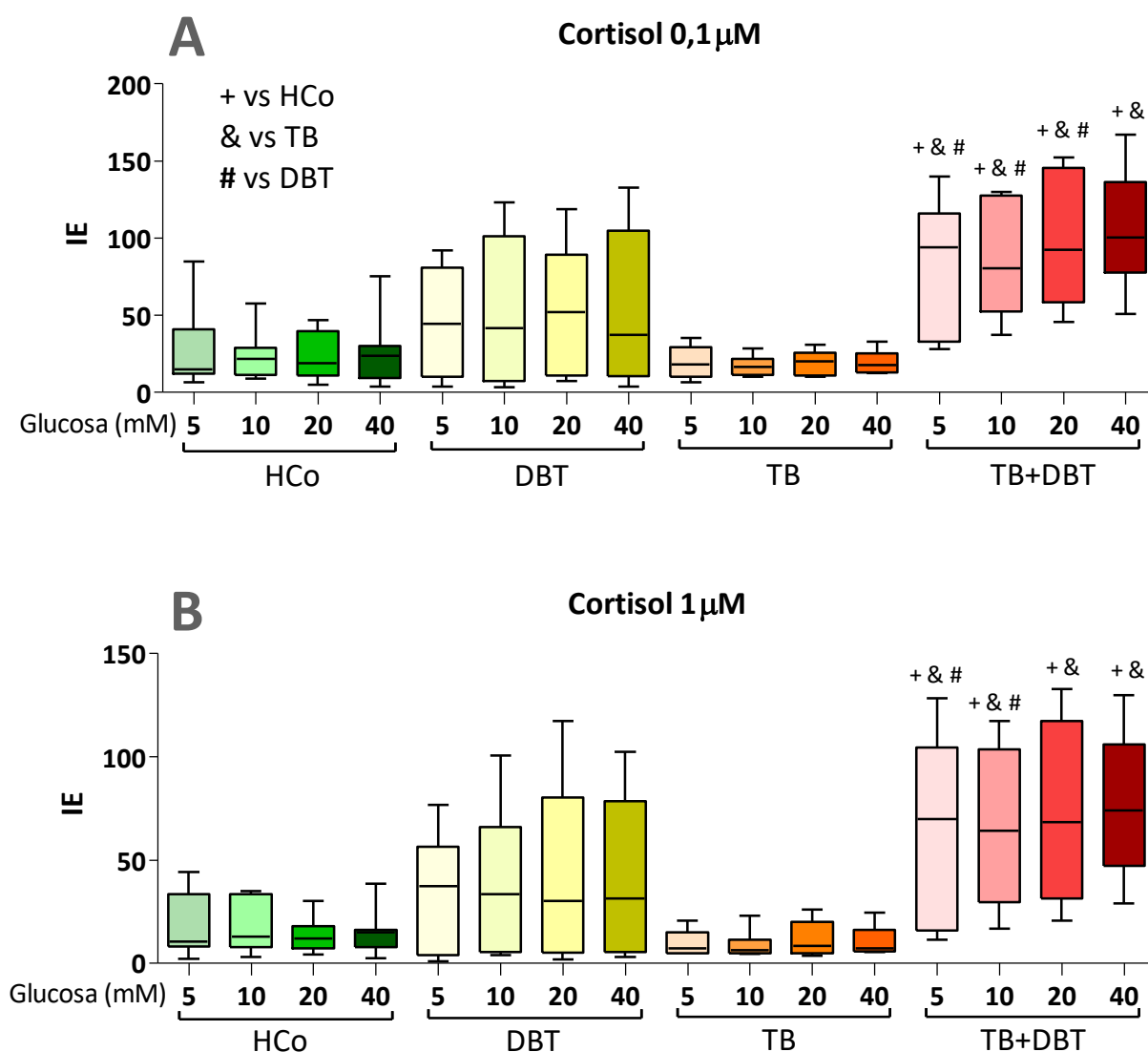


Figura 23: Efectos de las dosis suprafisiológicas de glucosa sobre la capacidad proliferativa frente a *Mtbi* de las células mononucleares periféricas provenientes de sujetos sanos (HCo), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DBT), pacientes con TB pulmonar (TB) y pacientes con TB y DBT (TB+DBT) tratadas con cortisol 0,1 µM (A) o 1 µM (B). Los resultados se expresan como índice de estimulación-IE: cociente entre cuentas por minuto-cpm- de cultivos estimulados y cpm de cultivos sin estimular. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. + $p < 0,04$ diferente respecto a HCo, & $p < 0,02$ diferente respecto a TB, # $p < 0,05$ diferente respecto a DBT, en cada caso al comparar con la misma dosis de glucosa.

4.2.2 Cuantificación de mediadores en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares periféricas

En los sobrenadantes de cultivos de CMP de 24h de incubación, sometidos a los tratamientos previamente descritos (sección Materiales y Métodos 3.8), se cuantificaron los niveles de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), antiinflamatoria (IL-10) y representativas de los distintos patrones de respuesta Th1 (IL-2, IFN- γ), Th2 (IL-4) y Th17 (IL-17A).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de linfoproliferación, los mencionados mediadores se cuantificaron sólo en los cultivos que recibieron los tratamientos que se detallan a continuación:

- Glc 5 mM
- Glc 5 mM + *Mtbi*
- Glc 5 mM + Cortisol 1 μ M + *Mtbi*
- Glc 20 Mm
- Glc 20 Mm + *Mtbi*
- Glc 20 mM + Cortisol 1 μ M + *Mtbi*

La estimulación de las CMP con *Mtbi* indujo en todos los grupos experimentales un aumento en los niveles de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ e IL-10, los que no se vieron modificados por el incremento de la dosis de Glc (20 μ M), a excepción de los de IL-1 β en CMP de HCo (Tabla 1 anexo). Cabe mencionar que los niveles de IL-6 se hallaron muy incrementados ante el estímulo, superando los límites superiores de detección del Kit, mientras que aquellos de IL-4 e IL-17A no pudieron detectarse.

Al comparar la producción de citocinas entre los grupos de estudio, los cultivos de las CMP de los pacientes con TB+DBT presentaron los mayores niveles de IL-2 (**Figura 24** paneles **A** y **B**) e IFN- γ (**Figura 25** paneles **A** y **B**), aunque sólo los de IL-2 difirieron significativamente de aquellos de los restantes grupos (**Figura 24** paneles **A** y **B**). Con respecto a TNF- α , IL-1 β e IL-10, los niveles de producción ante el estímulo con *Mtbi* fueron similares para todos los grupos de estudio (**Figuras 26, 27 y 28**).

El cortisol, por su parte, disminuyó los niveles de todas las citocinas nombradas anteriormente, independientemente del grupo de estudio y dosis de Glc utilizadas (**Figuras 26, 27 y 28**). Particularmente en lo que respecta a la IL-2 (**Figura 24** paneles **A** y **B**), si bien sus niveles descendieron, estos se mantuvieron significativamente elevados en el grupo TB+DBT

respecto de los restantes. Un comportamiento similar se observó para IFN- γ , difiriendo significativamente sólo de HCo y DBT (Figura 25 paneles A y B).

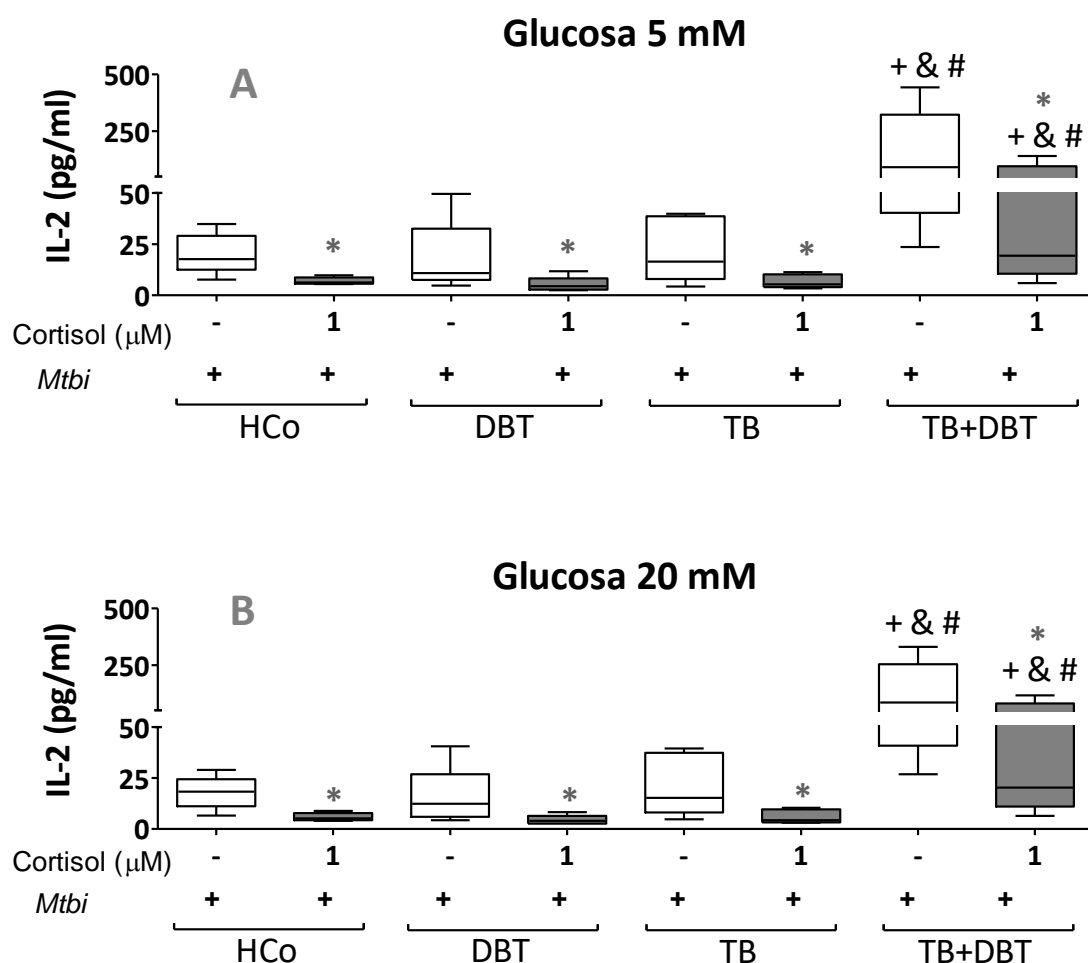


Figura 24: Niveles de producción de IL-2 en cultivos de células mononucleares periféricas, provenientes de pacientes y respectivos controles, estimuladas con *Mtbi*, tratadas con glucosa (A- 5 mM, B- 20 mM) en presencia o no de Cortisol (1 μM). HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. + $p < 0,03$ diferente respecto a HCo, & $p < 0,04$ diferente respecto a TB, # $p < 0,04$ diferente respecto a DBT, en cada caso al comparar con el mismo tratamiento; * $p < 0,03$ diferente respecto a cultivos sin cortisol dentro del mismo grupo.

La concentración de IL-2 en los cultivos sin estímulo sometidos a las dosis de Glc, solo en el 25% de las muestras se encontró por encima del límite de detección inferior.

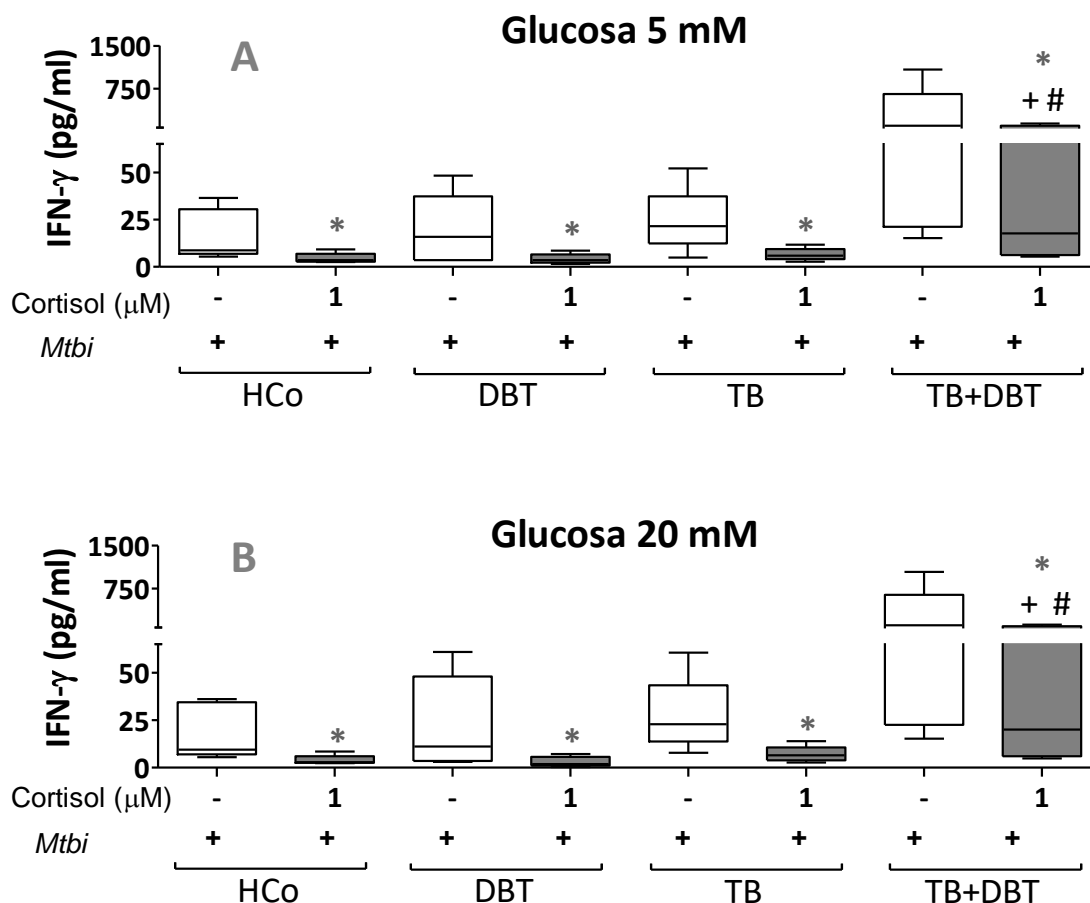


Figura 25: Niveles de producción de IFN- γ en cultivos de células mononucleares periféricas, provenientes de pacientes y respectivos controles, estimuladas con *Mtbi*, tratadas con glucosa (A- 5 mM, B- 20 mM) en presencia o no de Cortisol (1 μ M). HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. + $p < 0,04$ diferente respecto a HCo, # $p < 0,04$ diferente respecto a DBT, en cada caso al comparar con el mismo tratamiento; * $p < 0,03$ diferente respecto a cultivos sin cortisol dentro del mismo grupo.

La concentración de IFN- γ en los cultivos sin estímulo sometidos a las dosis de Glc, solo en el 12,5% de las muestras se encontró por encima del límite de detección inferior.

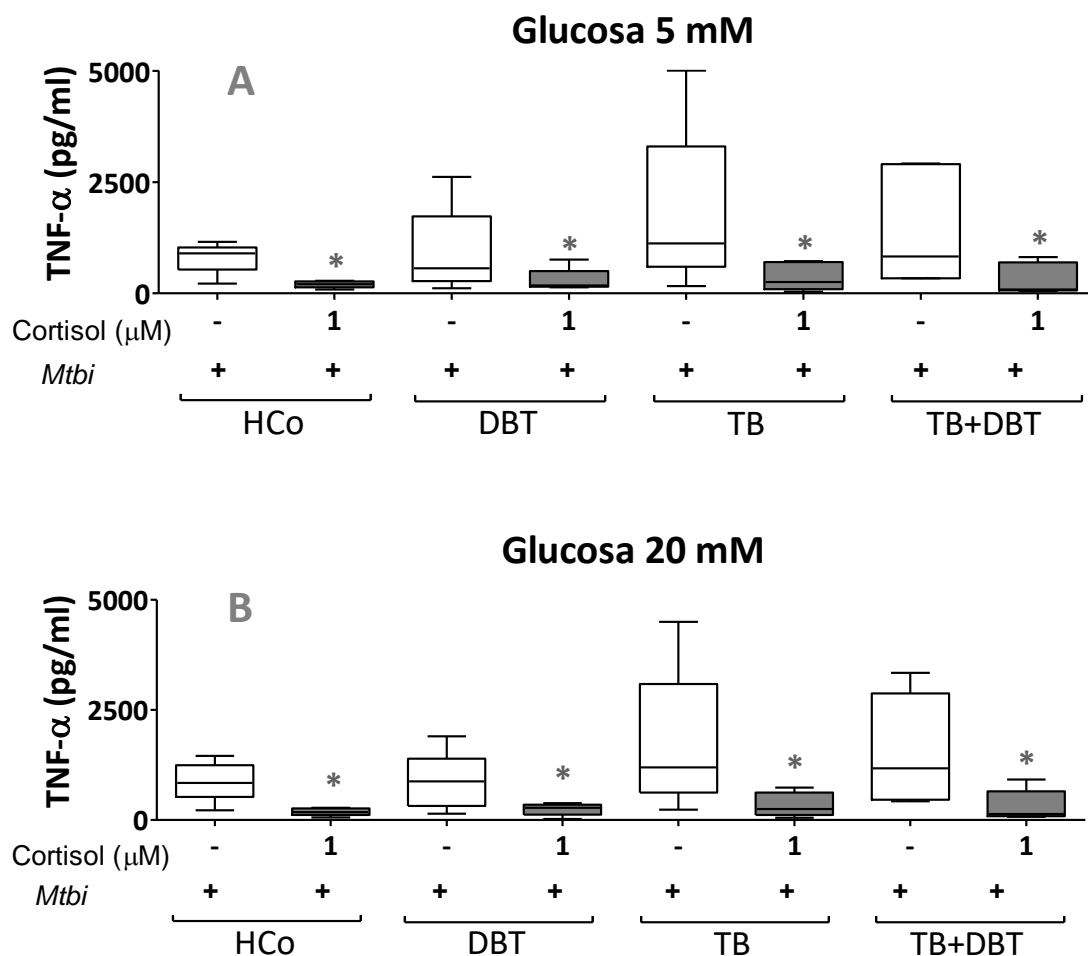


Figura 26: Niveles de producción de TNF- α en cultivos de células mononucleares periféricas, provenientes de pacientes y respectivos controles, estimuladas con *Mtbi*, tratadas con glucosa (A- 5 mM, B- 20 mM) en presencia o no de Cortisol (1 μ M). HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. * $p < 0,03$ diferente respecto a cultivos sin cortisol dentro del mismo grupo.

La concentración de TNF- α en los cultivos sin estímulo sometidos a las dosis de Glc, solo en el 62,5% de las muestras se encontró por encima del límite de detección inferior.

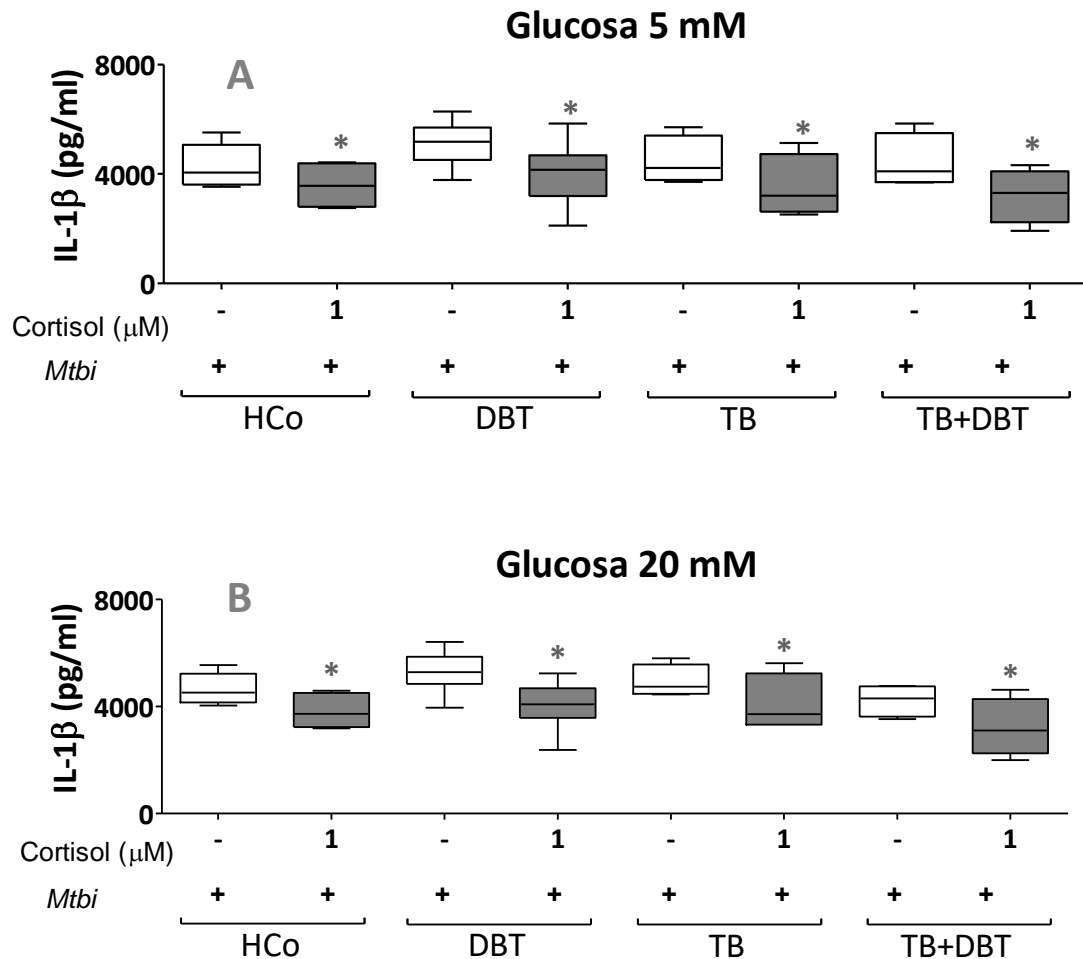


Figura 27: Niveles de producción de IL-1 β en cultivos de células mononucleares periféricas, provenientes de pacientes y respectivos controles, estimuladas con *Mtbi*, tratadas con glucosa (A- 5 mM, B- 20 mM) en presencia o no de Cortisol (1 μ M). HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. * $p < 0,03$ diferente respecto a cultivos sin cortisol dentro del mismo grupo.

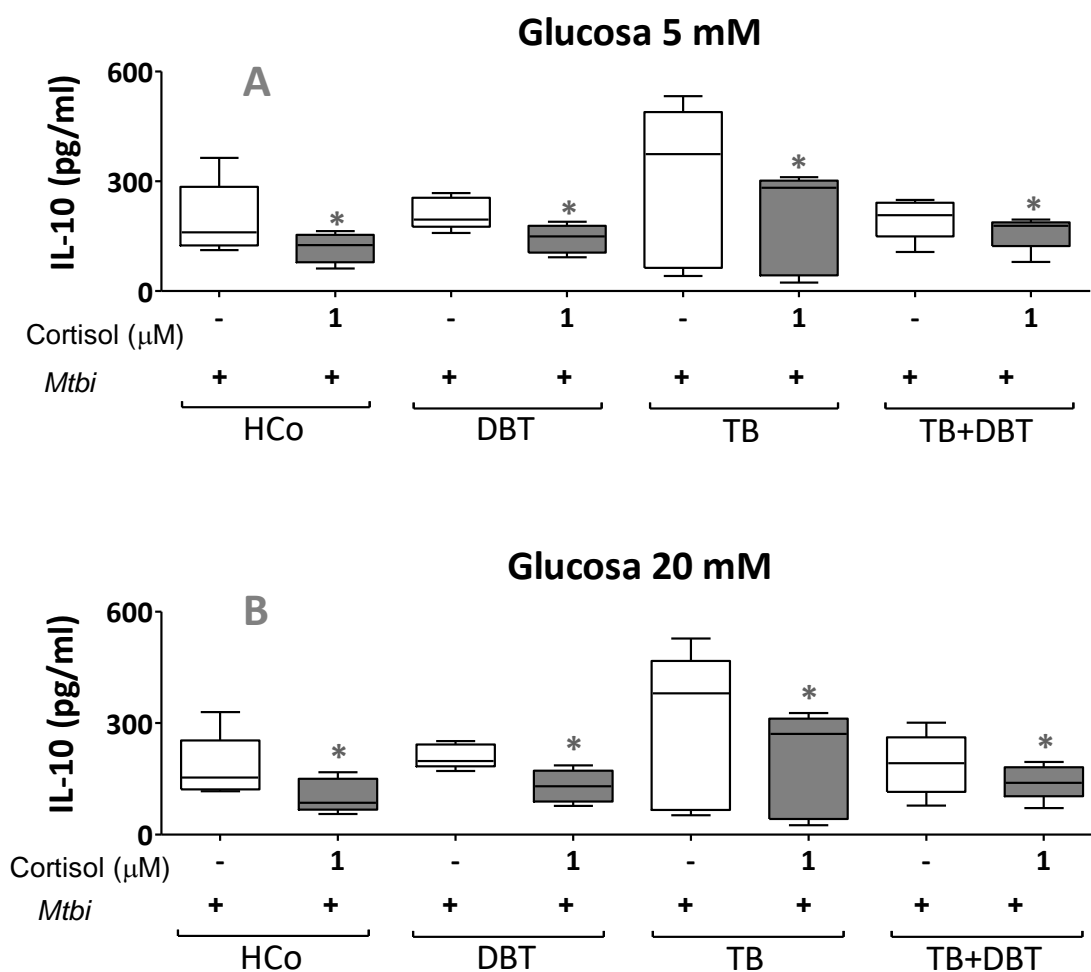


Figura 28: Niveles de producción de IL-10 en cultivos de células mononucleares periféricas, provenientes de pacientes y respectivos controles, estimuladas con *Mtbi*, tratadas con glucosa (A- 5 mM, B- 20 mM) en presencia o no de Cortisol (1 μ M). HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos grupos en estudio. * $p < 0,03$ diferente respecto a cultivos sin cortisol dentro del mismo grupo.

