



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
Área Químico-Biológicas

Influencia del Sistema Nervioso Autónomo en la  
Inmunopatogenia de la Tuberculosis Pulmonar  
Experimental

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

Tovar Calderón Yanet Estrella

403054743

Director

Dra. Diana Elodia Aguilar León

Asesor

Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez

México D.F

SEPTIEMBRE 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

Ha sido Dios el que siempre me dio la fortaleza para continuar en cada paso de mi vida, es por eso que este trabajo se lo dedico a Él, porque siempre me dio la sabiduría necesaria para seguir por el camino correcto.

A mi Madre la mujer mas bella que jamás conocí, luchadora incansable, siempre buscando lo mejor para su hija; se que este trabajo es la culminación de todos tus esfuerzos, gracias por enseñarme que la vida solo es una y la tienes que vivir al máximo, disfrutando cada una de las pequeñas de la vida; en mi recuerdo siempre estarán tus palabras de aliento y los valores infundidos. Todo lo que soy te lo debo a ti, te dedico con mucho amor cada éxito, no me equivoco cuando digo que tengo a la mejor madre del mundo.

A ti Clarita, siempre estuviste ahí para compartir mis metas eres admirable y una mujer increíblemente fuerte.

A Moisés que llego en el momento justo a nuestras vidas gracias por todo ese apoyo; a Daniel por todas sus sonrisas que siempre me motivan a llegar al final de todo voy a estar contigo siempre hermanito.

A mis tíos, Martín, Pedro, Bernardino y Luz que me dieron cada uno un pedacito de su tiempo pero sobre todo su amor para que nunca me sintiera sola.

A quien se fue muy rápido de nuestro lado pero la llevo en mi corazón, por su confianza, apoyo y amor, gracias tía Mercedes. Tío Memo, Vero, Memo, gracias por todo.

A todos aquellos que siempre tuvieron una palabra de aliento para mi, les agradezco todos esos consejos pero sobre todo gracias por escucharme.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por permitirme haber ingresado a su grupo de trabajo, y brindarme todas las facilidades para el desarrollo y enriquecimiento de este trabajo, así como sus concomimientos transmitidos.

A Diana por todo su apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio del mismo modo por todos los conocimientos compartidos para terminar este trabajo pero sobre todo gracias por tu tiempo.

A todos mis compañeros de laboratorio por brindarme su tiempo y explicarme cada una de mis dudas.

A mis sinodales por su tiempo invertido en revisar este trabajo.

Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez

Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán

Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz

Dr. Rubén Marroquín Segura

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	5
Tuberculosis.....	5
Organización del sistema simpático.....	7
Catecolaminas.....	9
<i>Almacén y depósito</i> .....	9
<i>Síntesis de catecolaminas</i> .....	10
<i>Liberación de catecolaminas</i> .....	12
<i>Vía de comunicación entre el nervioso central y sistema inmunológico</i> ... 13	
Modelo murino Dr. Rogelio Hernández Pando del INCMNSZ.....	15
<i>Fase temprana respuesta Th1</i> .....	15
<i>Fase temprana respuesta Th2</i> .....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
Modelo experimental.....	21
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	30
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	37

## RESUMEN

La tuberculosis es una importante enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones, provocando 3 millones de muertes a nivel mundial. Durante los procesos de estrés crónico, como lo es la tuberculosis pulmonar, las neuronas del núcleo paraventricular son activadas así el sistema inmunológico interactúa activamente con el sistema endócrino y nervioso.

El objetivo fundamental del presente estudio es analizar la participación del sistema nervioso simpático en la regulación del sistema inmune durante el curso de la tuberculosis pulmonar experimental. Para lo cual se empleó un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresivo ampliamente caracterizado en ratones singénicos Balb/c. Dicho modelo consiste en infectar por vía intratraqueal micobacterias vivas de la cepa virulenta H37Rv, manejando grupos de 6 animales los cuales se sacrificaron en intervalos de tiempo establecidos (1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120 días), tres pulmones se destinaron para la cuantificación de catecolaminas por HPLC, y 3 de los pulmones restantes se utilizaron para realizar citometría de flujo para determinar el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> y macrófagos que expresen receptores beta-adrenérgicos tanto  $\beta$ 1 como  $\beta$ 2 utilizando como controles las glándulas adrenales. Los resultados obtenidos indican una evidente participación del sistema nervioso simpático, particularmente de la noradrenalina visto por cuantificación HPLC, así como la expresión de receptores  $\beta$ -adrenérgicos tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> y macrófagos existiendo un aumento de la expresión después de 15 días de la infección.