La concentración de IL-10 en los cultivos sin estímulo sometidos a las dosis de Glc, solo en el 47,5% de las muestras se encontró por encima del límite de detección inferior.

4.2.3 Correlaciones entre los niveles de citocinas e IE de los cultivos de CMP estimulados con *Mtbi* en condiciones o no de hiperglicemia y tratados o no con cortisol

El análisis de correlaciones entre los niveles de citocinas y el IE frente a los distintos tratamientos se muestra en la **Tabla 13**. En los cultivos estimulados sin la adición de cortisol, todos los grupos presentaron una correlación positiva entre los niveles de IL-2 e IFN- γ . Al adicionar cortisol esta correlación no fue significativa para los grupos HCo y TB. A su vez, la capacidad proliferativa de los grupos DBT y HCo se asoció positivamente con los niveles de IL-2 para los tratamientos con ambas dosis de Glc adicionados o no con cortisol. Mientras que en el grupo TB+DBT esta correlación se observó para la dosis de Glc 20mM en los grupos tratados o no con cortisol y para niveles fisiológicos de Glc sólo en los cultivos adicionados con cortisol. Sólo el grupo de pacientes DBT mostró correlación positiva entre los niveles de IFN- γ y el IE en cultivos tratados o no cortisol, independientemente de la dosis de Glc. Esta asociación también se observó para ambas dosis de Glc en cultivos de CMP de pacientes con TB+DBT, estimulados y tratados con cortisol.

Tabla 13: Correlaciones entre los niveles de citocinas y el índice de estimulación para los distintos tratamientos

Grupos de estudio		HCo (n=7)		DBT (n=9)		TB (n=7)		TB+DBT (n=6)	
Variables	Tratamientos	<i>Mtbi</i>	Cortisol + <i>Mtbi</i>	<i>Mtbi</i>	Cortisol + <i>Mtbi</i>	<i>Mtbi</i>	Cortisol + <i>Mtbi</i>	<i>Mtbi</i>	Cortisol + <i>Mtbi</i>
IL-2 vs IFN- γ	Glc 5mM	r=0,90; p=0,04	N.R.	r=0,97; p<0,02	r=0,90; p=0,04	r=0,80; p<0,05	r=0,70; p<0,23	r=0,90; p<0,02	r=0,90; p=0,04
	Glc 20mM	r=0,90; p=0,04	N.R.	r=0,99; p<0,0001	r=0,92; p=0,03	r=0,90; p<0,02	r=0,70; p<0,23	r=0,90; p<0,02	r=0,90; p=0,04
IL-2 vs IE	Glc 5mM	r=0,90; p=0,04	r=0,99; p=0,002	r=0,90; p=0,04	r=0,90; p=0,04	r=0,40; p=0,26	r=0,60; p=0,24	r=0,60; p=0,12	r=0,90; p<0,04
	Glc 20mM	r=0,90; p=0,04	r=0,90; p=0,04	r=0,90; p=0,04	r=0,90; p=0,04	r=0,60; p=0,24	r=0,70; p=0,14	r=0,90; p<0,02	r=0,90; p<0,02
IFN- γ vs IE	Glc 5mM	r=0,60; p=0,12	N.R.	r=0,80; p<0,05	r=0,99; p=0,002	r=-0,10; p=0,95	r=0,10; p=0,95	r=0,60; p=0,17	r=0,90; p<0,02
	Glc 20mM	r=0,70; p=0,12	N.R.	r=0,90; p=0,04	r=0,90; p=0,04	r=0,30; p=0,70	r=0,20; p=0,80	r=0,66; p=0,08	r=0,80; p<0,05

IE: índice de estimulación; HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; r= Coeficiente de Spearman; N.R.= no realizado debido a que más del 50% de las muestras presentaron valores de IFN- γ por debajo del límite de detección.

4.3 Efecto del cortisol y la glucosa sobre la respuesta inducida por *Mtb* en macrófagos derivados de la línea celular THP1

Dado que el *Mtb* se transmite por vía aérea y afecta principalmente los pulmones, los M ϕ alveolares son las células por excelencia para su contención y/o eliminación en las etapas tempranas de la TB. Ante estos hechos y en función de los objetivos planteados (ítem 2.2.3), se analizó el efecto de la hiperglicemia ante situaciones de estrés sobre la respuesta de M ϕ enfrentados a *Mtbi*. Para ello M ϕ derivados de la línea celular THP1 se sometieron a los distintos tratamientos previamente detallados en Materiales y Métodos (sección 3.10).

4.3.1 Modulación de la expresión de PPAR α y PPAR γ y producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10

Como se puede observar en la **Figura 29** (panel A), de la adición de las distintas dosis de Glc a los cultivos sin estimular, sólo aquella de 10mM inhibió la expresión de PPAR α respecto de la de 5mM, considerada fisiológica. Este efecto podría estar relacionado con el incremento en los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 β (**Figura 30** panel A) e IL-6 (**Figura 30** panel B) observado en los mismos cultivos. La expresión de PPAR γ (**Figura 29** panel B) y la producción de IL-10 (**Figura 31**), no se vieron modificados por el incremento de Glc en los cultivos sin estimular.

Frente al estímulo se evidenció aumento de la expresión de PPAR α para todas las concentraciones de Glc utilizadas (**Figura 29** panel A), sin modificar la de PPAR γ (**Figura 29** panel B), excepto para la mayor dosis de Glc (40 mM) que difirió significativamente de la del cultivo sin estimular. Sin embargo, cabe destacar que las altas dosis de Glc se correlacionaron positivamente con los niveles de expresión de PPAR γ ($r=0,80$, $p<0,01$, $n=9$). Con respecto a los mediadores analizados, el estímulo con *Mtbi* indujo incrementos en los niveles de IL-1 β (**Figura 30** panel A), IL-6 (**Figura 30** panel B) e IL-10 (**Figura 31**). En el caso de IL-6, los aumentos se asociaron positivamente con el incremento de Glc, excepto para la dosis de 40 mM ($r=0,61$; $p<0,008$; $n=18$). Un efecto opuesto se observó con IL-10, donde el incremento en los niveles de Glc se correlacionó negativamente con la producción de la mencionada citocina ($r=-0,82$; $p<0,0001$; $n=24$).

El tratamiento con cortisol de los cultivos estimulados moduló de modo diferente la expresión de los PPARs. Ambas dosis del esteroide inhibieron la expresión de PPAR α respecto de los cultivos sólo estimulados (**Figura 29** panel A), observándose sólo diferencias atribuibles a la Glc para la mayor dosis de cortisol. Por el contrario, el transcripto de PPAR γ se incrementó respecto de los cultivos estimulados, y además de manera dosis dependiente de Glc (**Figura 29**

panel **B**; $r=0,71$, $p<0,005$, $n=12$). Este aumento en los niveles de expresión del transcrito fue más evidente en los cultivos que recibieron la mayor dosis de cortisol (**Figura 29** panel **B**) y a su vez, presentando una correlación positiva con las altas dosis de Glc ($r=0,74$, $p<0,03$, $n=9$). Los niveles de los tres mediadores cuantificados descendieron frente al tratamiento con cortisol, más aún frente a la mayor de las dosis utilizadas (**Figuras 30** y **31**).

El efecto inhibitorio del cortisol se vio potenciado con el incremento de Glc en el medio, disminuyendo los niveles de IL-1 β e IL-10. Esto podría relacionarse con el incremento en la expresión de PPAR γ en los mismos cultivos, debido a que se observó una correlación negativa y significativa entre los niveles de expresión de PPAR γ y los de IL-1 β ($p=0,01$; **Figura 32** panel **A**) y PPAR γ e IL-10 ($p=0,003$; **Figura 32** panel **B**), para los cultivos estimulados y tratados con cortisol y concentraciones crecientes de Glc.

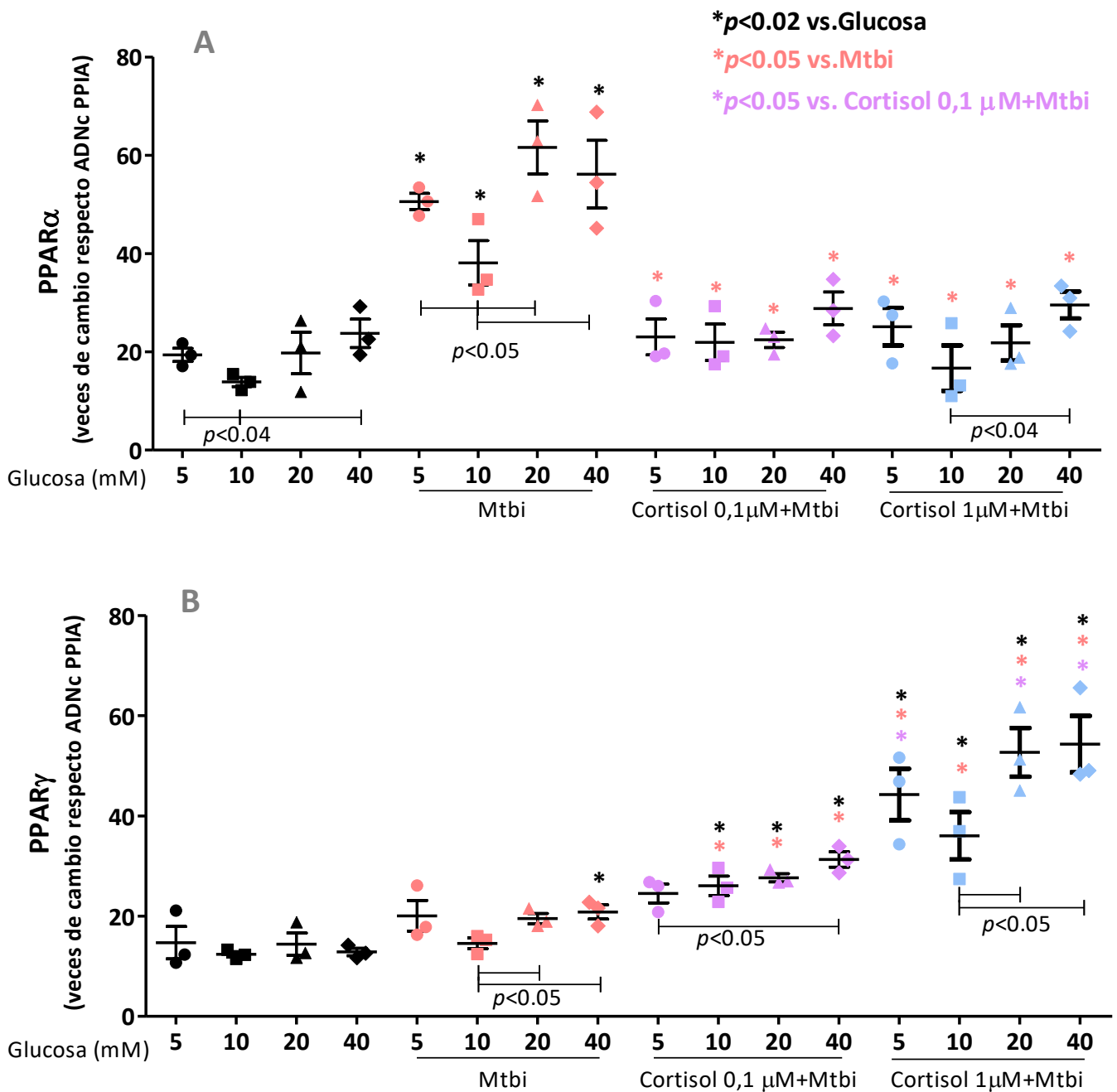


Figura 29: Modulación de la glucosa y el cortisol sobre la expresión de los transcritos PPAR α (A) y PPAR γ (B) en cultivos de THP1. Los resultados se expresan como veces de cambio respecto al ADNc del gen endógeno PPIA. Los diagramas de puntos representan la media y EEM. **p*<0,02 diferente respecto de los cultivos sin estimular tratados con la misma dosis de glucosa; **p*<0,05 diferente respecto de cultivos estimulados con *Mtbi* tratados con la misma dosis de glucosa; **p*<0,05 diferente respecto de cultivos estimulados con *Mtbi*, tratados con cortisol 0,1 μ M y la misma dosis de glucosa.

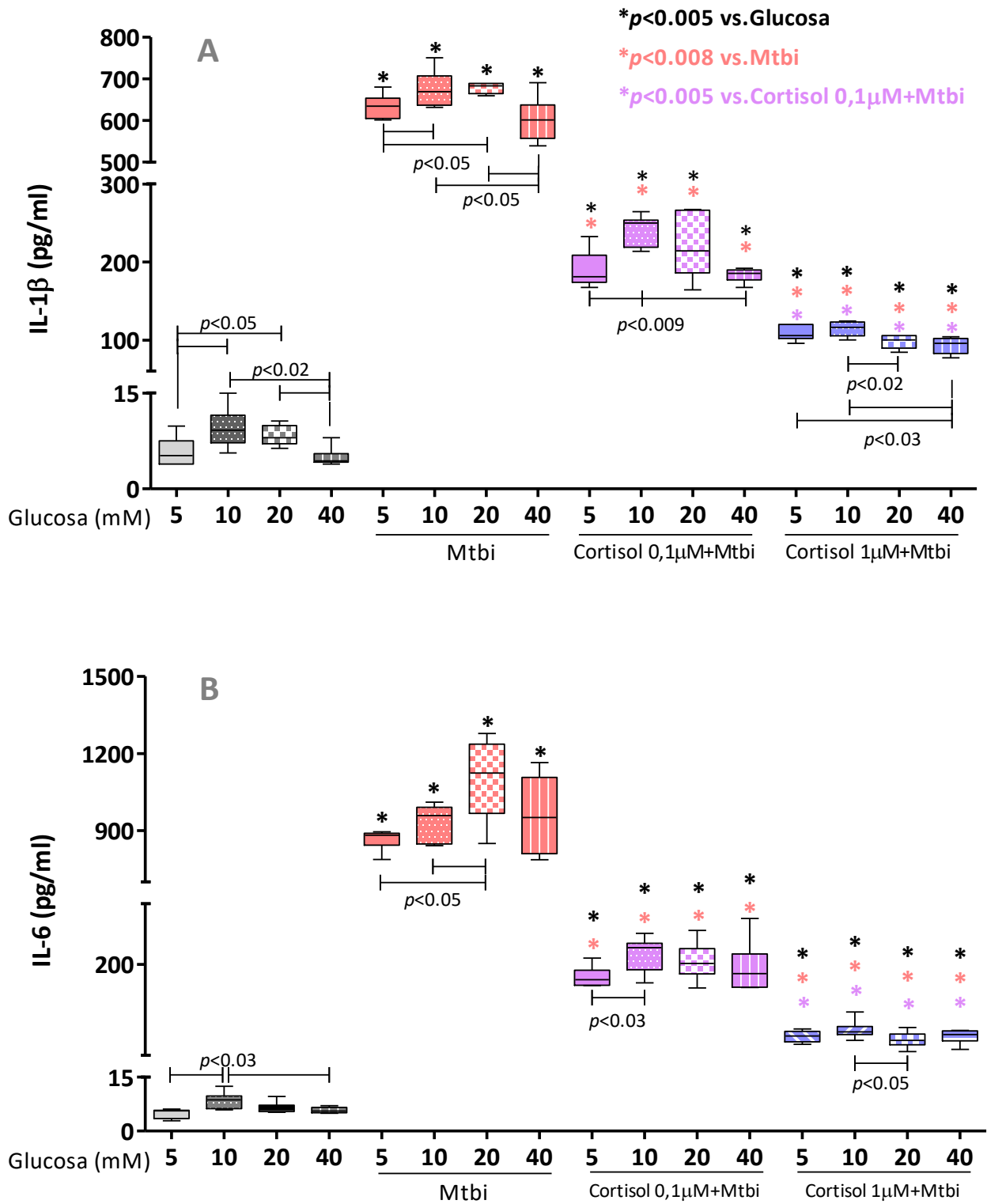


Figura 30: Modulación de la glucosa y el cortisol sobre la producción de IL-1 β (A) e IL-6 (B) en cultivos de THP1. Los resultados se expresan como veces de cambio respecto al ADNc del gen endógeno PPIA. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos tratamientos. * $p < 0,005$ diferente respecto de los cultivos sin estimular tratados con la misma dosis de glucosa; * $p < 0,008$ diferente respecto de cultivos estimulados con *Mtbi* tratados con la misma dosis de glucosa; * $p < 0,008$ diferente respecto de cultivos estimulados con *Mtbi*, tratados con cortisol 0,1 μ M y la misma dosis de glucosa.

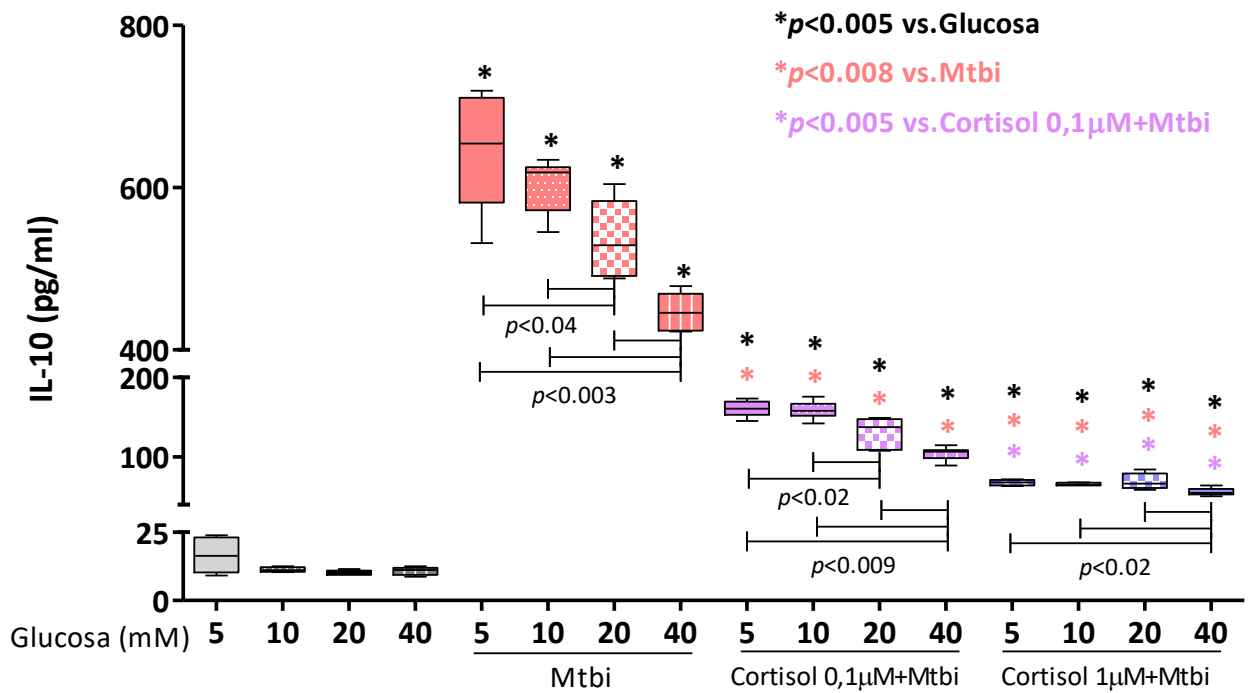


Figura 31: Modulación de la glucosa y el cortisol sobre la producción de IL-10 en cultivos de THP1. Los resultados se expresan como veces de cambio respecto al ADNc del gen endógeno PPIA. Los diagramas de caja representan los valores de mediana, percentilos 25-75 y valores máximos y mínimos de los distintos tratamientos. * $p < 0,005$ diferente respecto de los cultivos sin estimular tratados con la misma dosis de glucosa; * $p < 0,008$ diferente respecto de cultivos estimulados con *Mtbi* tratados con la misma dosis de glucosa; * $p < 0,008$ diferente respecto de cultivos estimulados con *Mtbi*, tratados con cortisol 0,1µM y la misma dosis de glucosa.

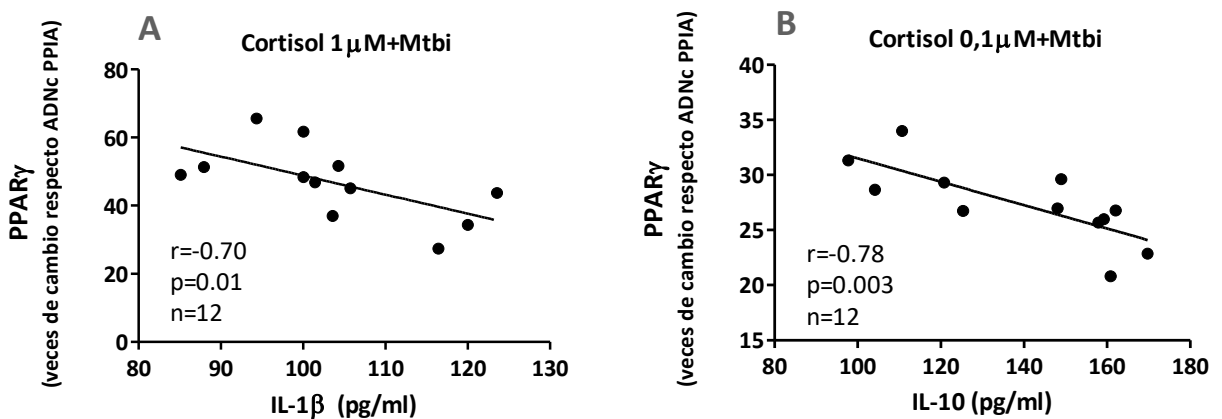


Figura 32: Asociación negativa entre los niveles de expresión de PPAR γ y la producción de IL-1 β (A) e IL-10 (B) en cultivos de THP1 estimulados con *Mtbi* y tratados con cortisol y glucosa. r: coeficiente de Spearman.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

SECCIÓN DE DISCUSIÓN 1

5.1 Análisis de la interrelación inmuno-endócrino-metabólica en el contexto de la comorbilidad Tuberculosis-Diabetes mellitus

La comorbilidad TB-DBT ha tomado gran relevancia en las últimas décadas debido al notorio aumento de la población diabética, con los mayores incrementos en los países de bajos y medianos recursos donde la TB es prevalente. Ambas patologías presentan, en sí mismas, alteraciones en la comunicación bidireccional entre el SI y el neuroendocrino con una importante repercusión en el componente metabólico^{264,210,285}. El análisis de esta interrelación multifactorial en la comorbilidad tiene un correlato con estas alteraciones.

En las investigaciones realizadas se evidenció que ambos grupos de pacientes con TB presentaron una importante respuesta inflamatoria, reflejada en altos niveles sistémicos de IL-6, CRP e IFN- γ , así como de ERS. Al respecto diversos reportes indican un mayor incremento de los mediadores proinflamatorios en los pacientes TB que padecen DBT respecto de aquellos no diabéticos^{132,282}, aunque en este estudio si bien apunta a un escenario similar, éste sólo se pone de manifiesto por el mayor incremento en los niveles de IFN- γ . Esta citocina, característica del perfil Th1, es esencial para activar al M ϕ a fin de contener y destruir al *Mtb*, así como para favorecer la presentación antigénica y la RI celular específica. Por cierto, las CMP de pacientes con la comorbilidad presentaron una incrementada respuesta blastogénica frente a *Mtb*, la que a su vez se correlacionó positivamente con el porcentaje de LT CD4+ sólo en este grupo de pacientes, si bien es de notar que sendos grupos con TB poseen disminuido el porcentaje de linfocitos. Por su parte la IL-6 es una citocina pleiotrópica con funciones tanto activadoras como inhibitoras de la RI. Respecto a la infección por *Mtb*, un estudio en ratones reportó que la presencia de IL-6 es esencial para la producción de IFN- γ por parte de las células de la inmunidad innata⁹⁵. En el presente estudio ambas citocinas se correlacionaron positivamente en pacientes TB con y sin DBT, sugiriendo cierto sinergismo entre IL-6 e IFN- γ . Además, como era de esperar, se encontró una asociación positiva entre IL-6 y CRP en los enfermos con TB, congruente con la participación de esta citocina en la producción de proteínas de fase aguda.

Resultó llamativa la marcada diferencia de la capacidad funcional linfocitaria entre ambos grupos de pacientes con TB. Al igual que en estudios previos llevados a cabo en el laboratorio^{205,261,283}, los pacientes sólo con TB mostraron una blastogénesis disminuida, la que a

su vez se correlacionó negativamente con los niveles de IL-10, citocina de reconocido efecto inhibitorio sobre la linfoproliferación²⁸⁴. A su vez este descenso en la capacidad proliferativa específica podría atribuirse a un reclutamiento de las células comprometidas hacia el sitio de la lesión²⁰⁵, mecanismo que podría verse alterado en los pacientes diabéticos con TB activa ya que son los que presentan los mayores IE^{125,285}.

Una exacerbada RI celular e inflamatoria como la observada, debiera ser regulada en menos ya que si perdura en el tiempo jugaría en detrimento del estado clínico del paciente. El aumento de los niveles sistémicos de IL-10 que presentaron los pacientes con la comorbilidad respecto de HCo, también reportado por Kumar y colaboradores¹³⁴, podría estar indicando la presencia de mecanismos contrarregulatorios intrínsecos de la RI a nivel lesional, dado sus conocidos efectos antiinflamatorios y antiproliferativos para LT CD4+^{284,286}. Sin embargo se ha demostrado que el incremento de esta citocina, tanto en ratones como en humanos, podría mostrar efectos contraproducentes ante la infección con *Mtb*. En Mø favorece la supervivencia de la micobacteria al inhibir la maduración del fagosoma, reducir la producción de NO, incrementar la expresión de Arg-1²⁸⁷ y a su vez bloquear la señalización del IFN- γ ^{288,289}. Por otro lado antagoniza el desarrollo de una respuesta Th1 mediante la supresión de la presentación antigénica²⁹⁰ y de la producción de IL-12²⁹¹. Algunos estudios sugieren que IL-10 sería un marcador de progresión de la enfermedad²⁹²⁻²⁹⁶. Al respecto, el análisis por severidades de la TB mostró un aumento de este mediador en aquellos pacientes con un compromiso pulmonar severo en ambos grupos de pacientes con TB, el cual resultó significativo sólo en el grupo TB+DBT.

Entre las distintas células productoras de IL-10 como Mø, CD, LT CD4+, LT CD8+, también se encuentran las células Treg, que mediante la secreción de este mediador inhibirían la producción de IFN- γ por parte de las células Th1. Díaz y colaboradores observaron aumento a nivel sistémico de estas células en pacientes TB al momento del diagnóstico²⁶¹. En este trabajo no se observó incremento de esta población linfoidea en ambos grupos de pacientes con TB. Aunque sí se puso de manifiesto una correlación inversa y significativa entre las células Treg y los niveles plasmáticos de IFN- γ en los pacientes con la comorbilidad.

Resultó llamativo observar un incremento de IL-10 en los pacientes sólo con DBT sin presentar aumento de las citocinas proinflamatorias. Sin embargo los niveles de CRP y la ERS se vieron significativamente incrementados respecto de los de HCo lo que pondría de manifiesto un efecto proinflamatorio subyacente donde IL-10, por lo previamente expresado, cumpliría un

rol regulador. A su vez este aumento de IL-10 podría contribuir al riesgo de contraer TB en este tipo de pacientes.

Es necesario mencionar que el aumento en los niveles de esta citocina podría deberse a que gran parte de los pacientes con DBT (67%) y aquellos con la comorbilidad (55%) estaban tratados con metformina, aunque en este estudio no se observaron diferencias significativas en los niveles IL-10 entre pacientes tratados y no tratados con este fármaco. La metformina es una droga antidiabética que, además de reducir la resistencia a la insulina, su secreción y los niveles de glicemia, tiene importantes efectos antiinflamatorios^{297,298}. Sumado a lo anteriormente dicho, recientemente se la ha propuesto como terapia adyuvante al tratamiento anti-TB debido a sus efectos inmunomoduladores²⁹⁹ entre los que se pueden destacar la inducción de la producción de ROS mitocondrial promoviendo la apoptosis; la inducción de la autofagia; el favorecer la RI celular, el incremento del infiltrado de LT CD4+ y LT CD8+ local y la producción de IFN- γ ; como así también una disminución de la respuesta inflamatoria limitando el daño tisular^{299,300}. Por todo lo expuesto, sería de esperar que el tratamiento con metformina fuese beneficioso tanto para los pacientes TB+DBT como para aquellos sólo con TB, sin embargo no está claro en qué rango de dosis debe ser administrada como para inducir los mecanismos antimicobacterianos sin generar una respuesta antiinflamatoria excesiva que contribuya a la evasión de la RI por parte del *Mtb*²⁹⁹⁻³⁰¹.

Otros de los factores que podrían estar involucrados en la modulación de la RI frente a *Mtb* son los receptores nucleares PPARs. Estos factores transcripcionales han sido ampliamente estudiados debido a su participación en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa, y más recientemente su rol inmunomodulador^{302,303}. Los distintos subtipos reportados, PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , comparten entre un 60 y un 80% de homología en los dominios de unión a ligando y a ADN, pero poseen diferente afinidad por el ligando, expresión y diferente acción en diversas vías de señalización³⁰⁴. El más ampliamente reportado como regulador de la respuesta inflamatoria en células de la inmunidad innata y adaptativa y con implicancia en infecciones micobacterianas es PPAR γ ^{248,244,305}. El análisis de los niveles transcripcionales de este receptor en las CMP de los distintos grupos en estudio sugiere que la presencia del agente infeccioso aumenta su expresión. Tal como se comentó en el marco teórico, un estudio reciente realizado por Díaz y colaboradores evidenció este incremento en pacientes que padecían sólo TB²⁶³, al igual que lo aquí observado en aquellos con la comorbilidad; donde además ambos grupos con TB evidenciaron una correlación positiva y significativa entre los niveles de IL-6 y la expresión de PPAR γ . A su vez, en el grupo con la comorbilidad, la expresión de este receptor se correlacionó

positivamente con las concentraciones plasmáticas de IL-10 y negativamente con la capacidad proliferativa así como con el porcentaje de linfocitos. Al respecto, se ha reportado que en M ϕ humanos la activación de PPAR γ favorece la polarización hacia un perfil M2, secretor de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , generalmente mediante mecanismos de transrepresión que involucran a NF- κ B y AP-1. En lo concerniente a la RI celular, de acuerdo a Yang X.Y. y colaboradores este receptor impediría la proliferación de los LT a través de un mecanismo dependiente de IL-2 que involucra la represión del factor nuclear de las células T activadas (NFAT)³⁰⁶; a su vez participaría en la disminución de la respuesta Th1 ya que su delección en LT CD4+ incrementa la proliferación antígeno específica y la sobreproducción de IFN- γ en respuesta a la IL-12²⁵¹ y además se ha encontrado altamente expresado en células humanas y de ratón del perfil Th2^{237,252}. Sin embargo, si bien los pacientes con la comorbilidad muestran una correlación negativa entre este receptor y el IE, son también los que presentaron los mayores niveles de proliferación e IFN- γ . En síntesis, el incremento de PPAR γ sugeriría otro intento del SI en modular la notoria respuesta inflamatoria y proliferativa observada en los pacientes con la comorbilidad.

Otro posible mecanismo contrarregulatorio de la RI desencadenado por las citocinas proinflamatorias involucra la activación del eje HPA^{139,307}. Como se ha comentado previamente, esta activación culmina con la liberación de cortisol (zona fascicular), DHEA y DHEA-S (zona reticular), hormonas con importantes funciones inmunomoduladoras^{139,141,189}. Con respecto a IL-6 existe una vasta evidencia sobre su participación en la activación del eje HPA en todos sus niveles³⁰⁸ ya que estimula la secreción de ACTH y a su vez, a nivel adrenal, actuaría sinérgicamente con ella induciendo la liberación de GC. La ACTH media la liberación temprana de los GC y se propone que en patologías crónicas, donde la ACTH circulante se encuentra disminuida, tanto IL-6 como IL-1 β , inducirían la síntesis de GC^{309,310}. Respecto al IFN- γ , diversos estudios *in vivo* e *in vitro* sobre modelos animales han reportado su colaboración en la activación del eje aunque ésta sería indirecta a través de la inducción y acción de las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6^{310,311}. Dado que en una situación normal ambos esteroides se secretan sincrónicamente y que frente a la respuesta a un patógeno, DHEA actuaría como antagonista inmunológico del cortisol^{199,200}, la relación entre estos mediadores podría ser un indicador de la respuesta en curso. En este estudio los pacientes con TB+DBT mostraron un aumento en las relaciones Cort/DHEA y Cort/DHEA-S, como consecuencia del incremento de los niveles plasmáticos de cortisol y la disminución de los de DHEA-S, reportándose por primera vez la desregulación del eje HPA en la comorbilidad TB-DBT. Estas

hormonas mostraron un comportamiento similar en los pacientes con TB, donde se evidenció además una disminución significativa de los niveles de DHEA, en consonancia con estudios previos^{258,260,261,283}, con una relación Cort/DHEA que fue superior a la de los pacientes con la comorbilidad. Este patrón también ha sido reportado en diversas enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoidea, lupus eritematoso y DBT^{145,193,194,179}, posiblemente reflejando alteraciones en la función adrenal a fin de mantener la producción de cortisol, como un intento de contrarrestar la respuesta inflamatoria que acompaña a la enfermedad activa. En este estudio los pacientes con DBT también mostraron una alteración del eje HPA (relaciones Cort/DHEA y Cort/DHEA-S incrementadas) sin embargo este no se debió a una hipercortisolemia, como detallan distintas publicaciones¹⁴²⁻¹⁴⁴, sino a la disminución de los niveles de DHEA-S^{198,312}.

Es importante repasar la participación de estas hormonas en la regulación del SI. Los GC tienen un rol inmunomodulador ampliamente conocido, generando diversos efectos dependiendo de su concentración y del tipo de célula sobre el que actúen¹⁷³⁻¹⁷⁶. El incremento del porcentaje de NE y la consecuente disminución del de LI observado ambos grupos de pacientes con TB, podría deberse además al incremento de cortisol plasmático observado. Es sabido que los GC generan neutrofilia y además impiden la extravasación al inhibir la expresión de E-selectina, quimiocinas e integrinas¹⁷³. Por cierto, se encontró una asociación positiva entre el porcentaje de NE y los niveles de cortisol en los pacientes con TB+DBT. Por otro lado tienen un efecto pro apoptótico sobre los LT y favorecen su migración a la médula ósea y órganos linfoides secundarios¹⁷³⁻¹⁷⁶.

En lo que respecta a la DHEA y DHEA-S estas hormonas tendrían un rol beneficioso en patologías como la TB, ya que como inmunomoduladoras, favorecen preferentemente la RI celular del perfil Th1 y a su vez presentan función antinflamatoria mediante la inhibición de TNF- α e IL-6^{201,203,313,314}. Los niveles de DHEA-S se encontraron muy disminuidos en ambos grupos de pacientes con TB como así también en sujetos con DBT. La DHEA-S no es bioactiva sin embargo es el reservorio natural de la DHEA y por lo tanto es un marcador estable de la disponibilidad de la misma. En este trabajo la DHEA se encontró disminuida significativamente en los pacientes sólo con TB. Ante este panorama es posible hipotetizar sobre una posible desregulación a nivel de las enzimas involucradas en la interconversión de estas hormonas en ambos grupos de pacientes con DBT. Una esteroide sulfotransferasa (SULT2A1) se encarga de convertir DHEA en DHEA-S en la glándula adrenal e hígado, mientras que en tejidos periféricos

son las STS las encargadas de realizar el paso inverso y utilizar la DHEA para producir metabolitos biológicamente activos intracelularmente. Existen evidencias que plantean la participación de diversas citocinas en la disminución de las sulfotransferasas³¹⁵. En un modelo murino de RFA en base a la utilización de LPS, se observó una disminución del transcripto de SULT2A1 así como una menor actividad de esta enzima en hígado, conjuntamente con bajos niveles séricos de DHEA-S. Por otro lado, en cultivos de la línea de hepatocitos humanos Hep3B, comprobaron que las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β median el efecto inhibitorio del LPS sobre los niveles transcripcionales de SULT2A1³¹⁶. Otro estudio realizado en pacientes con distinto grado de compromiso hepático, no evidenció diferencias en la actividad de SULT2A1 en hígados de pacientes DBT que padecían o no cirrosis, aunque sí se verificó una disminución en los niveles transcripcionales de la enzima PAPSs (del inglés *3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate*) respecto de muestras de pacientes con y sin esteatosis hepática. Esta enzima es una sintasa generadora del dador universal de grupos sulfato PAPS, cofactor de la SULT2A1³¹⁷. Es importante destacar que los sujetos incorporados en el presente trabajo no presentaron variaciones en marcadores hepáticos sugerentes de daño, lo cual no implica descartar una posible desregulación de la SULT2A1 tanto a nivel hepático como de glándula suprarrenal.

Como fue expresado previamente (Introducción sección 1.11) los pacientes con TB presentan cierto grado de resistencia a los GC^{246,262}, efecto que también se estudió en pacientes con la comorbilidad, quienes además mostraron altos valores de citocinas proinflamatorias y de cortisol. Los mecanismos de resistencia a los GC pueden involucrar modificaciones en la expresión de alguna (o ambas) de las isoformas del GR (GR α y/o GR β), así como alteraciones en la interconversión cortisol-cortisona (a cargo de las enzimas 11 β HSD 1 y 2), entre otros³¹⁸. Al contrario de lo observado en los pacientes únicamente con TB, la relación de los transcriptos para GR α /GR β no mostró diferencias en pacientes con ambas patologías, aunque el incremento de los niveles transcripcionales de la 11 β HSD1 fue notable no sólo en este grupo sino también en los pacientes con DBT. Esta enzima favorecería la conversión de cortisona en cortisol aumentando la biodisponibilidad de esta hormona a nivel celular. El incremento de 11 β HSD1 podría atribuirse a la disminución en los niveles de DHEA-S observados tanto en DBT como en pacientes con la comorbilidad ya que DHEA induce el cambio en la expresión de 11 β HSD1 hacia 11 β HSD2 aumentando la conversión de GC activo en inactivo³¹⁹. Si bien no se pone de manifiesto un incremento en el transcripto para GR β no puede descartarse algún tipo de resistencia a la acción biológica de los GC mediado por otros mecanismos no analizados en este

trabajo, puesto que los niveles de ciertas citocinas proinflamatorias como IFN- γ se encuentran aún más elevados en los pacientes TB+DBT que en el grupo de enfermos únicamente con TB. No puede descartarse que los niveles circulantes de cortisol sean insuficientes ya que no se condicen con la palmaria respuesta inflamatoria desencadenada por este tipo de patógeno sugerente de un cierto grado de disfunción del eje HPA^{140,320}. Este fenómeno se vería más acentuado en los pacientes con TB+DBT atribuible al desbalance en la relación Cort/DHEA evidenciada en los pacientes sólo con DBT. Es de notar que la resistencia a la acción de los GC también ha sido ampliamente reportada en pacientes con otras enfermedades crónicas como asma, síndrome de Cushing, enfermedades vasculares³²¹.

Respecto de otros componentes endócrinos, el eje somatotrófico también se encontró desregulado habida cuenta del aumento plasmático encontrado en la hGH en los pacientes con ambas patologías, aunque este incremento fue a expensas de los varones con TB+DBT. El aumento en la secreción de GH se atribuiría a las citocinas proinflamatorias producidas durante el proceso infeccioso, lo que tendería en cierta manera a contribuir con el desarrollo de la RI celular contra patógenos como el *Mtb*^{307,322}. Sin embargo a diferencia de lo mencionado, ante una situación de estrés crónico, se ha reportado disminución en los niveles de cortisol, hGH y prolactina³²³. En el caso de los pacientes sólo con TB, y en consonancia con hallazgos previos, también se observaron mayores niveles de esta hormona, aunque no se evidenciaron cambios en los niveles de IGF-1. Dado que este factor media gran parte de las funciones de la hGH se propuso un cierto grado de resistencia a la hormona²⁵⁸.

Como fuera adelantado, en procesos de naturaleza infecciosa e inflamatoria se desarrolla una RFA que involucra alteraciones neuroendócrinas, conductuales, inmunológicas y metabólicas con el propósito de que las reservas energéticas sean utilizadas para la activación y desarrollo de la RI necesaria para combatir la noxa. Este comportamiento es beneficioso durante cortos períodos de tiempo, sin embargo dependiendo de las características del inductor, de la genética del individuo y de su relación con el medio ambiente podría llevar a la desregulación de la respuesta neuro-inmuno-endócrino-metabólica contribuyendo a la cronicidad y agravamiento de la patología³²⁴.

Las citocinas proinflamatorias son los principales candidatos como agentes causantes de los cambios neuroendócrino-metabólicos que en última instancia llevan a la pérdida de peso en los individuos enfermos de TB²⁵⁹, una de las manifestaciones clínicas más importantes de estos pacientes. En este trabajo se evidenció un menor IMC en el grupo TB respecto de los demás

grupos en estudio, aunque la mayoría de los pacientes mostraron valores dentro del rango considerado normal. A la vez éste índice se correlacionó negativamente con los niveles de IL-6, CRP y ERS, lo que denota la gran demanda energética requerida para sostener la cuantiosa respuesta inflamatoria desencadenada en estos pacientes. Los resultados concuerdan con estudios previos publicados por el grupo^{259,260}. En lo que respecta a los pacientes con la comorbilidad no se evidenció esta disminución del IMC, más aun, el 60% de los individuos presentó valores considerados de sobrepeso según la OMS. Mientras el sobrepeso y la obesidad incrementan el riesgo de desarrollar DBT y pre-DBT, diversos estudios de cohorte han reportado que disminuye el riesgo de desarrollar TB³²⁵⁻³²⁷. Sin embargo una revisión sistemática destaca que esta afirmación sería válida para valores de IMC no mayores a 30 kg/m²³²⁸.

Por otro lado la malnutrición es otro de los factores de riesgo a considerar para el desarrollo de TB ya que contribuiría, principalmente, al deterioro de la RI celular del hospedero³²⁹. El análisis de un marcador del estado nutricional proteico como la albúmina reflejó niveles descendidos, aunque dentro de los valores de referencia, en ambos grupos de pacientes con TB, a pesar de no presentar diferencias en los niveles de proteínas totales. Un estudio de seguimiento realizado en EE.UU. reportó una fuerte asociación entre bajos niveles de albúmina y transferrina sérica con un mayor riesgo de desarrollar TB. No obstante en estudios de corte transversal como el presente es imposible determinar la direccionalidad de estos hechos. Respecto al hierro se debe considerar que sus concentraciones son críticas para la RI pero también para el metabolismo y replicación del *Mtb*. En el trabajo de Cegielski J.P. y colaboradores no pudieron predecir si la deficiencia de hierro favorecía más al microbio que al hospedero³³⁰.

El presente trabajo también abordó el análisis de las adipocitocinas atento a su desempeño en la regulación de la ingesta. La leptina es liberada principalmente por los adipocitos para inhibir el apetito, mientras que la adiponectina se encuentra asociada al aumento de la ingesta, la distribución de las reservas grasas centrales y a múltiples desórdenes metabólicos. Los resultados obtenidos en los hombres que padecían TB concuerdan con aquellos reportados previamente por el laboratorio²⁶⁰, en donde se observa un patrón orexigénico en estos individuos, bajos y altos niveles de leptina y adiponectina, respectivamente. Sin embargo este patrón no sería tan evidente en aquellos pacientes con la comorbilidad. Los niveles de leptina se encontraron disminuidos aunque no tanto como los de pacientes sólo con TB, mientras que no se evidenciaron cambios significativos en las concentraciones de adiponectina. El estudio de estos mediadores realizado por Kumar y colaboradores en pacientes con TB activa y latente ante

la presencia de la comorbilidad muestra resultados similares, aunque los pacientes TB mostraron mayores niveles de adiponectina que los pacientes TB+DBT³³¹. Esta diferencia posiblemente no es evidente en nuestro estudio por el bajo número de sujetos en el grupo con la comorbilidad.

Los niveles reducidos de leptina en ambos grupos de pacientes con TB podrían deberse en parte a los altos niveles sistémicos de mediadores proinflamatorios, ya que secretados de manera crónica suprimen la síntesis de esta adipocitocina^{223,332}. A su vez, las diferencias observadas entre ambos grupos con TB podrían atribuirse a la preservación del IMC que presentan los pacientes con la comorbilidad, donde es dable suponer una mayor adipocidad. Asimismo, la leptina ha sido reportada como una citocina favorecedora de la respuesta celular, particularmente la del perfil Th1²¹⁴. Si bien en los pacientes con TB tanto leptina como IE se encuentran disminuidos se evidenció una correlación positiva y significativa entre estas variables.

Retomando el accionar del cortisol se deben considerar otras funciones más allá de su rol inmunomodulador. Esta hormona tiene una acción principalmente catabólica. Por un lado favorece la lipólisis en adipocitos y por lo tanto permite la movilización de las reservas energéticas de todo el cuerpo, a excepción del abdomen donde parte de estos lípidos son redireccionados a los depósitos viscerales. Además, a nivel hepático es un importante estimulador de la glucogenolisis y la gluconeogénesis³³³ y contribuye a la resistencia a insulina de manera de impedir que el sustrato energético sea usado por este órgano al igual que por el tejido muscular y el adiposo³³⁴. De esta manera su aumento contribuiría en la reasignación de las reservas energéticas hacia el SI. Por otro lado los GCs regulan la ingesta. En humanos se ha visto que generan hiperfagia³³⁵. Sin embargo diversos reportes señalan que el tratamiento prolongado con estos esteroides inhibe el apetito y contribuye a la pérdida de peso³³⁶. Por cierto los pacientes TB+DBT mostraron una asociación negativa entre los niveles de cortisol y el IMC, aunque se debe considerar que la mayoría de estos pacientes no presentan una hipercortisolemia. Por su parte, hGH, conocida por estimular la lipólisis mediada por cortisol dentro de niveles fisiológicos, y así permitir el redireccionamiento de la energía al SI³³⁷, se encontró fuertemente asociada con los niveles de cortisol en el grupo TB+DBT.

En este trabajo, ambos grupos de pacientes con DBT presentaron resistencia a la insulina, más aún aquellos sujetos con la comorbilidad, habida cuenta del incremento en el índice HOMA_{IR}. Entre los diversos factores involucrados en esta resistencia podría destacarse el

componente inflamatorio observado tanto en el grupo DBT como en TB+DBT³³⁸⁻³⁴⁰. Por otro lado, se ha reportado que la disminución o inhibición de la enzima 11 β HSD1 en ratones diabéticos puede atenuar la insensibilidad a la insulina en diversos tejidos así como el deterioro de la secreción de insulina estimulada por Glc en el páncreas, principalmente al evitarse los mecanismos de inhibición de los GC en la vía de señalización de la insulina³⁴¹. Se debe considerar que en los leucocitos es contradictoria la presencia de resistencia a insulina y según trabajos recientes, esta hormona actuaría favoreciendo las funciones inmunes^{342,343}, por lo que el incremento de 11 β HSD1 en las CMP de ambos grupos de pacientes con DBT podría reflejar algún tipo de alteración en la funcionalidad de esta enzima, que deberá elucidarse.