## **INTRODUCCIÓN:**

La tuberculosis (Tb) es una causa importante de enfermedad y muerte en el mundo, se estiman 8.9 millones de nuevos casos y 1.7 millones de muertes cada año. La tercera parte de la población mundial está infectada con el agente causal de esta enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis*. La Tb continúa siendo la primera causa de morbilidad y mortalidad ocasionada por un solo agente infeccioso en el mundo, a pesar de lo cual, el conocimiento de su inmunopatogénesis continúa siendo incompleto. La Tb es una enfermedad infecciosa crónica y es capaz de producir alteraciones profundas y de larga evolución sobre el sistema inmunológico.

En el modelo de Tb pulmonar utilizado se reconocen dos fases: La primera (fase aguda o temprana) corresponde al primer mes de infección y se caracteriza por la presencia de inflamación mononuclear en el compartimiento intersticial, perivascular y peribronquial con granulomas cuya formación inicia a las 2 semanas de infección. Junto con esta fase se observa un patrón de citocinas tipo Th1 capaz de brindar un control temporal a la enfermedad. La segunda fase (fase crónica) va del primero al cuarto mes de infección, en ella ocurren cambios indicativos de recaída (neumonía progresiva y necrosis) en coexistencia con un balance de citocinas mixto Th-1/Th-2.

La tesis que postula una relación directa entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico ha ido consolidándose a través de los años. Actualmente se reconoce que dicha comunicación ocurre a través de diversas vías; una de ellas lo constituye el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, capaz de producir cortisol ante ciertos estímulos como el estrés. Otra vía importante lo constituye el sistema nervioso autónomo, principalmente (aunque no exclusivamente) su rama simpática. El sistema nervioso simpático es capaz de modificar ciertos parámetros fisiológicos con el fin de procurar la supervivencia ante situaciones de peligro o estrés, a lo que se ha denominado respuesta de “lucha o huida” (Fight or flight).

De la misma manera se ha postulado que un estímulo bacteriano o viral podría así mismo inducir cambios en la actividad de las células del sistema inmune, a través de la actividad simpática, con el fin de sobrevivir a la infección . Se sabe que la activación del sistema nervioso simpático provoca la liberación de catecolaminas, las cuales son capaces de afectar de manera directa a las células del sistema inmune. Se ha visto por otro lado que el estímulo con antígenos microbianos (microorganismos patógenos), en tan solo unos minutos, es capaz de incrementar la frecuencia de disparo de neuronas noradrenérgicas del bazo. Los órganos linfoides tanto primarios como secundarios poseen una rica inervación adrenérgica, ésta se encuentra adyacente a las zonas ricas en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, así como en la vecindad de macrófagos y linfocitos B.

Tomando en cuenta la relación que involucra el sistema nervioso con el sistema inmune este estudio se orienta principalmente a la cuantificación de noradrenalina en los tejidos tisulares a lo largo de la infección, así como la expresión de receptores beta-adrenérgicos tanto en linfocitos Th1 como Th2 así como linfocitos T citotóxicos y revalidar a través de este tipo de experimentación teorías que mencionan que en promedio se cree que cada célula T posee de 200 a 750 receptores  $\beta_2$ , mientras que estudios sugieren que los linfocitos B poseen el doble.