Dos de las hormonas estudiadas con participación indirecta en la sensibilidad a la insulina son DHEA y DHEA-S ya que favorecen el descenso de peso corporal^{344,345}, la reducción del tejido adiposo³⁴⁶ y la estimulación de la captación de Glc^{345,347}. Perrini y colaboradores reportaron que la DHEA incrementa la captación de Glc en adipocitos humanos y de ratón, estimulando la translocación a la membrana plasmática de los canales de Glc (GLUT) GLUT1 y GLUT4, ambos también estimulados por la insulina³⁴⁸. Mientras que otro estudio concluyó que la administración de DHEA contrarresta el desbalance oxidativo y la generación de AGE en pacientes con DBT³⁴⁹. En el presente estudio, los pacientes muestran un descenso de los andrógenos adrenales, más evidente en DHEA-S, lo que podría contribuir a la resistencia a la insulina observada en sendos grupos de pacientes con DBT.

Del análisis de las variables inmuno-endócrino-metabólicas estudiadas se evidencio que la desregulación observada en los pacientes DBT fue aún mayor en aquellos pacientes con la comorbilidad, donde a su vez la respuesta proinflamatoria debida a la infección fue superior a la que desarrollaron los pacientes sólo con TB. La **Figura 33** da una semblanza de las alteraciones en las variables estudiadas en sendos grupos de pacientes con TB.

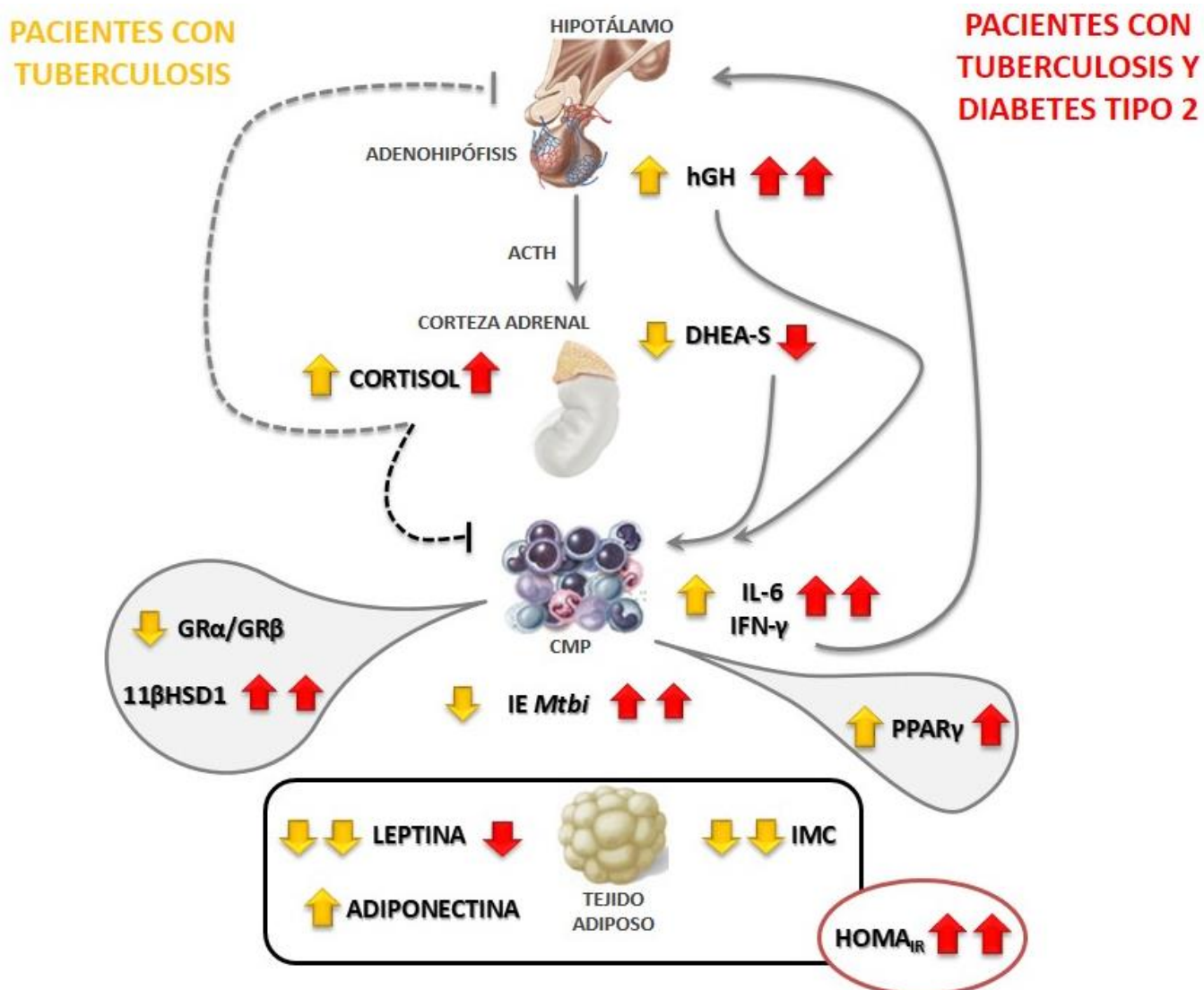


Figura 33: Alteraciones inmuno-endócrino-metabólicas en pacientes con tuberculosis (TB) y en pacientes con la comorbilidad TB-diabetes mellitus tipo 2 (TB+DBT). Las células mononucleares periféricas (CMP) de ambos grupos de pacientes responden de forma diferente frente a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtbi*). Mientras las del grupo TB tienen una baja capacidad linfoproliferativa, las del grupo TB+DBT presentan un alto índice de estimulación (IE *Mtbi*). A pesar de estas diferencias, se observan altos niveles sistémicos de citocinas proinflamatorias en ambos grupos de pacientes, y de IL-10 en TB+DBT. Las citocinas secretadas (IL-6 e IFN- γ) por los leucocitos inducen la producción de factores liberadores por parte del hipotálamo, como la hormona liberadora de corticotropina, estimulando la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) por la adenohipófisis. La ACTH estimula la esteroidogénesis adrenal, favoreciendo la liberación de cortisol, dehidroepiandrosterona (DHEA) y su forma sulfatada (DHEA-S), entre otros. Estos esteroides a su vez modulan la actividad de las células de la respuesta inmune. El cortisol inhibe la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune celular, mientras que DHEA favorece la secreción de IL-2, inmunidad celular; entre *Continuación en página siguiente.*

Continuación Figura 33.

otros. Los niveles de cortisol y DHEA-S se encuentran incrementados y disminuidos en ambos grupos de pacientes con TB, respectivamente, denotando una desregulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal. El análisis de la relación de los transcritos $GR\alpha/GR\beta$ en las CMP reiteró una posible resistencia a la acción de los GCs, ya observada en trabajos previos en los pacientes con TB. Este efecto no se observó en los pacientes con la comorbilidad, donde además se evidenció un aumento en los niveles de 11β HSD1 (enzima involucrada en la conversión cortisona-cortisol). Asimismo se constató la alteración del eje somatotrófico en el contexto de la infección, donde el incremento plasmático de la hormona de crecimiento (GH) fue aún mayor en aquellos pacientes con la comorbilidad. Las modificaciones plasmáticas de las adipocitocinas en el grupo TB mostraron un perfil orexigénico más marcado que el de los pacientes TB+DBT, donde los bajos niveles sistémicos de leptina y el incremento de los de adiponectina se acompañaron de IMC disminuidos. La expresión del transcritto PPAR γ , receptor nuclear involucrado en la modulación del metabolismo y de la respuesta inflamatoria, se vio aumentada en ambos grupos de pacientes. Las alteraciones observadas en el perfil hormonal y de citocinas debido a la infección contribuirían desfavorablemente a la insulino resistencia que presentan los pacientes con la comorbilidad: índice $HOMA_{IR}$ incrementado. Las flechas naranjas representan aumento o disminución de variables del grupo TB, mientras que las flechas rojas del grupo con la comorbilidad. Las líneas enteras y de puntos señalan estimulación o inhibición, respectivamente.

SECCIÓN DE DISCUSIÓN 2

5.2 Respuesta inmune de células mononucleares periféricas y macrófagos frente a antígenos de *Mtb* en un ambiente hiperglicémico y/o de estrés mediado por cortisol

Las células del SI innato y adaptativo deben responder rápidamente frente a la presencia de una noxa cambiando, pocas horas después de la estimulación, desde un fenotipo quiescente a un estado altamente activado. Para ello deben alterar drásticamente su metabolismo de manera de poder suplir la alta tasa de división celular así como la biosíntesis y secreción de diversas moléculas necesarias para el desarrollo de una RI efectiva contra el patógeno. Los leucocitos utilizan diversos tipos de fuente de energía (ácidos grasos, colesterol, vitaminas, oligoelementos, aminoácidos, monosacáridos) sin embargo la Glc y la glutamina son los principales sustratos metabólicos, representando el 70% de la energía utilizada³⁵⁰. En términos generales y en el caso de los LT, para la captación de la Glc es necesario que se generen señales intracelulares a partir del TCR y de moléculas coestimuladoras que participan en la activación de la vía fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K-Akt), la cual promueve tanto el tráfico hacia la membrana como la actividad del GLUT1³⁵¹. De esta forma a través de la regulación del metabolismo de la Glc se puede modular la respuesta y homeostasis de los linfocitos. Por lo tanto es evidente que el microambiente en el que se hallan inmersas las células inmunológicas condiciona su accionar.

5.2.1 Efecto del cortisol y/o glucosa sobre la respuesta inmune de las células mononucleares periféricas frente a *Mtb*

Como se ha expuesto en reiteradas ocasiones, la presencia de altos niveles de Glc en sangre está estrechamente relacionada con el deterioro de la RI que presentan los pacientes diabéticos³⁵²⁻³⁵⁵ y por consiguiente con una mayor propensión a contraer infecciones^{356,357}. Son numerosos los estudios que evalúan la inmunidad de estos pacientes frente a diversos antígenos microbianos los cuales revelan la disfuncionalidad de las células innatas y adaptativas, particularmente en aquellos sujetos con una hiperglicemia crónica (altos niveles de HbA1c): menor capacidad fagocítica de las CMP de pacientes DBT, la cual se asoció negativamente con los altos niveles de glicemia y HbA1c³⁵⁸; disminución del metabolismo oxidativo de monocitos de sangre periférica de pacientes DBT sometidos a estímulo con zimosan (vinculado a la mayor glicación de proteínas de la matriz extracelular³⁵⁹); y menor producción de IFN- γ e IL-10 por parte de las CMP de pacientes con diabetes tipo 1 y DBT (HbA1c > 11%) frente al estímulo con el mitógeno ConA respecto de pacientes con un mejor control de la patología metabólica³⁶⁰; entre

otros. Según algunos trabajos esta disfuncionalidad parecería revertir con un mejor control de la glicemia^{358,361-363} aunque no se puede obviar la evidencia reciente de que tanto la hiperglicemia transitoria como crónica inducen modificaciones epigenéticas, conocidas bajo el término de “memoria metabólica” capaz de influir sustancialmente sobre el accionar de las células inmunocompetentes^{364,365} con lo cual impedirían la restauración de la funcionalidad a pesar de haberse controlado los altos niveles de Glc sistémica.

En este estudio, el análisis de la RI frente a *Mtbi* de las CMP de los pacientes con TB+DBT mostró los mayores niveles de blastogénesis, conjuntamente con altas concentraciones de IL-2 e IFN- γ . Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Restrepo y colaboradores donde se observó un predominio del perfil Th1 en CMP de pacientes con la comorbilidad frente al estímulo con PPD¹³². Kumar y colaboradores han reportado la presencia de un perfil Th1/Th17¹³³, mientras que Stalenhoef y colaboradores no ha encontrado diferencias en los niveles de producción de IFN- γ al compararlos con los de pacientes únicamente con TB¹³⁶. Estas discordancias observadas en los distintos trabajos podrían atribuirse a variaciones en las etnias de las poblaciones en estudio, control de la DBT, condiciones experimentales, entre otras.

Respecto a las citocinas que se encontraron incrementadas en los cultivos de CMP de pacientes TB+DBT bajo el estímulo específico, la IL-2 es secretada por los LT activados, promueve la diferenciación y proliferación de las células linfoides y frente a infecciones, estimula las respuestas celulares³⁶⁶. Por cierto, en este trabajo, sus niveles se asociaron positivamente con la capacidad proliferativa frente al estímulo con *Mtb* en los grupos DBT y HCo, mientras que con IFN- γ en todos los grupos en estudio. Al respecto, recientemente Zhang R y colaboradores, realizaron una revisión sistemática y meta-análisis y han reportado la eficiencia de la inmunoterapia complementaria con IL-2 recombinante en pacientes con TB³⁶⁷. Asimismo, los altos niveles de IFN- γ producidos por las CMP estimuladas de los pacientes con la comorbilidad, concuerdan con aquellos observados a nivel sistémico. El IFN- γ es la citocina por excelencia del perfil Th1, necesaria para la erradicación del *Mtb*^{44,89}, sin embargo tiene un rol sustancial en la manifiesta respuesta inflamatoria que acompaña a la enfermedad, la cual si no es regulada a tiempo, genera daño tisular. Así la sobre expansión de la población con un perfil preferentemente del tipo Th1 podría contribuir con el mayor compromiso pulmonar que presentan los individuos diabéticos. Por otro lado es importante recordar que la presencia de la comorbilidad se ha visto asociada con una mayor frecuencia de esputo positivo al momento del diagnóstico y cuya negativización durante el tratamiento anti-TB es más tardía respecto de los

pacientes que únicamente padecen TB^{368,369}. Posiblemente la exacerbada respuesta celular sería un reflejo de la presencia de una alta carga bacilar, tal como se ha visto en un modelo de ratón con TB y DBT³⁷⁰.

Se ha demostrado que la hiperglicemia puede conducir a un estado inflamatorio mediante diversas vías³⁷¹⁻³⁷³ donde los AGEs tienen una participación activa. Estos productos, que se encuentran en demasía en los pacientes diabéticos descontrolados, promueven la inflamación no sólo activando a NF- κ B³⁷⁴ sino también uniéndose a otros mediadores inflamatorios como la proteína HMGB1 (siglas del término en inglés *high mobility group box 1*) para agravar el proceso inflamatorio^{375,376}. Por lo tanto un individuo que padece una DBT no controlada podría mostrar una mayor respuesta inflamatoria y linfoproliferativa al enfrentarse a un agente infeccioso, incrementando el daño tisular y las complicaciones relacionadas a la DBT. Por cierto en este estudio ambos grupos de pacientes con DBT presentaron los mayores IE, aunque los mismos aparecieron sólo significativamente elevados en el grupo con la comorbilidad, quien a su vez evidenció altos niveles de IL-2 e IFN- γ .

Estudios *in vitro* muestran el incremento en la secreción de citocinas inflamatorias por parte de CMP de HCo al enfrentarlas con dosis suprafisiológicas de Glc^{377,378}. Lachmandas y colaboradores fueron los primeros en reportar este efecto en CMP de HCo ante un estímulo con *Mtb*¹²⁷. Ellos observaron que las células producían mayores niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 ante el estímulo en un microambiente hiperglicémico, sin producirse cambios en los niveles de IFN- γ , IL-17A e IL-22, sugiriendo que la Glc tendría un mayor efecto sobre la funcionalidad de los monocitos¹²⁷.

En el modelo presentado en este trabajo de tesis, el estímulo específico en una situación de hiperglicemia aumentó la producción de IL-1 β aunque sólo en las células de HCo, mientras que la capacidad proliferativa específica de las CMP y los demás mediadores analizados no se vieron modificados en los distintos grupos en estudio. Las CMP son una población muy heterogénea conformada por un 70-90% de LI, 10-20% de monocitos y sólo 1-2% de CD y NK. Frente a un estímulo, estas células utilizan el sustrato energético con distintas finalidades, como por ejemplo los linfocitos principalmente para suplir la alta tasa de división celular^{351,379} mientras que los monocitos para la generación y secreción de distintos mediadores, entre otras funciones³⁸⁰. A su vez las diferentes poblaciones celulares expresan en membrana distintos tipos de GLUTs, así como cuantía, dependiendo de su estado de activación³⁸¹. Por lo tanto es importante considerar que los resultados obtenidos en este trabajo son el reflejo de la

respuesta de un conjunto heterogéneo de células, donde el consumo de Glc y mecanismos desencadenados pueden ser diversos. Además, debe tenerse en cuenta que la cuantificación de los mediadores sólo se realizó sobre una de las dosis de Glc suprafisiológicas (20mM). Con respecto a la concentración de Glc 40mM, dicho valor se presenta en raras ocasiones en pacientes con diabetes no controlada. Asimismo, en los estudios *in vitro* se debe considerar el efecto de los niveles de Glc sobre la osmolaridad del entorno celular, que más allá de incrementar el estrés oxidativo puede afectar la viabilidad³⁸²⁻³⁸⁴; aunque en el modelo utilizado, no se han evidenciado alteraciones en la viabilidad celular asociada a las dosis de Glc empleadas en los cultivos (ver ANEXO). Sumado a lo ya expresado, las discrepancias observadas en los niveles de citocinas con respecto a los trabajos presentados por otros autores podrían atribuirse al tiempo de cultivo en el que éstas fueron cuantificadas (24h de cultivo) ya que cada mediador tiene una determinada cinética de producción^{385,386}.

Estudios previos llevadas a cabo por el laboratorio han demostrado que el tratamiento con cortisol, utilizando dosis homologables de una situación de estrés agudo, tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta proliferativa específica y la síntesis de IFN- γ de CMP tanto de pacientes con TB como de HCo²⁰⁵. Dado que los pacientes con TB+DBT también presentan altos niveles sistémicos de esta hormona, se analizó su efecto *in vitro* sobre la RI en el contexto de la comorbilidad. Al igual que en los pacientes sólo con TB, una dosis elevada de cortisol inhibió la capacidad proliferativa de las CMP y la producción de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ e IL-10 en los pacientes con ambas patologías, así como en el grupo DBT y HCo. Este esteroide inhibe la producción *in vitro* de diversas citocinas proinflamatorias y características de los distintos perfiles celulares (IL-1 β , TNF- α , IL-2, L-4, IFN- γ , IL-6) mediante diversos mecanismos que involucran la represión transcripcional, alteración de la estabilidad del ARNm y modificaciones postranscripcionales³⁸⁷⁻³⁹¹. Respecto a su accionar en la modulación de mediadores antiinflamatorios existe evidencia contradictoria. Algunos estudios reportan la participación de los GC favoreciendo la síntesis de IL-10 *in vitro*^{392,393} tal como es de esperarse debido a su conocida función antiinflamatoria. Sin embargo existe evidencia del efecto inhibitorio sobre esta citocina³⁹⁴⁻³⁹⁶, tal como se observa en este trabajo. Si bien no están aclarados los mecanismo involucrados, se han identificado sitios GRE putativos en la región no codificante para el gen de IL-10 en ratón y en humano³⁹⁷ sugiriendo una posible regulación directa. Por otro lado se podría especular acerca de una regulación indirecta como consecuencia del efecto inhibitorio sobre citocinas como TNF- α e IFN- γ , las cuales inducen la producción de IL-10³⁹⁸.

Es interesante resaltar, que a pesar del efecto inhibitorio del cortisol, éste no fue suficiente para contrarrestar la importante respuesta celular específica observada en los pacientes con la comorbilidad.

Como se ha expuesto en reiteradas ocasiones, cuando el SI se activa aumenta considerablemente el consumo de Glc y los GC contribuyen a una mayor disponibilidad de este sustrato a través de la generación de resistencia a la insulina en los órganos periféricos. En los leucocitos la insulina es importante para la captación de Glc, activación y síntesis de citocinas. Por otra parte, la participación del GC en el metabolismo de la Glc a nivel hepático, muscular y del tejido adiposo es ampliamente conocida, mientras que en el caso de las células del SI poco se sabe al respecto. Un estudio realizado en linfocitos de rata reportó que los GC no modifican el metabolismo de la Glc y la glutamina sin embargo inhiben la utilización del piruvato en un 40%³⁹⁹. Dado que el piruvato es esencial como combustible y como precursor del metabolismo lipídico en estas células, este hallazgo podría explicar en parte su efecto inhibitorio. En estudios más recientes se ha demostrado que los GC inhibirían la vía PI3K-Akt que, como se explicitó al inicio de la sección, es una forma importante para la captación y utilización de la Glc por los linfocitos⁴⁰⁰⁻⁴⁰². A pesar de que se han analizado ampliamente los efectos de la Glc y el cortisol sobre la RI, su efecto conjunto sobre CMP no había sido estudiado hasta el momento. En el modelo *in vitro* presentado, las altas dosis de Glc utilizadas no modificaron el efecto inhibitorio inducido por el cortisol sobre la capacidad de respuesta de las CMP de los distintos grupos en estudio.

Más allá de los resultados obtenidos, y como ya se comentó, existe una vasta evidencia a favor que la desregulación del metabolismo de la Glc participa en el proceso de modulación epigenética que altera la expresión de una importante cantidad de genes en distintos tipos de células^{364,403}. Las células inmunes de los pacientes DBT experimentan hiperglicemias y por lo tanto estarían pre-condicionadas y podrían tener un perfil de expresión génica diferente capaz de alterar su funcionalidad. Por su parte los GC también inducen cambios epigenéticos^{404,405}. En este trabajo el grupo de pacientes DBT no mostró niveles de cortisol plasmáticos incrementados sin embargo diversos estudios hablan de la presencia de hipercortisolemia en los pacientes con DBT, por lo que no se puede descartar el efecto de este esteroide, al igual que el de la Glc, en la reprogramación epigenética.

Es de mencionar que un muy bajo porcentaje de los individuos TB+DBT refirió haber sido vacunado con BCG. De acuerdo con un estudio *in vitro* llevado a cabo recientemente por

Bhavanam y colaboradores, las CMP de los pacientes vacunados y no vacunados con BCG tendrían una RI específica diferencial frente a *Mtb*. Así los cultivos de CMP infectadas de los pacientes sin vacunar presentaban una mayor cantidad de unidades formadoras de colonias, incremento de citocinas Th1 y Th2, aumento del porcentaje de LT naive activados y efectores de memoria activados y disminución del de LT efectores de memoria central activados respecto de pacientes vacunados⁴⁰⁶. A pesar de ello, en este estudio no se observaron diferencias en las variables analizadas entre aquellos pacientes TB+DBT vacunados y no vacunados (datos no mostrados).

5.2.2 Efecto del cortisol y la glucosa sobre la respuesta inducida por *Mtb* en macrófagos derivados de la línea celular THP1

El M ϕ alveolar es la célula “target” del *Mtb* y de acuerdo a la inmunocompetencia del hospedero es esencial tanto para la contención como para la eliminación de la micobacteria^{35,44}. Sin embargo, una de las razones por las que este patógeno es exitoso es debido a su capacidad de sobrevivir dentro de estas células, más allá de los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa que se puedan desarrollar. El *Mtb* ha evolucionado de manera tal de poder evadir no sólo la maduración del fagosoma⁴⁵ y la fusión fagolisosomal⁴⁵, sino también de tolerar el ambiente ácido^{407,408}, modular la producción de citocinas para beneficio propio^{409,410} e inducir muerte por necrosis favoreciendo su propagación hacia otras células⁴⁶.

Uno de los mecanismos involucrados en la infección con *Mtb* que ha tomado relevancia en los últimos años consiste en la inducción de la expresión del receptor PPAR γ , el que favorecería la formación de gotas lipídicas dentro del M ϕ y la generación de un fenotipo permisivo para la micobacteria^{411–413}. A su vez, recientemente, Arnett y colaboradores han demostrado que PPAR γ , mediante la inducción de la proteína antiapoptótica Mcl-1, inhibe la apoptosis de los M ϕ infectados con *Mtb*⁴¹⁴, mientras que Guirado y colaboradores han reportado que la delección de este receptor en M ϕ murinos promueve una respuesta inmunoprotectora frente a la infección con *Mtb*⁴¹⁵. Contrariamente a lo expuesto para PPAR γ , un estudio reciente realizado en ratones ha demostrado que el subtipo PPAR α tiene un rol beneficioso en la defensa innata del huésped frente a la micobacteria, a través de la activación de la expresión de genes involucrados en la formación y función de los autofagosomas y lisosomas, disminuyendo además la excesiva respuesta inflamatoria, inhibiendo la formación de gotas lipídicas y a su vez favoreciendo el catabolismo de lípidos⁴¹⁶. Más allá de la homología que presentan estos subtipos de receptores es evidente que su función sobre los M ϕ difiere considerablemente.

El modelo *in vitro* propuesto utilizando la línea celular pro monocítica humana THP-1 permitió analizar los efectos moduladores de los altos niveles de Glc y cortisol sobre la expresión de PPAR α y PPAR γ en M ϕ expuestos a *Mtb* así como su relación con la producción de mediadores pro y antiinflamatorios. Así pudo observarse que el estímulo específico incrementó considerablemente los niveles de expresión de PPAR α en los M ϕ , para todas las dosis de Glc, acorde con un reporte previo⁴¹⁶, sin embargo este aumento (2.5 veces) no se vio reflejado en el descenso de mediadores proinflamatorios, por el contrario, aumentaron los niveles de IL-1 β e IL-6 así como los de la citocina antiinflamatoria IL-10. Sorprendentemente no se evidenció un aumento significativo en el transcripto de PPAR γ , a excepción del tratamiento con la mayor dosis de Glc (40mM), aunque se observó una asociación positiva entre altas dosis de Glc y la expresión de este FT. Con respecto al rol de PPAR γ en el contexto de la infección, se ha demostrado que tanto PPAR γ como Akt son necesarios para el reclutamiento de los canales GLUT1 y GLUT3 en la membrana de los M ϕ lo que permite una mayor incorporación de Glc no sólo para suplir la demanda energética sino también para sintetizar cuerpos cetónicos para una mayor acumulación de lípidos⁴¹⁷. La asociación observada entre los niveles elevados de Glc y PPAR γ y el incremento significativo del transcripto para la dosis de Glc 40mM, que eventualmente facilitaría un mayor ingreso de Glc a la célula, permitiría especular sobre mecanismos de retroalimentación positiva contribuyentes a la generación de un microambiente celular favorable para el desarrollo bacteriano.

Por otro lado, la hiperglicemia moderada favoreció la producción de mediadores proinflamatorios (excepto para la dosis 40mM) mientras que disminuyó la concneciente a la citocina antiinflamatoria IL-10. Tanto la IL-1 β como la IL-6 son citocinas con una participación relevante en la RI anti-TB temprana. Ratones doble knockout para IL-1 β y su receptor IL-1R son altamente susceptibles a la infección aérea con baja carga de *Mtb* y mueren más rápidamente que los ratones knockout para IFN- γ , IFN γ R y TNF- α , a pesar de encontrarse altos niveles de estos mediadores en sus pulmones^{418,419}. La IL-1 β activa a los M ϕ infectados con *Mtb* para restringir la replicación intracelular, las bases moleculares apuntan al aumento en la transcripción y secreción de TNF- α , una mayor expresión del receptor de TNF- α , TNFR1 en la superficie celular y la activación de la caspasa-3, promoviendo de esta forma, la apoptosis del fagocito⁴²⁰. Respecto a la IL-6, las investigaciones en animales y humanos, señalan una participación importante en la infección con *Mtb* potenciando la RI temprana en el sitio de la lesión, regulando la inflamación por parte de las células mononucleares y la rápida acumulación de linfocitos^{95,421}.

La síntesis de IL-1 β e IL-6 se incrementa ante la activación de diversos FT, entre ellos NF-kB y diversos estudios han reportado que la actividad de este FT es regulada por los niveles de Glc⁴²²⁻⁴²⁴. Para el caso de la IL-1 β se debe considerar que esta citocina es sintetizada como pro-IL-1 β debiendo sufrir un clivaje por parte de la caspasa-1 para transformarse en su forma activa y ser secretada. Esto puede suceder a nivel citoplasmático, a través del compartimiento secretorio lisosomal o bajo la formación del complejo multiproteico conocido como inflamasoma. Un estudio muy reciente ha demostrado que la Glc sería un factor importante para la maduración de IL-1 β mediante la activación de la vía del inflamasoma en M ϕ murinos sometidos a un microambiente tumoral⁴²⁵. Ante toda esta información es evidente que los altos niveles de Glc regularían la producción de las citocinas proinflamatorias mediante diversos mecanismos.

Por su parte y como fuera referido, la IL-10 es una citocina antiinflamatoria caracterizada por su habilidad para inhibir la activación de los M ϕ . Es secretada por estas células frente a las infecciones micobacterianas⁴²⁶ y se ha demostrado que arresta la maduración de los fagosomas frente a la infección con *Mtb* en parte, mediante la activación de STAT3¹⁰¹. A pesar de que los niveles de IL-10 se encontraron considerablemente incrementados frente al estímulo, el tratamiento con Glc moduló negativamente su producción. Resultados que se condicen con un trabajo realizado por Torres-Castro y colaboradores quienes demostraron que los altos niveles de Glc favorecen el perfil M1 en M ϕ humanos, presentando un aumento del marcador CD11c y de la iNOS, conjuntamente con una reducción en los niveles de Arg-1 e IL-10⁴²⁷. Asimismo, dichos autores, observaron resultados similares al analizar monocitos circulantes de pacientes con hiperglicemia⁴²⁷. Sumado a lo anterior, Barry JC y colaboradores han demostrado que tanto la DBT *in vivo*, como la hiperglicemia *in vitro* están relacionadas con la disminución de la función de la IL-10, mediante la reducción de la transducción de señales que involucra a STAT3⁴²⁸.

La producción de IL-10 en M ϕ es regulada por diversos FT, entre los que se destacan p38, NF-kB, ERK, Stat1 y FoxO1⁴²⁹. Particularmente el regulador FoxO1, perteneciente a la familia de reguladores *Forkhead box protein O*, tiene funciones sobre el crecimiento, metabolismo y sobrevivencia de las células así como sobre la inflamación^{430,431}. Un estudio ha demostrado que los M ϕ ante un microambiente hiperglicémico y estimulados con LPS, desarrollarían un perfil proinflamatorio, en parte a través de la atenuación de FoxO1 y generando por consiguiente, una disminución en los niveles de IL-10⁴³². Un mecanismo similar podría estar participando en el modelo presentado en este trabajo.

El tratamiento con cortisol permitió elucidar roles diferentes de este esteroide sobre la regulación de los 2 subtipos de PPARs analizados en M ϕ expuestos a *Mtb*. Mientras que aumentó notablemente los niveles de expresión de PPAR γ de manera dosis dependiente y asociados positivamente al incremento de Glc, disminuyó los de PPAR α . En el contexto de la infección con *Mtb*, se ha demostrado recientemente un efecto inhibitorio de los GC sobre la autofagia y la producción de NO en M ϕ , a través de la activación de la vía Akt/mTOR (mTOR es regulador maestro negativo de la autofagia) y mediante la represión de los genes relacionados a la autofagia o ATGs (del inglés *autophagy-related genes*)⁴³³. En relación con lo expuesto, el descenso de PPAR α generado por un microambiente con dosis elevadas de cortisol también podría contribuir a la inhibición de la autofagia.

Asimismo, estudios realizados por el grupo de investigación, han demostrado la inhibición de la fagocitosis como consecuencia del tratamiento con cortisol (dosis 1 μ M) en cultivos de M ϕ infectados con *Mtb*⁴³⁴, hecho que fue revertido por el tratamiento con DHEA (dosis 0,1 y 1 μ M). Por otro lado, Olivares-Morales y colaboradores reportaron el rol perjudicial de la dexametasona durante la infección con *E. coli* en pacientes con enfermedad de Crohn, al impedir la fagocitosis y promover la respuesta antiinflamatoria, contribuyendo a la sobrevida de la bacteria⁴³⁵. La inhibición de la fagocitosis y la respuesta antiinflamatoria inducida por altas dosis de cortisol, sumada al incremento de PPAR γ , que además de contribuir al proceso antiinflamatorio, favorece la generación de lípidos intracelulares y la inhibición de la apoptosis, como así también el descenso de PPAR α asociado a la inhibición de la autofagia, en su conjunto daría lugar a un fenotipo de M ϕ permisivo para la micobacteria.

Lo expresado permite hipotetizar sobre la participación de los GCs, como reguladores negativos de la RI innata anti-TB, donde la modulación de los PPARs tendría una participación relevante. En este contexto, las altas concentraciones de Glc, que se encontraron asociadas positivamente con el incremento en la expresión de PPAR γ , exacerbarían esta desregulación ejercida por las elevadas concentraciones de cortisol.

A su vez el efecto de este esteroide sobre los mediadores pro y antiinflamatorios en M ϕ expuestos a *Mtb* había sido reportado previamente por el laboratorio⁴³⁴, sin embargo se desconocía el efecto conjunto de altas dosis de Glc y cortisol sobre estos mediadores. El efecto inhibitorio de la hormona se vio potenciado con el incremento de Glc en el medio, disminuyendo los niveles de IL-1 β e IL-10. El hecho de que los niveles de estos mediadores se encontraron asociados negativamente con el aumento de los niveles de expresión de PPAR γ en los tratamientos con cortisol y concentraciones crecientes de Glc, plantea una posible

participación de este receptor en la modulación ejercida por los GCs sobre los M ϕ en el contexto de la RI anti-TB temprana.

En síntesis, ante el estímulo con *Mtb* se ve un marcado incremento de citocinas pro y antiinflamatoria, donde el aumento de concentraciones moderadas de Glc favorecerían aún más la producción de IL-1 β e IL-6 y disminuirían la de IL-10, sugiriendo la inducción de un M ϕ no permisivo para el *Mtb*. En una situación de estrés con incrementos de cortisol, éste generaría una acción inhibitoria sobre la producción de citocinas pro y antiinflamatoria para las distintas dosis de Glc utilizadas, con incremento de PPAR γ asociado positivamente a los altos niveles de Glc y negativamente a los niveles de IL-1 β e IL-10, sugerente de que el efecto proinflamatorio modulado por la Glc se vería inhibido por el cortisol donde el PPAR γ jugaría un rol sustancial en la inducción de un fenotipo macrofágico permisivo ante la infección con *Mtb* (**Figura 34**).

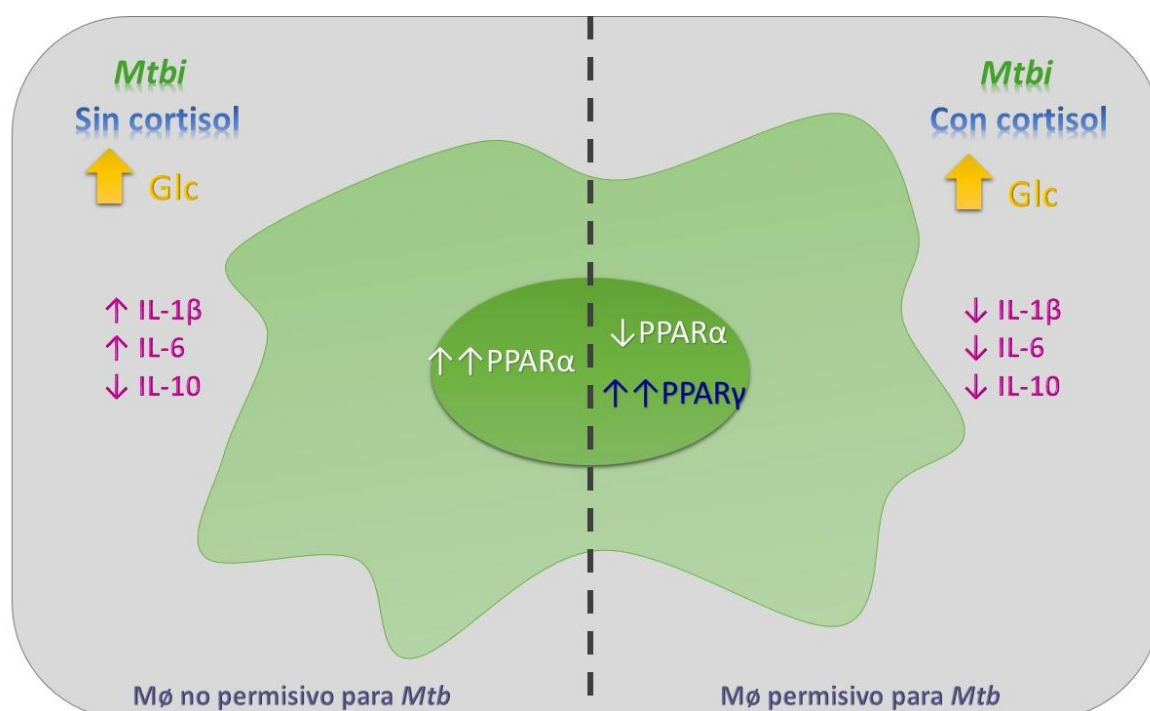


Figura 34: Efecto de altas dosis de glucosa (Glc) y cortisol sobre la expresión de PPARs y los niveles de citocinas en macrófagos (M ϕ) estimulados con antígenos de *Mtb* (*Mtbi*). Ante el estímulo específico los M ϕ secretan grandes cantidades de IL-1 β , IL-6 e IL-10 y aumenta la expresión de PPAR α . En un ambiente hiperglicémico se incrementan aún mas la secreción de IL-1 β e IL-6 con descenso de IL-10. Se estaría frente un M ϕ no permisivo para el desarrollo micobacteriano. El tratamiento con cortisol (simulando una situación de estrés) conjuntamente con elevadas dosis de Glc, disminuyen los niveles de las citocinas pro y antiinflamatorias con modificaciones de los transcritos PPAR α y PPAR γ , descenso del primero e incremento del segundo. Ello induciría la generación de un perfil macrofágico permisivo para el *Mtb*. **PPAR:** Receptores Activados por Factores de Proliferación Peroxisomal.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

- Al igual que los pacientes únicamente con TB, aquellos con la comorbilidad presentaron una importante respuesta inflamatoria, pero con mayores niveles de IFN- γ , la cual podría estar relacionada con un sesgo Th1 favorecedor de la RI celular, sumado a la correlación positiva y significativa de esta citocina con el porcentaje de LT CD4+.
- Se puso de manifiesto una marcada diferencia de la capacidad funcional linfocitaria entre ambos grupos de pacientes con TB. A pesar de que el porcentaje de linfocitos se encontró disminuido en sendos grupos de pacientes, las CMP de TB+DBT presentaron una incrementada respuesta blastogénica frente a antígenos de *Mtb*, mientras que las del grupo TB apareció disminuida y correlacionada negativamente con los niveles de IL-10. Así, a diferencia de lo ya observado en los pacientes sólo con TB, durante la comorbilidad tal inhibición de la blastogénesis no se produciría; aunque no puede inferirse que lo observado a nivel periférico sea representativo de la RI local.
- El aumento de los niveles sistémicos de IL-10 de los pacientes con la comorbilidad respecto de HCo estaría indicando la presencia de mecanismos contrarregulatorios intrínsecos de la RI, en cierta manera asociado al incremento en los niveles de IFN- γ .
- Las mayores concentraciones de IL-10 plasmáticas de los enfermos TB+DBT, llamativamente también se observaron en voluntarios sólo con DBT, sin modificaciones en los niveles de citocinas proinflamatorias, si bien marcadores inflamatorios como CRP y ERS se encontraron aumentados. La producción incrementada de IL-10 podría contribuir al riesgo de contraer TB en este tipo de pacientes.
- El incremento del transcritto de PPAR γ en los pacientes con la comorbilidad, que a su vez mostró una correlación positiva y negativa con las concentraciones de IL-10 y capacidad blastogénica, respectivamente, podría formar parte de un mecanismo contrarregulatorio de la notoria respuesta inflamatoria y proliferativa de estos pacientes.
- Por primera vez se ofrecen datos sobre la desregulación del eje HPA en pacientes TB+DBT, puesto de manifiesto por un incremento de los niveles sistémicos de cortisol y disminución de los de DHEA-S. Con respecto al cortisol, el aumento observado no acordaría con la gran respuesta inflamatoria desencadenada por este tipo de patógeno, revelando cierto grado de disfunción del eje HPA. Esta alteración también se pondría de manifiesto con el

incremento de la relación Cort/DHEA-S de los pacientes con TB+DBT. Es importante mencionar que los sujetos sólo con DBT ya muestran disfunción del eje HPA dado el aumento en la relación Cort/DHEA-S.

- A lo ya demostrado por el laboratorio respecto de una alteración en la expresión de las isoformas del GR en los pacientes con TB, y una probable resistencia a la acción biológica de los GC; los pacientes TB+DBT no evidenciarían esta anomalía ya que la relación GR α /GR β correspondió a la de los respectivos grupos controles. Se aportaron nuevos hallazgos respecto al incremento en la expresión del transcrito 11 β HSD1 en los pacientes que presentaron sólo DBT. Este incremento se mantuvo en los pacientes con la comorbilidad. Sugiriendo una mayor disponibilidad de cortisol a nivel tisular en los pacientes diabéticos, tal vez tendiente a contrarrestar el proceso inflamatorio subyacente.
- El mayor incremento sistémico de GH en los pacientes con TB+DBT contribuiría a la acción del cortisol en la reasignación de las reservas energéticas hacia el SI y a su vez, favorecería la RI celular.
- Del análisis de las variables inmuno-endócrino-metabólicas estudiadas se evidenció que la desregulación observada en los pacientes DBT fue aún mayor en aquellos pacientes con la comorbilidad, donde a su vez la respuesta proinflamatoria debida a la infección fue superior a la que desarrollaron los pacientes sólo con TB (ver **Figura 33**).

Respecto a los efectos moduladores de Glc y/o cortisol sobre CMP provenientes de los distintos grupos en estudio:

- En todos los grupos de pacientes, diabéticos o no, las dosis suprafisiológicas de Glc no modificaron la capacidad de respuesta de las CMP frente a *Mtb*. Sólo en el caso de CMP de HCo se evidenció un incremento en la respuesta proinflamatoria (IL-1 β) atribuible a la Glc.
- Las altas dosis de Glc utilizadas no modificaron el efecto inhibitorio inducido por el cortisol sobre la capacidad de respuesta de las CMP de los distintos grupos en estudio.
- Las CMP provenientes de pacientes con TB+DBT parecen mostrar una respuesta exacerbada contra antígenos de *Mtb*, con sesgo Th1 aún ante dosis de cortisol inhibitorias, la que no se vería alterada por la presencia de altas concentraciones de Glc.

Respecto a los efectos moduladores de Glc y/o cortisol sobre M ϕ :

- Ante el estímulo con *Mtb*, dosis moderadas de Glc incrementan la producción de citocinas proinflamatorias mientras que disminuyen la de IL-10, sugiriendo la inducción de un M ϕ no permisivo para la micobacteria, con altos niveles transcripcionales de PPAR α .
- Niveles elevados de Glc favorecen la expresión de PPAR γ en M ϕ estimulados con *Mtb*.
- El cortisol generaría una acción inhibitoria sobre la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, así como del transcripto PPAR α , para las distintas dosis de Glc utilizadas, con incremento de PPAR γ asociado positivamente a los altos niveles de Glc y negativamente a los niveles de IL-1 β e IL-10. Es así que ante un microambiente hiperglicémico y de estrés mediado por cortisol se induciría un fenotipo de M ϕ permisivo para la micobacteria (ver **Figura 34**).

RESUMEN

La comorbilidad TB-DBT ha tomado gran relevancia en las últimas décadas debido al notorio aumento de la población diabética, con los mayores incrementos en los países de bajos y medianos recursos donde la TB es prevalente. Ambas patologías presentan, en sí mismas, alteraciones en la comunicación bidireccional entre el SI y el neuroendocrino con una importante repercusión en el componente metabólico. A fin de profundizar los conocimientos sobre los procesos fisiopatológicos que subyacen en la asociación entre TB-DBT se analizó el perfil inmuno-endócrino-metabólico y componentes relacionados con el accionar de los GCs y del metabolismo (PPARs) en pacientes con la comorbilidad y se lo comparó con el de voluntarios enfermos de TB, con pacientes DBT y HCo. A partir de muestras de sangre se analizaron, además de diversos parámetros del laboratorio clínico, los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatoria y antiinflamatorias (IL-6, IFN- γ , IL10), cortisol, DHEA y DHEA-S, GH, prolactina, leptina, adiponectina. Se analizó la capacidad blastogénica específica de las CMP y se cuantificaron, en estas células, los transcriptos GR α y GR β , 11 β HSD1 y 11 β HSD2, así como PPAR α y PPAR γ . Todos los pacientes con TB mostraron niveles aumentados de cortisol, GH y mediadores proinflamatorios respecto de HCo, así como del transcripto PPAR γ . A su vez, los TB+DBT tuvieron incluso más aumento que los pacientes con TB en los niveles de IFN- γ y GH, y de DBT en los de IL-6, CRP, cortisol, GH y PPAR γ , mientras que IL-10 se vio incrementada tanto en TB+DBT como en DBT. Los niveles de DHEA-S se vieron descendidos en todos los grupos de pacientes difiriendo además TB+DBT de DBT. La leptina se vio descendida en sendos grupos con TB, más aún en los pacientes sin la comorbilidad que a su vez presentaron los menores índices de masa corporal. Contrariamente a lo observado en TB, las CMP de TB+DBT presentaron una alta capacidad proliferativa difiriendo tanto de HCo como de TB. El análisis de los efectos del cortisol y dosis suprafisiológicas de Glc sobre la respuesta celular de los distintos voluntarios evidenció que las CMP de pacientes con TB+DBT mostrarían una respuesta exacerbada contra antígenos de *Mtb*, respecto de TB, DBT y HCo, con sesgo Th1 (incremento de IL-2 e IFN- γ) aún ante dosis de cortisol inhibitorias (1 μ M) y no se vería alterada por la presencia de altas concentraciones de Glc. Las CMP de estos pacientes, a diferencia de lo observado en aquellos que sólo padecen de TB, no mostraron alteración de la relación entre las isoformas del receptor para GCs y a su vez, presentarían mayor disponibilidad de cortisol ante el aumento del transcripto 11 β HSD1 constatado en las células de estos pacientes. Sin embargo esta potencial acción inhibitoria, en el contexto del desbalance inmuno-endócrino-metabólico que presentan los pacientes con la comorbilidad, no lograría apagar la exacerbada respuesta. En su conjunto, el análisis de las variables inmuno-endócrino-metabólicas estudiadas evidencio que la disregulación observada en los pacientes DBT fue aún mayor en aquellos pacientes con la comorbilidad, donde a su vez la respuesta proinflamatoria debida a la infección fue superior a la que desarrollaron los pacientes sólo con TB.

A su vez, se estudió el efecto de altos niveles de Glc y/o de cortisol sobre la RI innata (M ϕ) frente a *Mtb*. Los resultados mostraron que el aumento de concentraciones moderadas de Glc favorecería aún más la producción de IL-1 β e IL-6 y disminuirían la de IL-10, sugiriendo la inducción de un M ϕ no permisivo para el *Mtb*. En una situación de estrés con incrementos de cortisol, éste generaría una acción inhibitoria sobre la producción de citocinas pro y antiinflamatorias para las distintas dosis de Glc utilizadas, con incremento de PPAR γ asociado positivamente a los altos niveles de Glc y negativamente a los niveles de IL-1 β e IL-10, sugerente de que el efecto proinflamatorio modulado por la Glc se vería inhibido por el cortisol donde el PPAR γ jugaría un rol sustancial en la inducción de un fenotipo macrofágico permisivo ante la infección con *Mtb*.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Ankrah AO, Glaudemans AWJM, Maes A, et al. Tuberculosis. *Semin Nucl Med.* 2018;48(2):108-130.
2. Organización Mundial de la Salud. Global tuberculosis report. 2018.
3. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín sobre Tuberculosis en la Argentina N°1-Año I. *Argentina*, 2018.
4. Pan SC, Ku CC, Kao D, et al. Effect of diabetes on tuberculosis control in 13 countries with high tuberculosis: A modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(5):323-330. doi:10.1016/S2213-8587(15)00042-X.
5. Leung CC, Lam TH, Chan WM, et al. Original Contribution Diabetic Control and Risk of Tuberculosis: A Cohort Study. *Am J Epidemiol.* 2008;167(12):1486-1494.
6. Baker MA, Lin H-H, Chang H-Y, et al. The Risk of Tuberculosis Disease Among Persons With Diabetes Mellitus: A Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 2012;54(6):818-825.
7. Kuo M-C, Lin S-H, Lin C-H, et al. Type 2 Diabetes : An Independent Risk Factor for Tuberculosis: A Nationwide Population-Based Study. *PLoS One.* 2013;8(11):e78924.
8. Federación Internacional de Diabetes. Diabetes Atlas. *Diabetes Atlas.* Vol 8. 2017.
9. Dooley KE, Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(12):737-746.
10. Lönnroth K, Williams BG, Cegielski P, et al. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):149-155.
11. Stevenson CR, Forouhi NG, Roglic G, et al. Diabetes and tuberculosis: the impact of the diabetes epidemic on tuberculosis incidence. *BMC Public Health.* 2007;7:234. doi:10.1186/1471-2458-7-234.
12. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med.* 2008;5(7):1091-1101.
13. Root HF. The Association of Diabetes and Tuberculosis. *N Engl J Med.* 1934;210(3):127-147.
14. Boucot KR, Dillon ES, Cooper DA, et al. Tuberculosis among diabetics: the Philadelphia survey. *Am Rev Tuberc.* 1952;65(1:2):1-50.
15. Heemskerck D, Caws M, Marais B et al. Tuberculosis in Adults and Children. *SpringerBriefs in Public Health.* 2015.
16. Abdelbary BE, Garcia-Viveros M, Ramirez-Oropesa H, et al. Tuberculosis-diabetes epidemiology in the border and non-border regions of Tamaulipas, Mexico. *Tuberculosis.* 2016;101:S124-S134.
17. Ministerio de Salud. Enfermedades infecciosas. Tuberculosis. Diagnóstico de Tuberculosis. Guía para el equipo de salud. 2da edición. CABA, Argentina; 2014.
18. Pérez del Molino ML, Tuñez Bastida V, García Ramos MR, et al. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. *Med Integr.* 2002;39(5):207-215.
19. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet.* 2011;377(9776):1495-1505.
20. Syed B, Kabeer A, Raman B, et al. Role of Quantiferon-TB Gold, Interferon Gamma Inducible Protein-10 and Tuberculin Skin Test in Active Tuberculosis Diagnosis. *PLoS One.* 2010;5(2):e9051.
21. Jung JY, Lim JE, Lee H, et al. Questionable role of interferon- γ assays for smear-negative pulmonary TB in immunocompromised patients. *J Infect.* 2012;64(2):188-196.
22. Ministerio de Salud. Enfermedades infecciosas-Tuberculosis. Guía para el equipo de salud. CABA, Argentina, 2009.
23. Baker MA, Harries AD, Jeon CY, et al. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review. *BMC Med* 2011;9:81.
24. Babalik A, Ulus IH, Bakirci N, et al. Plasma Concentrations of Isoniazid and Rifampin Are Decreased in Adult Pulmonary Tuberculosis Patients with Diabetes Mellitus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5740-5742.
25. Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):111-115.
26. Wang CS, Yang CJ, Chen HC, et al. Impact of type 2 diabetes on manifestations and treatment outcome of pulmonary tuberculosis. *Epidemiol Infect.* 2009;137(2):203.
27. Ehlers S, Schaible UE, Boros DL. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol.* 2013;3:411.
28. Silva Miranda M, Breiman A, Allain S, et al. The tuberculous granuloma: An unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:139127.
29. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jörg S, et al. Differential Organization of the Local Immune Response in Patients with Active Cavitary Tuberculosis or with Nonprogressive Tuberculoma. *J Infect Dis.* 2005;192:89-97.

30. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, et al. Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. *Nat Immunol*. 2009; 10(9): 943–948.
31. Sugawara I, Udagawa T, Yamada H. Rat neutrophils prevent the development of Tuberculosis. *Infect Immun*. 2004;72(3):1804-1806.
32. Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, et al. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol*. 2003;170:3273-3278.
33. Feng CG, Kaviratne M, Gigliotti Rothfuchs A, et al. NK cell-derived IFN- γ differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2006;177:7086-7093.
34. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(9):578-590.
35. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2015;17(9):1277-1285.
36. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(12):963-975.
37. Hossain MM, Norazmi M-N. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection—The Double-Edged Sword? *Biomed Res Int*. 2013;18.
38. Faridoghar M, Nikouejad H. New findings of Toll-like receptors involved in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Pathog Glob Health*. 2017;111(5):1-9.
39. Kleinnijenhuis J, Joosten LAB, van de Veerdonk FL, et al. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 2009;39(7):1914-1922.
40. Juárez E, Carranza C, Hernández-Sánchez F, et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Eur J Immunol*. 2012;42(4):880-889.
41. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, et al. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:12.
42. Dorhoi A, Kaufmann SHE. Perspectives on host adaptation in response to *Mycobacterium tuberculosis*: Modulation of inflammation. *Semin Immunol*. 2014;26(6):533-542.
43. Quesniaux VFJ, Fallon PG, Suzuki H, et al. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2010;184:7057-7070.
44. Scriba TJ, Coussens AK, Fletcher HA. Human Immunology of Tuberculosis. *Microbiol Spectr*. 2016;4(4):1-23.
45. Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, et al. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*. 2008;14(8):849-854.
46. Amaral EP, Lasunskaja EB, D'Império-Lima MR. Innate immunity in tuberculosis: How the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes Infect*. 2016;18(1):11-20.
47. Chun RF, Adams JS, Hewison M. Immunomodulation by vitamin D: implications for TB. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011; 4(5): 583–591.
48. Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci*. 2017;188:53-67.
49. Jo EK. Autophagy as an innate defense against mycobacteria. *Pathog Dis*. 2013;67(2):108-118.
50. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog*. 2008;4(11):1-14.
51. Lay G, Poquet Y, Salek-Peyron P, et al. Langhans giant cells from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *J Pathol*. 2007;211(1):76-85.
52. Mihret A. The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence*. 2012; 3(7): 654–659.
53. Cooper AM. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422.
54. Gupta N, Kumar R, Agrawal B. New players in immunity to tuberculosis: The host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells. *Front Immunol*. 2018;9(APR):1-10.
55. Seok-Yong E, Ji-Hye K, Min-Sun H, et al. Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients With Active Pulmonary TB. *Chest*. 2010;137(1):122-128.
56. Warren E, Teskey G, Venketaraman V. Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Clin Med*. 2017;6(2):15.
57. Morris D, Nguyen T, Kim J, et al. An elucidation of neutrophil functions against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:959650.
58. Hilda JN, Narasimhan M, Das SD. Neutrophils from pulmonary tuberculosis patients show augmented levels of chemokines MIP-1 α , IL-8 and MCP-1 which further increase upon in vitro infection with mycobacterial strains. *Hum Immunol*. 2014;75(8):914-922.
59. Dallenga T, Schaible UE. Neutrophils in tuberculosis—first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? 2016;74.
60. Yoneda T, Ellner JJ. CD4 T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(2):395-403.

61. Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, et al. Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce Interferon- γ , and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog.* 2008;4(12):1000239.
62. Wu C, Li Z, Fu X, et al. Antigen-specific human NKT cells from tuberculosis patients produce IL-21 to help B cells for the production of immunoglobulins. *Oncotarget.* 2015;6(30):28633-28645.
63. Li Z, Yang B, Zhang Y, et al. Mycobacterium tuberculosis-specific memory NKT cells in patients with tuberculous pleurisy. *J Clin Immunol.* 2014;34(8):979-990.
64. Shen Y, Zhou D, Qiu L, et al. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science.* 2002;295(5563):2255-2258.
65. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *J Infect Dis.* 2001;184(8):1082-1085.
66. Martino A, Meraviglia S, El Daker S, et al. $\gamma\delta$ T cells cross-link innate and adaptive immunity in mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011.
67. Steigler P, Daniels NJ, McCulloch TR, et al. BCG vaccination drives accumulation and effector function of innate lymphoid cells in murine lungs. *Immunol Cell Biol.* 2018;96(4):379-389.
68. Wellman A. The modulation of innate lymphoid cells in tuberculosis and HIV co-infection. *Poster Sess Present TB Co-morbidities Keystone Symp Host Response Tuberc St Fe, NM, USA.* 2015.
69. Chan J, Mehta S, Bharrhan S, et al. The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunol.* 2014;26(6):588-600.
70. Cooper AM. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393-422.
71. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, et al. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83(1-3):98-106.
72. Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. The cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology T cells: a central component of immunity to mycobacteria.
73. He XY, Xiao L, Chen HB, et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(6):643-650.
74. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;7(1):353-384.
75. Torres M, Mendez Sampeiro P, Jimenez Zamudio L, et al. Comparison of the immune response against Mycobacterium tuberculosis antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:7578.
76. Dlugovitzky D, Torres-morales A, Rateni L, et al. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. 1997;18:203-207.
77. Lyadova IV, Panteleev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
78. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(7):803-810.
79. Diaz A, Santucci N, Bongiovanni B, et al. Increased frequency of CD4+ CD25+ FoxP3+ T regulatory cells in pulmonary tuberculosis patients undergoing specific treatment and its relationship with their immune-endocrine profile. *J Immunol Res.* 2015;2015:985302.
80. Lim H-J, Park JS, Cho Y-J, et al. CD4+FoxP3+ T regulatory cells in drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *Tuberculosis.* 2013;93(5):523-528.
81. Ferraz JC, Melo FBS, Albuquerque MFPM, et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(11).
82. Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, et al. CD4+ and CD8+ T Cells Kill Intracellular Mycobacterium tuberculosis by a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism. *J Immunol.* 2001;167(5):2734-2742.
83. Lazarevic V, Nolt D, Flynn JL. Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis Infection Is Mediated by Dynamic Immune Responses. *J Immunol Ref.* 2018;175:1107-1117.
84. Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunol Rev.* 2015;264(1):167-181.
85. du Plessis WJ, Walzl G, Loxton AG. B cells as multi-functional players during Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Tuberculosis (Edinb).* 2016;97:118-125.
86. Rao M, Valentini D, Poirer T, et al. B in TB: B cells as mediators of clinically relevant immune responses in Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2015;61Suppl 3(suppl 3):S225-34.
87. Sebina I, Biraro IA, Dockrell HM, et al. Circulating B-lymphocytes as potential biomarkers of Tuberculosis infection activity. Wilkinson KA, ed. *PLoS One.* 2014;9(9):e106796.
88. Zhu Q, Zhang M, Shi M, et al. Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis. *Immunobiology.* 2016;221(4):558-567.

89. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, et al. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993;178(6):2249-2254.
90. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 1997;186(1):39-45.
91. Dorhoi A, Kaufmann SHE. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Semin Immunol*. 2014;26(3):203-209.
92. Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, et al. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol*. 2000;122(3):343-349.
93. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):89-102.
94. Schenk M, Fabri M, Krutzik SR, et al. Interleukin-1b triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2013;141:174-180.
95. Saunders BM, Frank AA, Orme IM, et al. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2000;68(6):3322-3326.
96. Kellar KL, Gehrke J, Weis SE, et al. Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *PLoS One*. 2011;6(11):e26545.
97. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008;41(2):79-83.
98. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev*. 2008;226:191-204.
99. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem*. 2004;279(47):48487-48490.
100. Rao S, Bernhardt V. Serum C-Reactive Protein in Pulmonary Tuberculosis. *Infect Dis Clin Pract*. 2009;17(5):314-316.
101. O'Leary S, O'Sullivan MP, Keane J. IL-10 blocks phagosome maturation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(1):172-180.
102. Toossi Z, Ellner JJ. The Role of TGFβ in the Pathogenesis of Human Tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87(2):107-114.
103. Brown MA. IL-4 Production by T Cells: You Need a Little to Get a Lot. *J Immunol*. 2008;181:2941-2942.
104. Kong APS, Xu G, Brown N, et al. Diabetes and its comorbidities—where East meets West. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):537-547.
105. Pickup JC. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813-823.
106. Bensellam M, Duvillié B, Rybachuk G, et al. Glucose-induced O₂ consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells. *PLoS One*. 2011;7(1):e29807.
107. Ehses JA, Perren A, Eppler E, et al. Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2007;56:2356-2370.
108. Vlassara H, Cai W, Crandall J, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *PNAS*. 2002;99(24):15596-15601.
109. Turk Z, Ljubic S, Turk N, et al. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2001;303(1-2):105-115.
110. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-790.
111. Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, et al. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care*. 2011;34(1):162-167.
112. Tan KS, Lee KO, Low KC, et al. Glutathione deficiency in type 2 diabetes impairs cytokine responses and control of intracellular bacteria. *J Clin Invest*. 2012;122(6).
113. Shah PK. Innate immune pathway links obesity to insulin resistance. *Circ Res*. 2007;100(11):1531-1533.
114. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, et al. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem*. 2008;114(3):183-194.
115. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, et al. Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2007;56:16-23.
116. Moller DE. Potential role of TNF-α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(6):212-217.
117. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98-107.
118. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, et al. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*. 1997;40:1286-1292.
119. Zozulinska D, Majchrzak A. Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients. *Diabetologia*. 1999;42(1):117-118.
120. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-β and NF-κB. *Nat Med*. 2005;11(2):183-190.

121. Restrepo BI, Twahirwa M, Rahbar MH, et al. Phagocytosis via complement or Fc-gamma receptors is compromised in monocytes from type 2 diabetes patients with chronic hyperglycemia. *PLoS One*. 2014;9(3):92977.
122. Gomez DI, Twahirwa M, Schlesinger LS, et al. Reduced association of mycobacteria with monocytes from diabetes patients with poor glucose control. *Tuberc*. 2013;93(2):192-197.
123. Kumar NP, Moideen K, Dhakshinraj SD, et al. Profiling leucocyte subsets in tuberculosis-diabetes co-morbidity. *Immunology*. 2015;146(2):243-250.
124. Kumar NP, Moideen K, Sivakumar S, et al. Modulation of dendritic cell and monocyte subsets in tuberculosis-diabetes co-morbidity upon standard tuberculosis treatment. *Tuberculosis*. 2016;101:191-200.
125. Stew SS, Martinez PJ, Schlesinger LS, et al. Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity. *Tuberc*. 2013;93:578-582.
126. Wang C-H, Yu C-T, Lin H-C, et al. Hypodense alveolar macrophages in patients with diabetes mellitus and active pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 1999;79(4):235-242.
127. Lachmandas E, Vrieling F, Wilson LG, et al. The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*. 2015;10(2):1-13.
128. Andrade BB, Kumar NP, Sridhar R, et al. Heightened plasma levels of heme oxygenase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 as well as elevated peripheral neutrophil counts are associated with tb-diabetes comorbidity. *Chest*. 2014;145(6):1244-1254.
129. Kumar N, Moideen K, Viswanathan V. Effect of standard tuberculosis treatment on naive, memory and regulatory T cell homeostasis in tuberculosis-diabetes co-morbidity. 2016.
130. Raposo-García S, Guerra-Laso JM, García-García S, et al. Immunological response to Mycobacterium tuberculosis infection in blood from type 2 diabetes patients. *Immunol Lett*. 2017;186:41-45.
131. Kumar NP, Sridhar R, Nair D, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with altered CD8+ T and natural killer cell function in pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2015;144(4):677-686.
132. Restrepo BI, Fisher-hoch SP, Pino P a, et al. Tuberculosis in poorly controlled type 2 diabetes: altered cytokine expression in peripheral white blood cells. *Clin Infect Dis*. 2008;47(5):634-641.
133. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, et al. Expansion of pathogen-specific T-helper 1 and T-helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus. *J Infect Dis*. 2013;208(5):739-748.
134. Pavan Kumar N, Sridhar R, Banurekha VV, et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary tuberculosis is associated with heightened systemic type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(5):441-449.
135. Gan S-H, KhinMar K-W, Barkham TM, et al. Interferon- responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens in diabetes mellitus. *Eur Respir J*. 2014;44(3):805-808.
136. Stalenhoef JE, Alisjahbana B, Nelwan EJ, et al. The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(2):97-103.
137. Zhang C, Song X, Zhao Y, et al. Mycobacterium tuberculosis secreted proteins as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *J Clin Lab Anal*. 2015;29(5):375-382.
138. Sun Q, Zhang Q, Xiao H, et al. Significance of the frequency of CD4+CD25+CD127- T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus. *Respirology*. 2012;17(5):876-882.
139. Webster JL, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):581-620.
140. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, et al. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci*. 2013;53:77-85.
141. Padgett D, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol*. 2003;24(8):444-448.
142. Raff H, Magill SB. Is the hypothalamic-pituitary-adrenal axis disrupted in type 2 diabetes mellitus? *Endocrine*. 2016;54(2):273-275.
143. Prpić-Križevac I, Canecki-Varžić S, Bilić-Ćurčić I. Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with type 2 diabetes and relations with insulin resistance and chronic complications. *Wien Klin Wochenschr*. 2012;124(11-12):403-411.
144. Bruehl H, Rueger M, Dziobek I, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2439-2445.
145. Vermes I, Steinmetz E, Schoorl J, et al. Increased plasma levels of immunoreactive beta-endorphin and corticotropin in non-insulin-dependent diabetes. *Lancet (London, England)*. 1985;2(8457):725-726.
146. Roy M, Collier B, Roy A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients. *Psychiatry Res*. 1990;31(1):31-37.
147. Liu H, Bravata DM, Cabacian J, et al. Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(6):642-649.
148. Asfeldt VH. Hypophyseo-adrenocortical function in diabetes mellitus. *Acta Med Scand*. 1972;191(4):349-354.
149. Serio M, Tarquini B, Contini P, et al. Plasma cortisol response to insulin and circadian rhythm in diabetic subjects. *Diabetes*. 1968;17(3):124-126.

150. Bhatia RP, Adarsh, Singh RH. Cortisol in diabetic retinopathy. *Ann Ophthalmol*. 1983;15(2):128-130.
151. Tsigos C, Young RJ, White A. Diabetic neuropathy is associated with increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(3):554-558.
152. Prpić-Križevac I, Canecki-Varžić S, Bilić-Ćurčić I. Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with type 2 diabetes and relations with insulin resistance and chronic complications. *Wien Klin Wochenschr*. 2012;124(11-12):403-411.
153. Dacou-Voutetakis C, Peppas-Patrikiou M, Dracopoulou M. Urinary free cortisol and its nyctohemeral variation in adolescents and young adults with IDDM: relation to endothelin 1 and indices of diabetic angiopathy. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1998;11(3):437-445.
154. Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;380(1-2):89-98.
155. Long CNH, Lukens AFDW. The effects of adrenalectomy and hypophysectomy upon experimental diabetes in the cat. *J Exp Med*. 1936;63(4):465-490.
156. Cassuto H, Kochan K, Chakravarty K, et al. Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem*. 2005;280(40):33873-33884.
157. Pivonello R, De Leo M, Vitale P, et al. Pathophysiology of Diabetes Mellitus in Cushing's Syndrome. *Neuroendocrinology*. 2010;92(1):77-81.
158. Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, et al. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. *Am J Physiol Metab*. 2002;283(1):E172-E177..
159. Almon RR, Dubois DC, Jin JY, et al. Temporal profiling of the transcriptional basis for the development of corticosteroid-induced insulin resistance in rat muscle. *J Endocrinol*. 2005;184(1):219-232.
160. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest*. 1993;92(4):2065-2072.
161. Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. A Microarray analysis of the temporal response of liver to methylprednisolone: a comparative analysis of two dosing regimens. *Endocrinology*. 2007;148(5):2209-2225.
162. Burén J, Lai YC, Lundgren M, et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Arch Biochem Biophys*. 2008;474(1):91-101.
163. Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(12):499-506.
164. Fichna M, Fichna P. Glucocorticoids and beta-cell function. *Endokrynol Pol*. 2017;68(5):568-573.
165. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000;21(April):55-89.
166. Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest*. 1997;99(3):414-423.
167. Zawalich WS, Tesz GJ, Yamazaki H, et al. Dexamethasone suppresses phospholipase C activation and insulin secretion from isolated rat islets. *Metabolism*. 2006;55(1):35-42.
168. Kautzky-Willer A, Thomaseth K, Clodi M, et al. Beta-cell activity and hepatic insulin extraction following dexamethasone administration in healthy subjects. *Metabolism*. 1996;45(4):486-491.
169. Bornstein S., Ziegler C., Krug A., et al. The Role of Toll-like Receptors in the Immune-Adrenal Crosstalk. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088(1):307-318.
170. Kalafatakis K, Russell GM, Harmer CJ, et al. Ultradian rhythmicity of plasma cortisol is necessary for normal emotional and cognitive responses in man. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(17):E4091-E4100.
171. Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, et al. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood*. 2009;113(21):5134-5143.
172. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):190-198.
173. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):233-247.
174. Besedovsky L, Born J, Lange T. Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4. *FASEB J*. 2014;28(1):67-75.
175. Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120(2-3):69-75.
176. Lim HY, Müller N, Herold MJ, et al. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology*. 2007;122(1):47-53.
177. Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, et al. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2010;24(1):19-30.
178. Dhabhar FS, Mcewen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Med Sci*. 1999;96:1059-1064.

179. van de Garde MDB, Martinez FO, Melgert BN, et al. Chronic exposure to glucocorticoids shapes gene expression and modulates innate and adaptive activation pathways in macrophages with distinct changes in leukocyte attraction. *J Immunol*. 2018;192(192):1196-1208.
180. Zhou J, Cidlowski J. The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 2005;70(5-7):407-417.
181. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, et al. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(12):6865-70.
182. Rabbitt EH, Lavery GG, Walker EA, et al. Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *FASEB J*. 2002;16(1):36-44.
183. Chapman KE, Coutinho A, Gray M, et al. Local Amplification of glucocorticoids by 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088(1):265-273.
184. Zhao L, Pan Y, Peng K, et al. Inhibition of 11 β -HSD1 by LG13 improves glucose metabolism in type 2 diabetic mice. *J Mol Endocrinol*. 2015;55(2):119-131.
185. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*. 1997;349(9060):1210-1213.
186. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, et al. Differentiation of Adipose Stromal Cells: The Roles of Glucocorticoids and 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. *Endocrinology*. 1999;140(7):122-128.
187. Peng K, Pan Y, Li J, et al. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1(11 β -HSD1) mediates insulin resistance through JNK activation in adipocytes. *Sci Rep*. 2016;6(37160).
188. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev*. 2013;93(3):1139-1206.
189. Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA): Hypes and hopes. *Drugs*. 2014;74(11):1195-1207.
190. Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4279-4284.
191. Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(9):3147-3151.
192. Mahuad CV. Regulación Inmunoneuroendócrina de la Respuesta Inmune. Estudios en Pacientes Tuberculosos con distinto grado de afectación pulmonar. *Faculta de Cs.Médicas, UNR, Argentina*. 2004.
193. Dillon J. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr Drug Target -Inflammation Allergy*. 2005;4(3):377-385.
194. Straub RH, Lehle K, Herfarth H, et al. Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: Role of interleukin-6 and tumour necrosis factor. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(3):365-274.
195. Yamauchi A, Takei I, Nakamoto S, et al. Hyperglycemia decreases dehydroepiandrosterone in japanese male with impaired glucose tolerance and low insulin response. *Endocr J*. 1996;43(3):285-290.
196. Lavalley B, Provost PR, Kahwash Z, et al. Effect of insulin on serum levels of dehydroepiandrosterone metabolites in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;46(1):93-100.
197. Nestler JE, Usiskin KS, Barlascini CO, et al. Suppression of serum dehydroepiandrosterone sulfate levels by insulin: an evaluation of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(5):1040-1046.
198. Brahimaj A, Muka T, Kavousi M, et al. Serum dehydroepiandrosterone levels are associated with lower risk of type 2 diabetes: the Rotterdam Study. *Diabetologia*. 2017;60(1):98-106.
199. Padgett DA, Sheridan JF, Loria RM. Steroid hormone regulation of a polyclonal th2 immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;774(1):323-325.
200. Rook GAW. Glucocorticoids and immune function. *Bailliere's Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 1999;13(4):567-581.
201. Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, et al. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;61(2):202-211.
202. Angerami M, Suarez G, Pascutti MF, et al. Modulation of the phenotype and function of Mycobacterium tuberculosis-stimulated dendritic cells by adrenal steroids. *Int Immunol*. 2013;25(7):405-411.
203. Kipper-Galperin M, Galilly R, Danenberg HD, et al. Dehydroepiandrosterone selectively inhibits production of tumor necrosis factor α and Interlukin-6 in astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 1999;17(8):765-775.
204. Lopez-Marure R, Huesca-Gomez C, Ibarra-Sanchez M, et al. Dehydroepiandrosterone delays ldl oxidation in vitro and attenuates several oxidl-induced inflammatory responses in endothelial cells. *Inflamm Allergy-Drug Targets*. 2007;6(3):174-182.
205. Mahuad C, Bay ML, Farroni M a, et al. Cortisol and dehydroepiandrosterone affect the response of peripheral blood mononuclear cells to mycobacterial antigens during tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2004;60(6):639-646.
206. Watson RR, Huls A, Araghinikam M, Chung S. Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. 1996;9(4):274-291.