## MARCO TEÓRICO

### Tuberculosis

La Tb es una enfermedad contagiosa y crónica de distribución mundial, causada fundamentalmente por el patógeno infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* perteneciente al orden Actinomycetales, a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Han sido aisladas 58 especies de *Mycobacterium* y de ellas una docena son capaces de producir patologías en humanos, aunque las más frecuentes son: *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*; *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo, grampositivo, aerobio estricto, de forma bacilar, delgado y ligeramente curvado; aproximadamente mide 4  $\mu$  de longitud, es ácido-alcohol resistente y de crecimiento lento en los cultivos sintéticos donde se observan como colonias rugosas en forma de cordones o bandas serpentinadas; es muy resistente al frío, la congelación y la desecación pero por el contrario muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. En circunstancias desfavorables puede hacerse latente y se conserva en el tejido necrosado durante años, cambiando su metabolismo de un rápido crecimiento aerobio a un lento crecimiento anaerobio [1].

Los bacilos tuberculosos humanos se transmiten ordinariamente por inhalación de microgotas de Pflüger expulsadas al aire por la tos, el estornudo o el habla de pacientes con focos tuberculosos pulmonares en comunicación con las vías aéreas.

Se plantea que con sólo la inhalación de uno o dos bacilos viables se puede producir una infección activa. También está reportado el contagio por vía digestiva a través de alimentos contaminados. Rara vez sirven de puerta de entrada las conjuntivas o las zonas de punción cutánea. El nombre de tuberculosis deriva de la formación de unas estructuras celulares características donde quedan encerrados los bacilos, denominadas tuberculomas o granulomas, la infección se localiza en los pulmones con mayor frecuencia, aunque puede afectar cualquier tejido del organismo produciendo un amplio espectro de estados de la enfermedad [2].

La Tb ha sido declarada por la OMS como una enfermedad emergente de repercusión mundial, figura en el primer lugar como causa de muerte asociada a enfermedades infecciosas en todo el mundo. Se estima que cada año aparecen 8 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes atribuidas a esta enfermedad, y los países en vía de desarrollo son los más afectados. Un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y entre un 5-10% de las personas infectadas desarrollarán la enfermedad en algún momento de su vida. Se estima que en el periodo comprendido entre el 2000 y el 2020, cerca de mil millones de personas se infectarán por el bacilo, 200 millones enfermarán a causa de la Tb y la misma cobrará la vida de alrededor de 35 millones de personas [2].

## **Organización del Sistema Nervioso Simpático**

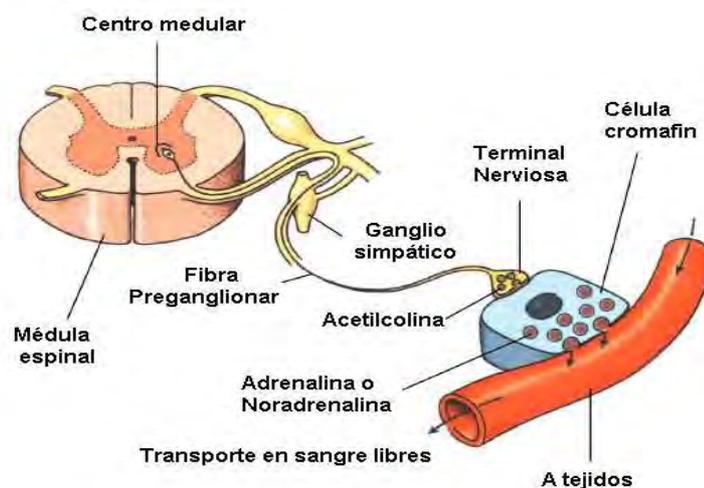
El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) regula la función de todos los tejidos y órganos inervados en todo el cuerpo de vertebrados, con excepción de las fibras musculares esqueléticas. Por lo tanto, constituye el principal componente eferente del sistema nervioso periférico, que contiene las conexiones neuronales de integración e incluso completa los arcos reflejos [3]. El SNA es en gran parte autónomo (independiente) es decir sus actividades no están bajo directo control consciente. El SNA consta de tres componentes: el sistema simpático (noradrenérgico), sistema parasimpático (colinérgico), que se originan en el Sistema Nervioso Central (SNC) (con células en los órganos creados en virtud de tronco cerebral y médula espinal), y el sistema entérico, que se encuentra en la pared del tracto gastrointestinal. El más extenso y diverso fisiológicamente componente es el SNS, por los axones que envía a todas las partes del cuerpo. El sistema de recubrimiento entérico, que contiene un número similar de neuronas en la médula espinal, regula las funciones intestinales; este sistema es modulado por las proyecciones de los sistemas simpático y parasimpático [4].