207. Danenberg HD, Ben-Yehuda A, Zakay-Rones Z, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment reverses the impaired immune response of old mice to influenza vaccination and protects from influenza infection. *Vaccine*. 1995;13(15):1445-1448.
208. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994;15(2):74-80.
209. Hart BL. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990;14(3):273-294.
210. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, et al. The immune-endocrine-metabolic unit during human tuberculosis. *Curr Immunol Rev*. 2010;6(4):314-322.
211. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):923.
212. Norgan N. The beneficial effects of body fat and adipose tissue in humans. *Int J Obes*. 1997;21(9):738-746.
213. Wensveen FM, Valentić S, Šestan M, et al. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Semin Immunol*. 2015;27(5):322-333.
214. Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, et al. Human Leptin Enhances Activation and Proliferation of Human Circulating T Lymphocytes. *Cell Immunol*. 2000;199(1):15-24.
215. Raso GM, Pacilio M, Esposito E, et al. Leptin potentiates IFN-g-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1 1. *Br J Pharmacol*. 2002;137:799-804.
216. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1093-1103.
217. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):371-379.
218. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, et al. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1409-1421.
219. Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, et al. Hyperinsulemia and Serum Leptin in Normal Subjects Effects of Prolonged Hyperinsulinemia on Serum Leptin in Normal Human Subjects. *J Clin Invest*. 1997;100(5):1107-1113.
220. Zakrzewska KE, Cusin I, Sainsbury A, et al. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes*. 1997;46(4):717-719.
221. Otero M, Lago R, Lago F, et al. Leptin, from fat to inflammation: Old questions and new insights. *FEBS Lett*. 2005;579(2):295-301.
222. Iikuni N, Lai Q, Lam K, et al. Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2008;4(2):70-79.
223. Popa C, Netea MG, Radstake DS, et al. Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1195-1198.
224. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, et al. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(2):630-635.
225. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1(11):1155-1161.
226. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- α in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004;40(1):177-184.
227. Freda PU, Shen W, Heymsfield SB, et al. Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor i excess due to acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2334-2343.
228. Nam S, Kim K, Cha B, et al. Low-dose growth hormone treatment combined with diet restriction decreases insulin resistance by reducing visceral fat and increasing muscle mass in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes*. 2001;25(8):1101-1107.
229. Morita J, Hakuno F, Hizuka N, et al. Growth hormone (GH) or insulin-like growth factor (IGF)-I represses 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1) mRNA expression in 3T3-L1 cells and its activity in their homogenates. *Endocr J*. 2009;56(4):561-570.
230. Zhao JT, Cowley MJ, Lee P, et al. Identification of novel GH-regulated pathway of lipid metabolism in adipose tissue: a gene expression study in hypopituitary men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):E1188-E1196.
231. Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):1120-1126.
232. Wang Z, Masternak MM, Al-Regaiey KA, et al. Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology*. 2007;148(6):2845-2853.
233. Houssay BA. The hypophysis and metabolism. *N Engl J Med*. 1936;214:961-985.
234. Dreval A, Trigoloso I, Misnikova I, et al. Prevalence of diabetes mellitus in patients with acromegaly. *Endocr Connect*. 2014;3(2):93-98.
235. Szynaka E, Petriczko E, Grabarek J, et al. Effects of recombinant human growth hormone (rhGH) replacement therapy on detailed immunologic parameters in somatotropine--deficient paediatrics patients prior and after 6 months of rhGH treatment. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010;31(4):553-558.
236. Lebl J, Sediva A, Snajderova M, et al. Immune system in adults with childhood-onset growth hormone deficiency: effect of growth hormone therapy. *Endocr Regul*. 2000;34(4):169-173.

237. Pagani S, Meazza C, Travaglini P, et al. Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *Eur Cytokine Netw*. 16(1):65-69.
238. Ramos SB, Brenu EW, Christy R, et al. Assessment of immune function after short-term administration of recombinant human growth hormone in healthy young males. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(7):1307-1312.
239. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1523-1631.
240. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, et al. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(3):110-116.
241. Gala RR, Shevach EM. Influence of prolactin and growth hormone on the activation of dwarf mouse lymphocytes in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993;204(2):224-230.
242. Bernton EW, Meltzer MS, Holaday JW. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Sci*. 1988;239(4838):401-404.
243. Spangelo BL, Hall NR, Ross PC, et al. Stimulation of in vivo antibody production and concanavalin-A-induced mouse spleen cell mitogenesis by prolactin. *Immunopharmacology*. 1987;14(1):11-20.
244. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5).
245. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999;4(4):597-609.
246. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, et al. PPARs and their metabolic modulation: New mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med*. 2007;262(2):184-198.
247. Chinetti-Gbaguidi G, Bouhrel MA, Copin C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation induces 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in human alternative macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):677-685.
248. Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, et al. PPAR γ expression and function in mycobacterial infection: Roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing. *PPAR Res*. 2012;2012.
249. Chen T, Tibbitt CA, Feng X, et al. PPAR- γ promotes type 2 immune responses in allergy and nematode infection. *Sci Immunol*. 2017;2(9):eaal5196.
250. Padula Estrada-Hernandez SJ, Hla T, Puddington L, et al. Inhibition of Helper T Cell Responses Mediates γ Immunoregulation: PPAR and γ The Nuclear Receptor PPAR. *J Immunol*. 2010;164:1364-1371.
251. Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4+ T cell-mediated protection against colitis. *J Immunol*. 2007;178(5):2940-2949.
252. Nobs SP, Natali S, Pohlmeier L, et al. PPAR γ in dendritic cells and T cells drives pathogenic type-2 effector responses in lung inflammation. *J Exp Med*. 2017;214(10):3015-3035.
253. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, et al. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med*. 2009;206(10):2079-2089.
254. Ramon S, Bancos S, Thatcher TH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma B cell-specific deficient mice have an impaired antibody response. *J Immunol*. 2012;189(10):4740-4747.
255. Park BV, Pan F. The role of nuclear receptors in regulation of Th17/Treg biology and its implications for diseases. *Cell Mol Immunol*. 2015;12:533-542.
256. Wohlfert EA, Nichols FC, Nevis E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPARgamma-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*. 2007;178(7):4129-4135.
257. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, et al. The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2007;66(2-3):166-175.
258. del Rey A, Mahuad CV, Bozza VV, et al. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun*. 2007;21(2):171-179.
259. Mahuad CV, Bozza VV, Pezzotto SM, et al. Impaired immune responses in tuberculosis patients are related to weight loss that coexists with an immunoendocrine imbalance. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(3-4):193-199.
260. Santucci N, D'Attilio L, Kovalevski L, et al. A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(10):1-8.
261. Díaz A, Bongiovanni B, D'Attilio L, et al. The clinical recovery of tuberculosis patients undergoing specific treatment is associated with changes in the immune and neuroendocrine responses. *Pathog Dis*. 2017;75(7).
262. D'Attilio L, Trini E, Bongiovanni B, et al. mRNA expression of alpha and beta isoforms of glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear cells of patients with tuberculosis and its relation with components of the immunoendocrine response. *Brain Behav Immun*. 2011;25(3):461-467.
263. Díaz A, Penas FN, D'Attilio L, et al. Immune-endocrine deregulation and increased PPAR expression in pulmonary tuberculosis. *Biocell*. 2014.

264. Hackett RA, Steptoe A. Type 2 diabetes mellitus and psychological stress — a modifiable risk factor. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13(9):547-560.
265. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, et al. Infection and diabetes: the case for glucose control. *Am J Med*. 1982;72(3):439-450.
266. Wheat LJ. Infection and diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1980;3(1):187-197.
267. Magee MJ, Salindri AD, Gujral UP, et al. Convergence of non-communicable diseases and tuberculosis: a two-way street? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22(11):1258-1268.
268. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem*. 2002;48(3).
269. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes-2009*. Vol 32. 2009.
270. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419.
271. Hernández Yero JA, Tuero Iglesias Á, Vargas González D. Utilidad del índice HOMA-IR con una sola determinación de insulínemia para diagnosticar resistencia insulínica. *Rev Cuba Endocrinol*. 2011;22(2):69-77.
272. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26(2):171-176.
273. He J-Q, Sandford AJ, Wang I-M, et al. Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2008;32(3):755-762.
274. Biosystems A. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. *Gene Expr*. 2013;2009:1-70.
275. D'Attilio L, Díaz A, Santucci N, et al. Levels of inflammatory cytokines, adrenal steroids, and mRNA for GR α , GR β and 11 β HSD1 in TB pleurisy. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93(6):635-641.
276. D'Attilio L. Regulación Inmunoendócrina. Estudios en pacientes tuberculosos con distinto grado de afectación pulmonar. Relación entre la expresión de receptores para glucocorticoides y la severidad de la tuberculosis. *Faculta de Cs.Médicas, UNR, Argentina*. 2012.
277. Organización Mundial de la Salud. Datos y cifras sobre la obesidad. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>.
278. Dardeno TA, Chou SH, Moon H-S, et al. Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31(3):377-93
279. Goropashnaya AV, Herron J, Sexton M, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Metabolism*. 2009; 58(1): 22–29.
280. Laughlin GA, Barrett-Connor E. Sexual dimorphism in the influence of advanced aging on adrenal hormone levels: The Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(10):3561-3568.
281. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867.
282. Kumar NP, Banurekha VV, Nair D, et al. Coincident pre-diabetes is associated with dysregulated cytokine responses in pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2014;9(11).
283. Bongiovanni B, Díaz A, D'Attilio L, et al. Changes in the immune and endocrine responses of patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1262:10-15.
284. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, et al. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*. 1993;150(2):353-360.
285. Vallerskog T, Martens GW, Kornfeld H. Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to Mycobacterium tuberculosis 1. *J*. 2010;184(11):6275-6282.
286. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-344.
287. Schreiber T, Ehlers S, Heitmann L, et al. Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses anti-tuberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J Immunol*. 2009;183(2):1301-1312.
288. de Paus RA, van Wengen A, Schmidt I, et al. Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN- α and IFN- β . *Cytokine*. 2013;61(2):645-655.
289. Dallagi A, Girouard J, Hamelin-Morrisette J, et al. The activating effect of IFN- γ on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(3):326-341.
290. Bobadilla K, Sada E, Jaime ME, et al. Human phagosome processing of Mycobacterium tuberculosis antigens is modulated by interferon- γ and interleukin-10. *Immunology*. 2012;138(1):34-46.
291. McNab FW, Ewbank J, Howes A, et al. Type I IFN Induces IL-10 Production in an IL-27-Independent Manner and Blocks Responsiveness to IFN- γ for Production of IL-12 and Bacterial Killing in Mycobacterium tuberculosis -Infected Macrophages. *J Immunol*. 2014;193(7):3600-3612.
292. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, et al. Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol*. 2001;53(1):85-91.
293. Jamil B, Shahid F, Hasan Z, et al. Interferon γ /IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis.

- Tuberculosis*. 2007;87(4):279-287.
294. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, et al. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. - PubMed - NCBI. *Infect Immun*. 1993;61(8):3482-3489.
 295. Awomoyi AA, Marchant A, Howson JMM, et al. Interleukin-10, Polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and Susceptibility to Tuberculosis. *J Infect Dis*. 2002;186(12):1808-1814.
 296. Abdalla AE, Lambert N, Duan X, et al. Interleukin-10 Family and Tuberculosis: An Old Story Renewed. *Int J Biol Sci*. 2016;12(6):710-717.
 297. Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, et al. Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from nadh:ubiquinone oxidoreductase to limit induction of Interleukin-1 β (IL-1 β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *J Biol Chem*. 2015;290(33):20348-20359.
 298. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, et al. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ Res*. 2016;119(5):652-665.
 299. Yew WW, Chang KC, Chan DP, Zhang Y. Metformin as a host-directed therapeutic in tuberculosis: Is there a promise? *Tuberculosis (Edinb)*. 2019;115:76-80.
 300. Singhal A, Jie L, Kumar P, et al. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci Transl Med*. 2014;6(263):263ra159-263ra159.
 301. Restrepo BI. Metformin: Candidate host-directed therapy for tuberculosis in diabetes and non-diabetes patients. *Tuberculosis*. 2016;101:S69-S72.
 302. Moller D, Berger J. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int J Obes*. 2003;27:17-21.
 303. Clark RB. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol*. 2002;71(3):388-400.
 304. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):726-741.
 305. Reddy AT, Lakshmi SP, Reddy RC. PPAR γ in Bacterial Infections: A Friend or Foe? *PPAR Res*. 2016; 2016:7963540.
 306. Yang XY, Wang LH, Chen T, et al. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem*. 2000;275(7):4541-4544.
 307. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypothesis. *Endocr Rev*. 1996;17:64-95.
 308. Turnbull A V, Rivier CL. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action. *Physiol Rev*. 1999;79(1):1-71.
 309. Späth-Schwalbe E, Born J, Schrezenmeier H, et al. Interleukin-6 stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(4):1212-1214.
 310. Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, et al. Immune modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol*. 2005;18(1):41-78.
 311. Holsboer F, Stalla GK, von Bardeleben U, et al. Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls. *Life Sci*. 1988;42(1):1-5.
 312. Aoki K, Terauchi Y. Effect of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on diabetes mellitus and obesity. *Vitamins and Hormones*. 2018;108:355-365.
 313. Hazeldine J, Arlt W, Lord JM. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120(2-3):127-136.
 314. Svec F, Porter JR. The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998;218(3):174-191.
 315. Parker CR, Stankovic AK, Faye-petersen O, et al. Effects of acth and cytokines on dehydroepiandrosterone sulfotransferase messenger RNA in human adrenal cells. *Endocr Res*. 1998;24(3-4):669-673.
 316. Kim MS, Shigenaga J, Moser A, et al. Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response. *Am J Physiol Metab*. 2004;287(4):E731-E738.
 317. Yalcin EB, More V, Neira KL, et al. Downregulation of sulfotransferase expression and activity in diseased human livers. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(9):1642-1650.
 318. Ramamoorthy S, Cidowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev*. 2013;24:41-56.
 319. Balazs Z, Schweizer RAS, Frey FJ, et al. DHEA induces 11 -HSD2 by acting on CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(1):92-101.
 320. Straub RH, Besedovsky HO. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J*. 2003;17(15):2176-2183.
 321. Rodriguez JM, Monsalves-Alvarez M, Henriquez S, et al. Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids*. 2016;115:182-192.
 322. Ming-Tsan L, Fukushima R, Saito H, et al. Growth Hormone and the Immune Response to Bacterial Infection. *Horm Res*. 2008;45(1-2):50-54.

323. Van den Berghe G. Endocrine evaluation of patients with critical illness. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32(2):385-410..
324. Straub RH. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):203.
325. Leung CC, Lam TH, Chan WM, et al. Lower Risk of Tuberculosis in Obesity. *Arch Intern Med*. 2007;167(12):1297.
326. Soo Jung Kim, Shinhee Ye, Ye ji Han, et al. The association of body mass index with incidence of tuberculosis in Korea. *Eur Respir J*. 2017;50(suppl 61):PA2715.
327. Hanrahan CF, Golub JE, Mohapi L, et al. Body mass index and risk of tuberculosis and death. *AIDS*. 2010;24(10):1501-1508.
328. Lonnroth K, Williams BG, Cegielski P, et al. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. *Int J Epidemiol*. 2010;39(1):149-155.
329. Cegielski JP, McMurray DN. The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(3):286-298..
330. Cegielski JP, Arab L, Cornoni-Huntley J. Nutritional Risk Factors for Tuberculosis Among Adults in the United States, 1971–1992. *Am J Epidemiol*. 2012;176(5):409-422.
331. Pavan Kumar N, Nair D, Banurekha VV, et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary or latent tuberculosis results in modulation of adipocytokines. *Cytokine*. 2016;79:74-81.
332. Thaler JP, Choi SJ, Schwartz MW, et al. Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: Resolving the paradox. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31(1):79-84.
333. Exton JH, Friedmann N, Wong EH, et al. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J Biol Chem*. 1972;247(11):3579-3588.
334. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(1):131-138.
335. Baxter JD, Forsham PH. Tissue effects of glucocorticoids. *Am J Med*. 1972;53(5):573-589.
336. De Vos P, Saladin R, Auwerx J, et al. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 1995;270(27):15958-15961.
337. Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, et al. Additive effects of cortisol and growth hormone on regional and systemic lipolysis in humans. *Am J Physiol Metab*. 2004;286(3):E488-E494.
338. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001;286(3):327-334.
339. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003;52(7):1799-1805.
340. Spranger J, Kroke A, Mo M, et al. Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. 2003;52(March):812-817.
341. Li X, Wang J, Yang Q, et al. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Obese Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Med Sci*. 2017;354(4):408-414.
342. Tsai S, Clemente-Casares X, Zhou AC, et al. Insulin Receptor-Mediated Stimulation Boosts T Cell Immunity during Inflammation and Infection. *Cell Metab*. 2018;28(6):922-934.e4.
343. Xiu F, Stanojic M, Diao L, Jeschke MG. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:486403.
344. Gómez-Santos C, Hernández-Morante JJ, Tébar FJ, et al. Differential effect of oral dehydroepiandrosterone-sulphate on metabolic syndrome features in pre- and postmenopausal obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(4):548-554.
345. Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on Abdominal Fat and Insulin Action in Elderly Women and Men. *JAMA*. 2004;292(18):2243.
346. Hernández-Morante JJ, Pérez-de-Heredia F, Luján JA, Zamora S, Garaulet M. Role of DHEA-S on body fat distribution: Gender- and depot-specific stimulation of adipose tissue lipolysis. *Steroids*. 2008;73(2):209-215.
347. Casson P, Hornsby P, Buster J. Adrenal Androgens, Insulin Resistance, and Cardiovascular Disease. *Semin Reprod Med*. 1996;14(1):29-34.
348. Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, et al. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes*. 2004;53(1):41-52.
349. Brignardello E, Runzo C, Aragno M, et al. Dehydroepiandrosterone administration counteracts oxidative imbalance and advanced glycation end product formation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30(11):2922-2927.
350. Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, et al. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol*. 2008;2008:639803.
351. Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, et al. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):949-957.

352. Kaneshige H. Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. 1987;36(7):822-828.
353. Geerlings SE, Hoepelman AIM. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26(3-4):259-265.
354. Gilardini Montani MS, Granato M, Cuomo L, et al. High glucose and hyperglycemic sera from type 2 diabetic patients impair DC differentiation by inducing ROS and activating Wnt/ β -catenin and p38 MAPK. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016;1862(4):805-813.
355. Zhou T, Hu Z, Yang S, et al. Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2018;2018:1-9.
356. Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23(1):3-13.
357. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, et al. Infection and diabetes: The case for glucose control. *Am J Med*. 1982;72(3):439-450.
358. Lecube A, Pachón G, Petriz J, et al. Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PLoS One*. 2011;6(8):e23366.
359. Scatena R, Nocca G, de Sole P, et al. Impaired reactive oxygen metabolism of phagocytic leukocytes in NIDDM patients. A role for non-enzymatic glycosylation of collagen. *J Biolumin Chemilumin*. 1998;13(5):273-278.
360. Foss-Freitas MC, Foss NT, Donadi EA, et al. Effect of metabolic control on interferon-gamma and interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells from type 1 and type 2 diabetic patients. *Brazilian J Med Biol Res*. 2007;40(5):671-677.
361. Bagdade JD, Nielson KL, Bulger RJ. Reversible abnormalities in phagocytic function in poorly controlled diabetic patients. *Am J Med Sci*. 1972;263(6):451-456.
362. Bagdade JD, Stewart M, Walters E. Impaired granulocyte adherence. A reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*. 1978;27(6):677-681.
363. MacRury SM, Gemmell CG, Paterson KR, et al. Changes in phagocytic function with glycaemic control in diabetic patients. *J Clin Pathol*. 1989;42(11):1143-1147.
364. Berezin A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2016;10(2):S176-S183.
365. Bianchi C, Miccoli R, Del Prato S. Hyperglycemia and Vascular Metabolic Memory: Truth or Fiction? *Curr Diab Rep*. 2013;13(3):403-410.
366. Kelso A, MacDonald HR, Smith KA, et al. Interleukin 2 enhancement of lymphokine secretion by T lymphocytes: analysis of established clones and primary limiting dilution microcultures. *J Immunol*. 1984;132(6):2932-2938.
367. Zhang R, Xi X, Wang C, et al. Therapeutic effects of recombinant human interleukin 2 as adjunctive immunotherapy against tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201025.
368. Viswanathan V, Kumpatla S, Aravindalochanan V, et al. Prevalence of Diabetes and Pre-Diabetes and Associated Risk Factors among Tuberculosis Patients in India. Pai M, ed. *PLoS One*. 2012;7(7):e41367.
369. Jiménez-Corona ME, Cruz-Hervert LP, García-García L, et al. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax*. 2013;68(3):214-220.
370. Martens GW, Arikan MC, Lee J, et al. Tuberculosis Susceptibility of Diabetic Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(5):518-524.
371. Ahmed M, de Winther MPJ, Van den Bossche J. Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes. *Immunobiology*. 2017;222(10):937-943.
372. Chang S-C, Yang W-CV. Hyperglycemia, tumorigenesis, and chronic inflammation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;108:146-153.
373. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1243(1):88-102.
374. Guglielmotto M, Aragno M, Tamagno E, et al. AGEs/RAGE complex upregulates BACE1 via NF- κ B pathway activation. *Neurobiol Aging*. 2012;33(1):196.e13-196.e27.
375. Ingels C, Derese I, Wouters PJ, et al. Soluble RAGE and the RAGE Ligands HMGB1 and S100A12 in Critical Illness. *Shock*. 2015;43(2):109-116.
376. Nogueira-Machado JA, Volpe CM de O, Veloso CA, et al. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(8):1023-1035.
377. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, et al. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes*. 1996;45(7):954-959.
378. Hu R, Xia C-Q, Butfiloski E, et al. Effect of high glucose on cytokine production by human peripheral blood immune cells and type I interferon signaling in monocytes: Implications for the role of hyperglycemia in the diabetes inflammatory process and host defense against infection. *Clin Immunol*. 2018;195:139-148.
379. Tollefsbol TO, Cohen HJ. Culture kinetics of glycolytic enzyme induction, glucose utilization, and thymidine incorporation of extended-exposure phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J Cell Physiol*. 1985;122(1):98-104.
380. Calder PC, Dimitriadis G, Newsholme P. Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab*

- Care*. 2007;10(4):531-540.
381. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, et al. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(4):282-90.
 382. Wade CE. Hyperglycemia may alter cytokine production and phagocytosis by means other than hyperosmotic stress. *Crit Care*. 2008;12(5):182.
 383. Shukla A, Hashiguchi N, Chen Y, et al. Osmotic regulation of cell function and possible clinical applications. *Shock*. 2004;21(5):391-400.
 384. Eddie Ip WK, Medzhitov R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2015;6(1):6931.
 385. Oliver JC, Bland LA, Oettinger CW, et al. Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res*. 1993;12(2):115-120.
 386. Verma V, Kumar P, Dhanda RS, et al. Kinetics of cytokine profile in response to Mycobacterium bovis BCG and Streptococcus pyogenes activated cells. *Data Br*. 2016;7:445-448.
 387. Brattsand R, Linden M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996;10 Suppl 2:81-90-2.
 388. He Y, Luo Y, Lao X, et al. Cytokine signatures of human whole blood for monitoring immunosuppression. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(3):271-278.
 389. Liu Z, Yuan X, Luo Y, et al. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. *Cytokine*. 2009;45(2):141-147.
 390. Horton DL, Remick DG. Delayed Addition of Glucocorticoids Selectively Suppresses Cytokine Production in Stimulated Human Whole Blood. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(6):979-985.
 391. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1711-1723.
 392. Mozo L, Suárez A, Gutiérrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):406-412.
 393. Olnes MJ, Kotliarov Y, Biancotto A, et al. Effects of Systemically Administered Hydrocortisone on the Human Immune. *Sci Rep*. 2016;6:23002.
 394. Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol*. 1993;149(1):39-49.
 395. Fushimi T, Okayama H, Seki T, et al. Dexamethasone suppressed gene expression and production of Interleukin-10 by human peripheral blood mononuclear cells and monocytes. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;112(1):13-18.
 396. Borish L, Aarons A, Rumbryt J, et al. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(6):1288-1296.
 397. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, et al. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol*. 1992;148(11):3618-3623.
 398. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-181.
 399. Serrano MA, Curi R, Parry-Billings M, et al. Effects of glucocorticoids on lymphocyte metabolism. *Am J Physiol Metab*. 1993;264(1):E24-E28.
 400. Leis H, Page A, Ramírez A, et al. Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Endocrinol*. 2004;18(2):303-311.
 401. Beesley AH, Firth MJ, Ford J, et al. Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. *Br J Cancer*. 2009;100(12):1926-1936.
 402. Silveira AB, Laranjeira ABA, Rodrigues GOL, et al. PI3K inhibition synergizes with glucocorticoids but antagonizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(15):13105-13118.
 403. Arts RJW, Carvalho A, La Rocca C, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 2016;17(10):2562-2571.
 404. Weaver ICG. Epigenetic effects of glucocorticoids. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009;14(3):143-150.
 405. Zannas AS, Chrousos GP. Epigenetic programming by stress and glucocorticoids along the human lifespan. *Mol Psychiatry*. 2017;22(5):640-646.
 406. Bhavanam S, Rayat GR, Keelan M, et al. Characterization of immune responses of human PBMCs infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra: Impact of donor declared BCG vaccination history on immune responses and M. tuberculosis growth. Cardona P-J, ed. *PLoS One*. 2018;13(9):e0203822.
 407. Sundaramurthy V, Korf H, Singla A, et al. Survival of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG in lysosomes in vivo. *Microbes Infect*. 2017;19(11):515-526.
 408. Levitte S, Adams KN, Berg RD, et al. Mycobacterial acid tolerance enables phagolysosomal survival and establishment of tuberculous

- infection *In Vivo. Cell Host Microbe*. 2016;20(2):250-258.
409. Duncan SA, Baganizi DR, Sahu R, et al. SOCS Proteins as regulators of inflammatory responses induced by bacterial infections: a review. *Front Microbiol*. 2017;8:2431.
 410. Moreira-Teixeira L, Mayer-Barber K, Sher A, et al. Type I interferons in tuberculosis: Foe and occasionally friend. *J Exp Med*. 2018;215(5):1273-1285.
 411. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol*. 2009;183(2):1337-1345.
 412. Mahajan S, Dkhar HK, Chandra V, et al. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival. *J Immunol*. 2012;188(11):5593-5603.
 413. D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*. 2006;176(5):3087-3097.
 414. Arnett E, Weaver AM, Woodyard KC, et al. PPAR γ is critical for Mycobacterium tuberculosis induction of Mcl-1 and limitation of human macrophage apoptosis. Hawn TR, ed. *PLoS Pathog*. 2018;14(6):e1007100.
 415. Guirado E, Rajaram MV, Chawla A, et al. Deletion of PPAR γ in lung macrophages provides an immunoprotective response against M. tuberculosis infection in mice. *Tuberculosis*. 2018;111:170-177.
 416. Kim YS, Lee H-M, Kim JK, et al. PPAR- α Activation Mediates Innate Host Defense through Induction of TFEB and Lipid Catabolism. *J Immunol*. 2017;198(8):3283-3295.
 417. Dasgupta S, Rai RC. PPAR- γ and Akt regulate GLUT1 and GLUT3 surface localization during Mycobacterium tuberculosis infection. *Mol Cell Biochem*. 2018;440(1-2):127-138.
 418. Yamada H, Mizumo S, Horai R, et al. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest*. 2000;80(5):759-767.
 419. Fremont CM, Togbe D, Doz E, et al. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 2007;179(2):1178-1189.
 420. Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, et al. IL-1b Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and Caspase-3 Activation. *J Immunol*. 2013;190(8):4196-4204.
 421. Ladel CH, Blum C, Dreher A, et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun*. 1997;65(11):4843-4849.
 422. Chen G, Sun W, Liang Y, et al. Maternal diabetes modulates offspring cell proliferation and apoptosis during odontogenesis via the TLR4/NF- κ B signalling pathway. *Cell Prolif*. 2017;50(3):e12324.
 423. Jeong I-K, Oh DH, Park S-J, et al. Inhibition of NF- κ B prevents high glucose-induced proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Exp Mol Med*. 2011;43(12):684.
 424. Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002;110(6):851-860.
 425. Woo Y, Kim H, Kim K-C, et al. Tumor-secreted factors induce IL-1 β maturation via the glucose-mediated synergistic axis of mTOR and NF- κ B pathways in mouse macrophages. Srinivasula SM, ed. *PLoS One*. 2018;13(12):e0209653.
 426. Shaw TC, Thomas LH, Friedland JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by human monocytic cells. *Cytokine*. 2000;12(5):483-486.
 427. Torres-Castro I, Arroyo-Camarena ÚD, Martínez-Reyes CP, et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. *Immunol Lett*. 2016;176:81-89.
 428. Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, et al. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2016;6(1):21244.
 429. Abdalla AE, Lambert N, Duan X, et al. Interleukin-10 Family and Tuberculosis: An Old Story Renewed. *Int J Biol Sci*. 2016;12(6):710-717. doi:10.7150/ijbs.13881.
 430. Salih DA, Brunet A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(2):126-136.
 431. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004;117(4):421-426.
 432. Chung S, Ranjan R, Lee YG, et al. Distinct role of FoxO1 in M-CSF- and GM-CSF-differentiated macrophages contributes LPS-mediated IL-10: implication in hyperglycemia. *J Leukoc Biol*. 2015;97(2):327-339.
 433. Wang J, Wang R, Wang H, et al. Glucocorticoids Suppress Antimicrobial Autophagy and Nitric Oxide Production and Facilitate Mycobacterial Survival in Macrophages. *Sci Rep*. 2017;7(1):982.
 434. Bongiovanni B, Mata-Espinosa D, D'Attilio L, et al. Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. 2015;95(5):562-569.
 435. Olivares-Morales MJ, De La Fuente MK, Dubois-Camacho K, et al. Glucocorticoids Impair Phagocytosis and Inflammatory Response Against Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Front Immunol*. 2018;9:1026.

ANEXO

Efecto del cambio de osmolaridad y del tratamiento con altas concentraciones de glucosa sobre la viabilidad celular de las CMP de sujetos sanos

De los cultivos descritos en la sección 3.8 de MyM, para el análisis de la apoptosis de CMP se realizaron cultivos paralelo con y sin estímulo en las distintas concentraciones de Glc. Además, como control osmótico se utilizó el manitol en distintas concentraciones (5, 15 y 35mM) conjuntamente con la dosis fisiológica de Glc (5mM) para obtener osmolaridades de 10, 20 y 40 mOsm.

El análisis de la apoptosis temprana (**Figura 1** paneles **A** y **C**) y tardía (**Figura 1** paneles **B** y **D**) de las CMP de HCo cultivadas durante 24h y 4 días no mostró diferencias debido a la hiperosmolaridad en los cultivos sin estimular ni en cultivos estimulados.

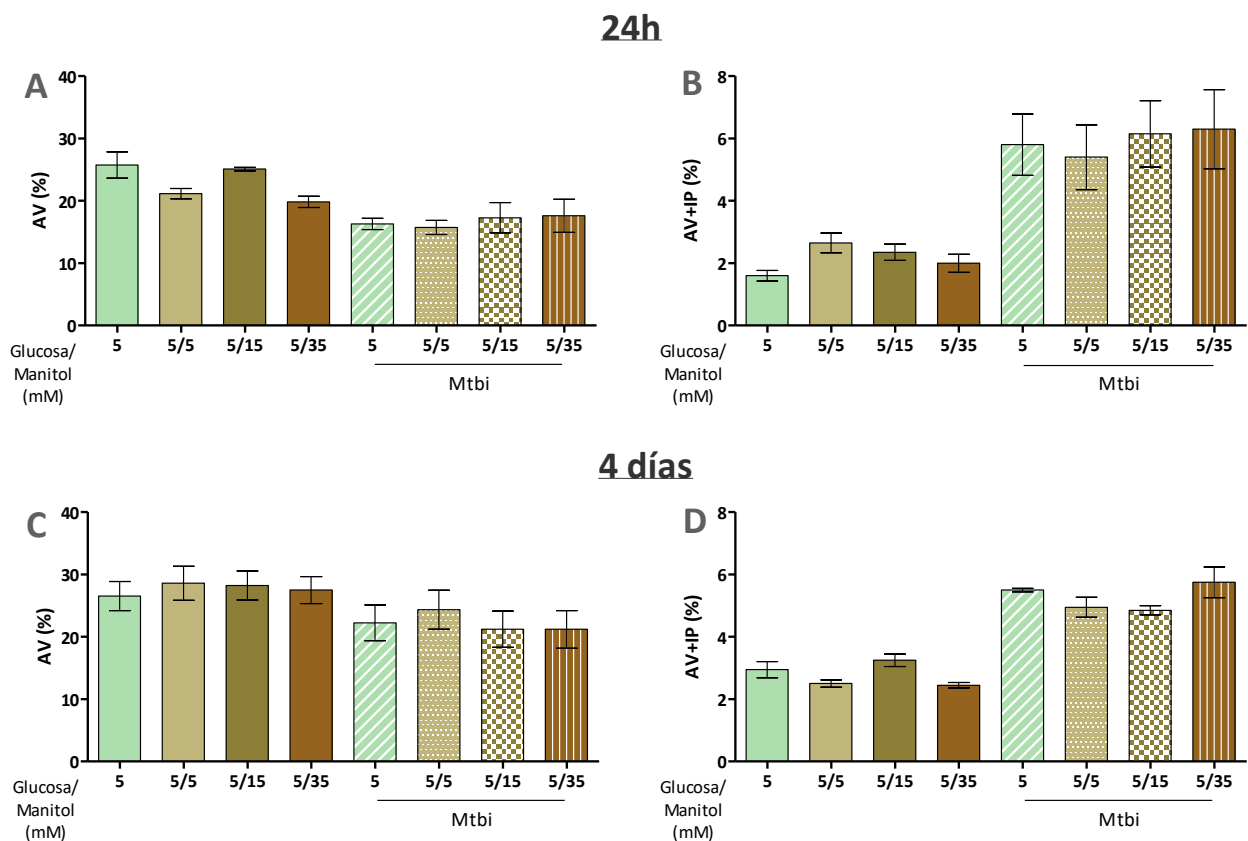


Figura 1: Efecto del cambio de osmolaridad sobre la apoptosis temprana (panel A-24h; panel C-4días) y tardía (panel B-24h; panel D-4días) en células mononucleares periféricas de sujetos sanos (n=3). Se utilizaron dosis conjuntas de glucosa (5mM) y manitol (5, 15 o 35mM). AV: anexina V; IP: yoduro de propidio.

Por otro lado, más allá del cambio generado en la osmolaridad, las dosis de Glc suprafisiológicas utilizadas podrían tener un efecto sobre la viabilidad celular. Sin embargo no se encontraron diferencias de los marcadores AV (apoptosis temprana-**Figura 2** paneles **A** y **C**) y AV+IP (apoptosis tardía-**Figura 2** paneles **B** y **D**) entre las distintas dosis probadas en los cultivos de CMP sin estimular ni en aquellos estimulados.

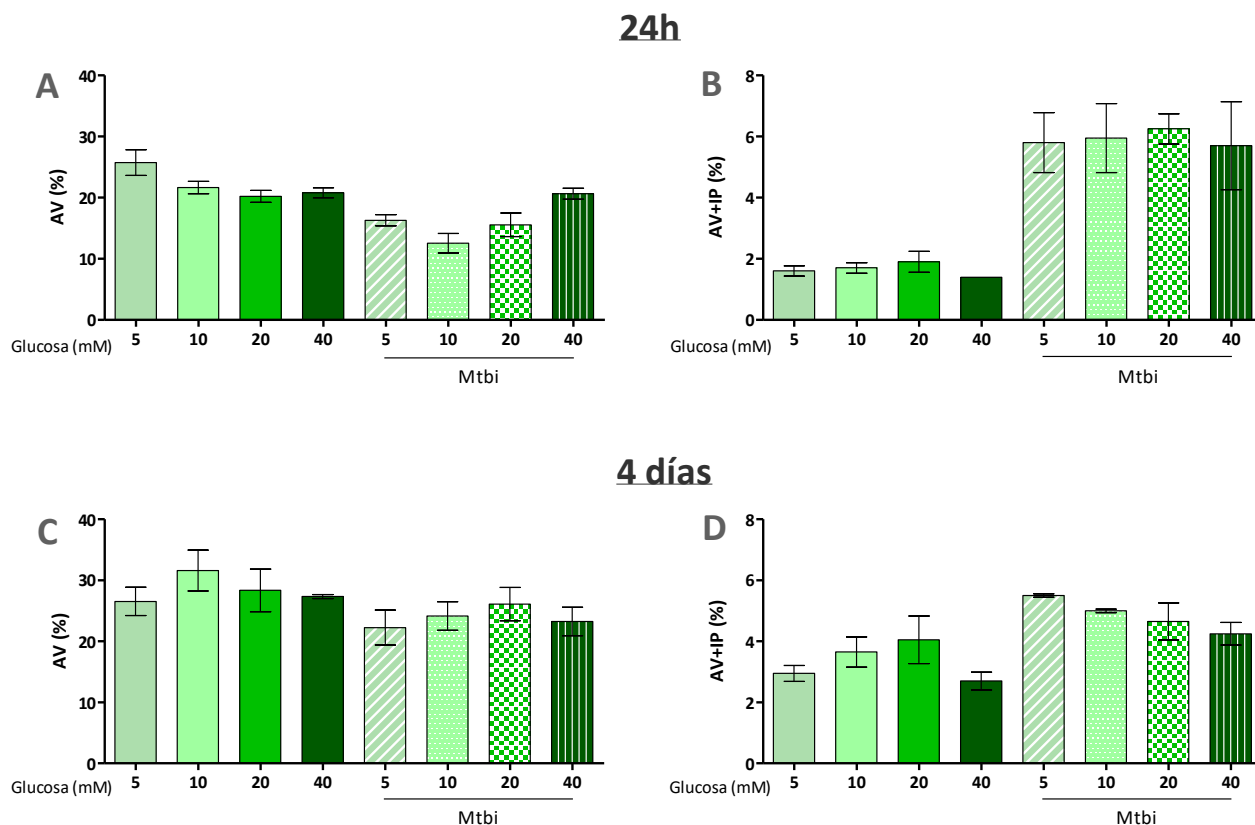


Figura 2: Efecto del tratamiento con glucosa sobre la apoptosis temprana (panel A-24h; panel C-4días) y tardía (panel B-24h; panel D-4días) en células mononucleares periféricas de sujetos sanos (n=3). AV: anexina V; IP: ioduro de propidio.

Cuantificación de mediadores en sobrenadantes de cultivo de CMP de los distintos grupos frente a *Mtbi* y tratamiento con glucosa

El tratamiento con una dosis suprafisiológica de Glc incrementó significativamente los niveles de IL- β en sobrenadantes de cultivo de CMP de HCo, no observándose diferencias en los niveles de los demás grupos en estudio. Los niveles de TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-10 tampoco se vieron modificados frente a este tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de las dosis de glucosa sobre la producción de citocinas frente a *Mtbi* de las células mononucleares periféricas provenientes de los distintos grupos en estudio

Estímulo con <i>Mtbi</i>	HCo (n=7)		<i>p</i>	DBT (n=9)		<i>p</i>	TB (n=7)		<i>p</i>	TB+DBT (n=6)		<i>p</i>
	Glc 5mM	Glc 20mM		Glc 5mM	Glc 20mM		Glc 5mM	Glc 20mM		Glc 5mM	Glc 20mM	
TNF-α (pg/ml)	900 (537-1032)	840 (524-1239)	n.s.	565 (278-1729)	876 (35-1394)	n.s.	1121 (602-3298)	1195 (619-3086)	n.s.	830 (344-2904)	1167 (462-2877)	n.s.
IL-1β (pg/ml)	4053 (3610-5066)	4526 (4153-5232)	0.03	5181 (4516-5706)	5286 (4841-5857)	n.s.	4221 (3776-5400)	4746 (4479-5579)	n.s.	4099 (3706-5498)	4302 (3625-4754)	n.s.
IL-2 (pg/ml)	17.8 (12.6-29.2)	18.3 (11.2-24.5)	n.s.	10.9 (7.52-32.6)	12.3 (5.99-26.9)	n.s.	16.4 (8.01-38.7)	15.3 (8.13-37.4)	n.s.	91.8 (40.4-323)	85.5 (40.9-254)	n.s.
IFN-γ (pg/ml)	8.72 (6.98-30.6)	9.42 (6.94-34.4)	n.s.	16.0 (3.70-37.4)	11.1 (3.42-48.0)	n.s.	21.5 (12.4-37.4)	22.9 (13.8-43.4)	n.s.	94.2 (21.2-654)	106 (22.5-634)	n.s.
IL-10 (pg/ml)	160 (125-285)	154 (121-253)	n.s.	195 (176-255)	198 (184-243)	n.s.	375 (63.3-490)	380 (66.0-468)	n.s.	208 (50-241)	192 (115-262)	n.s.

HCo: sujetos sanos; DBT: sujetos con diabetes mellitus tipo 2; TB: sujetos con TB pulmonar; TB+DBT: sujetos con TB y DBT; Glc: glucosa; n.s.: no significativo. Resultados expresados como mediana y rango intercuartil.

Efecto del cambio de osmolaridad y del tratamiento con glucosa sobre la viabilidad celular y producción de IL-1 β en macrófagos derivados de la línea celular THP-1

La mayor dosis de manitol utilizada incrementó la apoptosis temprana (**Figura 3** panel **A**) y tardía (**Figura 3** panel **B**) en los cultivos estimulados con *Mtbi* respecto de los cultivos estimulados y tratados con las demás dosis de manitol. Por otro lado una hiperosmolaridad del medio disminuyó la producción de IL-1 β (**Figura 3** panel **C**) en los cultivos estimulados, observándose los menores niveles frente a la mayor dosis de manitol utilizada.

El tratamiento con la mayor dosis de Glc (40mM) presentó un aumento de la apoptosis temprana (**Figura 4** panel **A**) sólo en los cultivos sin estimular, respecto de aquellos tratados con Glc 5 y 10mM mientras que no se observaron cambios en la apoptosis tardía (**Figura 4** panel **B**). Por otro lado, los niveles de IL-1 β (**Figura 4** panel **C**) de los cultivos estimulados se vieron incrementados frente a las mayores dosis de Glc utilizadas (10, 20 y 40mM).

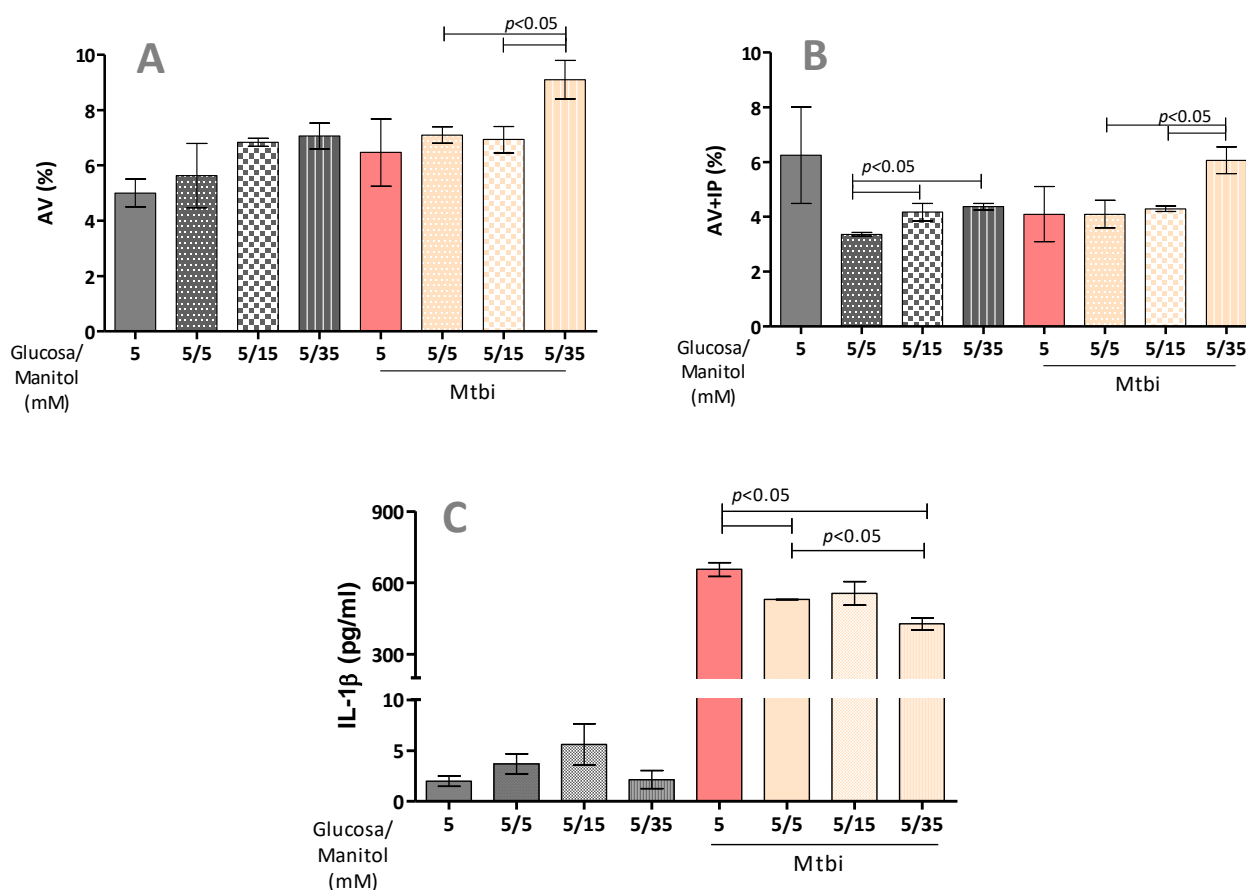


Figura 3: Efecto de la osmolaridad sobre la apoptosis temprana (panel A), tardía (panel B) y producción de IL-1 β (panel C) en macrófagos derivados de la línea THP-1 estimulados o no con *Mtbi*. Se utilizaron dosis conjuntas de glucosa (5mM) y manitol (5, 15 o 35mM). AV: anexina V; IP: yoduro de propidio.

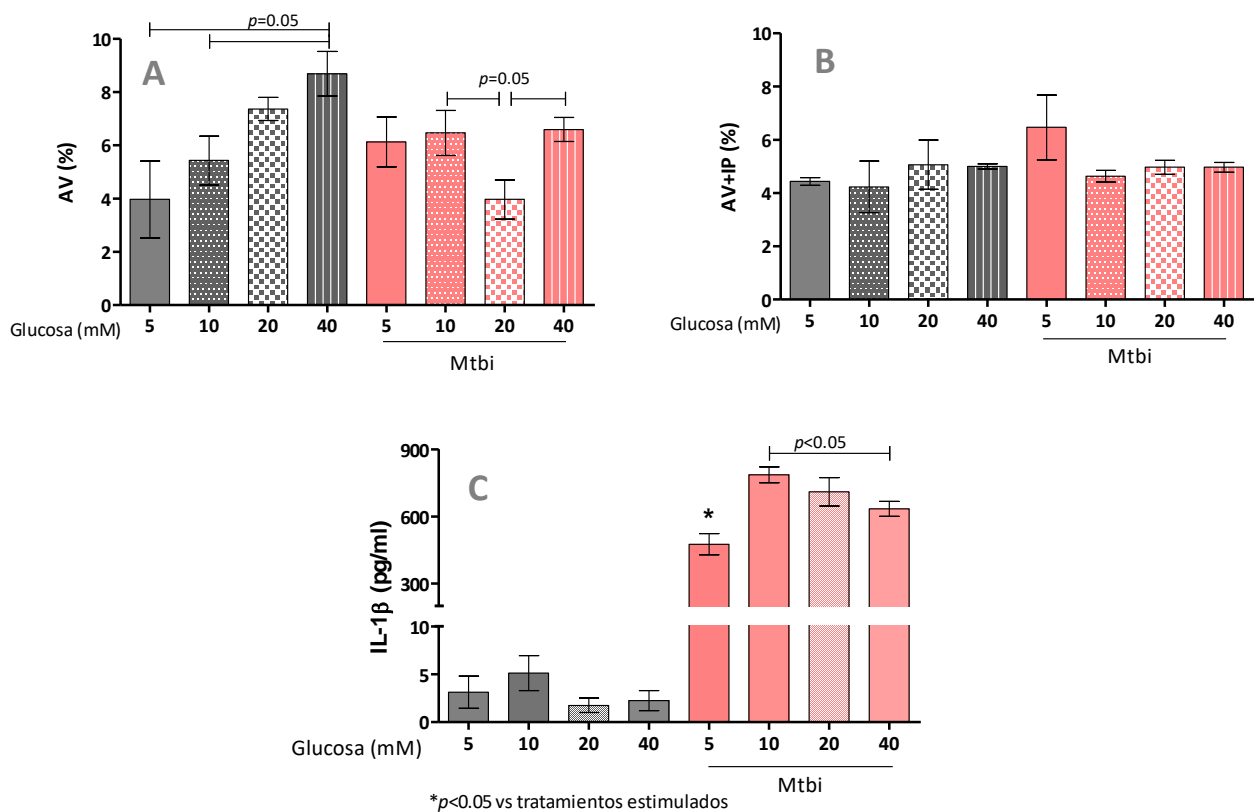


Figura 4: Efecto de las dosis de glucosa sobre la apoptosis temprana (panel A), tardía (panel B) y producción de IL-1 β (panel C) en macrófagos derivados de la línea THP-1 estimulados o no con *Mtbi*. AV: anexina V; IP: ioduro de propidio.