La división simpática se origina en los núcleos del tronco cerebral y da lugar a fibras eferentes preganglionares que salen del SNC a través de los nervios torácicos y lumbares. La mayoría de las fibras preganglionares simpáticas terminan en los ganglios situados en las cadenas paravertebrales que se encuentran a ambos lados de la columna vertebral. El resto de los ganglios simpáticos se encuentran en los ganglios prevertebrales, que se encuentran

delante de las vértebras. A partir de estos ganglios, simpáticos postganglionares llegan a las fibras de los tejidos inervados [5].

La mayoría de las fibras simpáticas postganglionares liberan noradrenalina (NE), son fibras noradrenérgicas, es decir, actúan por la liberación de NE. La médula suprarrenal contiene células cromafines, embrionarias y anatómicamente homólogas a la parte simpática de los ganglios en la medida en que se derivan de la cresta neural. La médula suprarrenal, a diferencia de las terminales postganglionares del nervio simpático, libera adrenalina, principalmente, y en menor medida, NE (proporción aproximada 4:1); las células cromafines de la médula suprarrenal están inervadas por terminales tipo preganglionares del nervio simpático, cuyo neurotransmisor es acetilcolina. Por lo tanto, los principales productos finales del SNS es NE y epinefrina, llamadas catecolaminas (CAs) [6].

(Figura 1)



**Figura 1.** Conformación de las fibras que liberan noradrenalina

## **Catecolaminas**

### ***Almacén y depósito***

El sistema simpático suprarrenal está constituido por el sistema nervioso parasimpático con nervios colinérgicos pre y posganglionares, sistema nervioso simpático con nervios colinérgicos preganglionares y adrenérgicos posganglionares y médula suprarrenal, la cual es una extensión del sistema nervioso simpático [7].

El almacén y depósito de catecolaminas se realiza en vesículas o gránulos en las neuronas, se concentran en las varicosidades existentes a lo largo de los axones. Las pequeñas cantidades de catecolaminas presentes en forma libre en el citoplasma son metabolizadas por la monoaminoxidasa (MAO). La membrana de estos gránulos tiene un sistema de transporte que requiere ATP y magnesio, mediante el cual genera un gradiente que conlleva la entrada del neurotransmisor y la salida de protones de la vesícula. En el interior se encuentran 4 moléculas de noradrenalina unidas a una de ATP, proteínas acídicas específicas llamadas cromagraninas y la enzima DBH [8].

## ***Síntesis de catecolaminas***

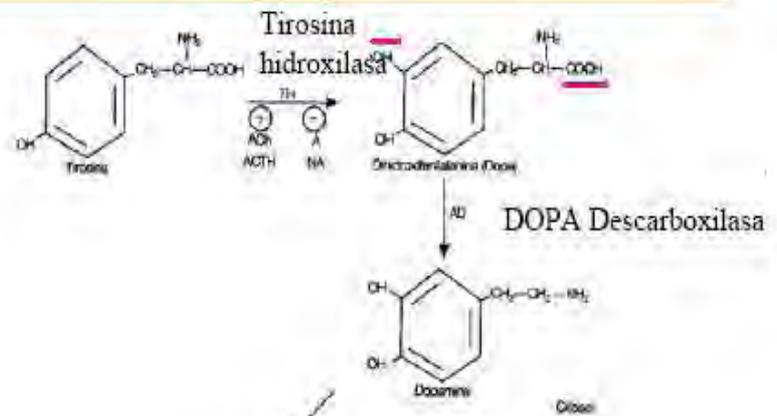
La noradrenalina, junto con la dopamina y la adrenalina, son tres sustancias naturales que se encuadran dentro de las catecolaminas y que poseen un grupo aromático común, denominado catecol (3,4-dihidroxifenilo), al que se unen diferentes cadenas laterales. La síntesis de catecolaminas se inicia en el aminoácido L-tirosina procedente de la dieta, o de la fenilalanina, que penetra, por transporte activo, en la célula nerviosa. La tirosina es hidroxilada en el anillo fenólico por mediación de la tirosina-hidroxilasa (Tir-OH). Esta enzima se encuentra en la fracción libre del citosol de neuronas exclusivamente catecolaminérgicas y requiere oxígeno molecular, hierro y tetrahidrobiopterina como cofactor. La Tir-OH es el verdadero paso limitante en la velocidad de biosíntesis de catecolaminas [9].

La hidroxilación de la tirosina, por mediación de la Tir-OH, convierte a este aminoácido en L-dihidroxifenilalanina (L-dopa), proceso que constituye el segundo paso en la síntesis intracelular de catecolaminas (Figura 2). En efecto, la L-dopa es rápidamente descarboxilada y convertida en dopamina, por acción de la dopa-decarboxilasa, que emplea como cofactor la vitamina B6 (piridoxal-fosfato). Esta enzima se encuentra también en la fracción citoplasmática libre. El siguiente paso viene regulado por la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH). Al igual que la Tir-OH, esta enzima es una oxidasa que emplea oxígeno molecular para formar el grupo hidroxilo que se añade, en posición  $\beta$ , a la cadena lateral de la dopamina, produciendo la noradrenalina.

La DBH es una metaloproteína que contiene cobre. Este metal está implicado en la transferencia de electrones, proporcionados por la conversión del ácido ascórbico en dihidroascorbato. La DBH se encuentra ligado a las membranas de las vesículas o en su interior, por lo que la dopamina debe penetrar en ellas para convertirse en noradrenalina [9].

## SÍNTESIS CATECOLAMINAS

Las catecolaminas son monoaminas unidas a un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo (catecol).



## Activación por ACTH y cortisol

TH: anillo fenólico.  
Tetrahidrobiopterina.

DOPA-DESCARBOXILASA  
(piridoxalfosfato)

DBH: Gpo. posición B. cadena lateral.  
metaloproteína.

PNMT: fenil-etanol-amina-N-metiltransferasa.

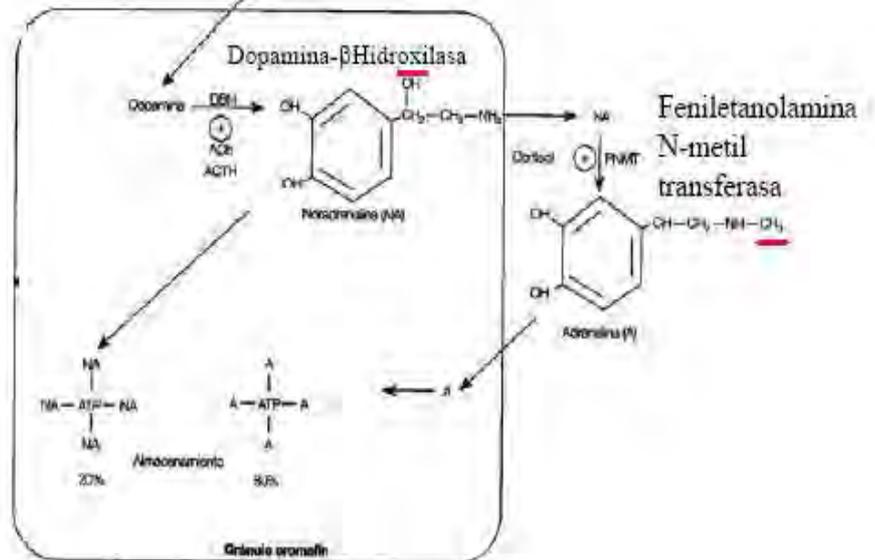


Figura 2. Síntesis de catecolaminas

### ***Liberación de catecolaminas***

El proceso de liberación de catecolaminas tiene lugar como consecuencia de la llegada de un impulso nervioso, que hace que una masiva cantidad de calcio penetre en el interior de la célula, a través de los canales dependientes del voltaje. Las vesícula tiene una proteína (sinaptotagmina) capaz de detectar el incremento de las concentraciones citoplásmicas de calcio y, como consecuencia de ello, facilitar la fusión de proteínas de la vesícula. Finalmente un complejo formado de proteínas (NSF y S-nitroso-N-acetil-panicilamana "SNAP") permite la fusión de vesícula y membrana generando la exocitosis [10].

Existe un mecanismo independiente del calcio, por el que se liberan de forma indirecta noradrenalina a través del transportador responsable de la recaptación, que actuaría en sentido inverso; este fenómeno puede producirse bien por un aumento de potasio intracelular. Una vez liberado el neurotransmisor, la finalización de la acción de la noradrenalina tiene lugar a través de dos mecanismos; por un lado la recaptación neuronal y, por otro la metabolización enzimática [10].

### **Vía de comunicación entre el sistema nervioso central e inmunológico**

La presencia de las fibras nerviosas simpáticas en órganos linfoides y la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas ubicadas en las inmediaciones de las células inmunitarias proporcionan un mecanismo por el cual la norepinefrina puede influir en la función de las células inmunes [11].

Tras la liberación, la noradrenalina se une a los receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos expresados en la superficie de una variedad de células inmunes a la influencia de su actividad. La acción de nervios simpáticos originarios del SNC puede ser influenciada por los productos de las células inmunitarias activas, ya que circulan una gran diversidad de citocinas y las células son transportadas en forma activa para influir en el SNC; por otro lado la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos expresados en los nervios periféricos influye en la expresión de citocinas e influye en su actividad periférica. Más importante aún, el aumento del número de linfocitos que entran en el sistema nervioso central producen citocinas y anticuerpos que pueden proteger o contribuir a una serie de patologías del SNC [12].

Por último, la producción de hormonas derivadas de la activación del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HPA) también puede influir en la actividad del sistema inmune. Uno de los mecanismos por los cuales la señal del sistema inmune puede regular la actividad del sistema nervioso es a través de la estimulación de los receptores de citocinas expresadas tanto en las células dentro del SNC y sobre los nervios periféricos así como los ganglios simpáticos. La estimulación de receptores de citocinas sobre los nervios periféricos y los ganglios altera el nivel de actividad aferente del SNC, posiblemente por la transducción de señales. Pero más importante aún, la alteración en el nivel de actividad del SNC puede alterar el nivel de acción y liberación de nervios eferentes de neurotransmisores en la periferia. Así, la producción periférica de citocinas puede influir en los nervios eferentes [13].

Las células T también tienen receptores adrenérgicos en su superficie, la activación de estos puede interactuar con los acontecimientos que acompañan a estas células. Si el receptor es  $\beta_1$  adrenérgico con noradrenalina desencadena la activación de una cascada de acontecimientos mediada por proteína G, lo que lleva a una mayor actividad de adenilato monofosfato de adenosina ciclasa intracelular (cAMP) y la actividad de la proteína cinasa [14]. Una amplia gama de eventos bioquímicos intracelulares y procesos son conocidos por ser afectados por el cAMP. Uno que está directamente relacionado con la activación de las células T está asociado a la actina del citoesqueleto de montaje. Se ha demostrado que las células T en este proceso se encuentran bloqueadas por los mediadores  $\beta$ -adrenérgicos por aumento de cAMP. [15]. En general, la alta concentración intracelular de cAMP se asocia con una disminución de la proliferación celular. La activación de un receptor  $\beta$ -adrenérgico, por lo tanto, trabaja en contra de los acontecimientos desencadenados por la activación del receptor del linfocito-T [16].

Otros subtipos de receptores adrenérgicos desencadenan diferentes cascadas como segundos mensajeros. Los receptores  $\alpha_2$ -están vinculados a una proteína G inhibitoria, lo que reduce los niveles de cAMP. Su efecto, por lo tanto, son opuestos a los de un  $\beta$ -receptor; anteriormente se pensaba que el receptor  $\beta_2$  se expresaba sólo en linfocitos Th1, sin embargo estudios recientes han demostrado la existencia y capacidad de respuesta de dicho receptor en células Th2 [17].

## **Modelo murino Dr. Rogelio Hernández Pando del INCMNSZ**

El modelo experimental corresponde a un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, el cual se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad [18].

### ***Fase temprana respuesta Th1***

La primera fase es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, y se forman sistemáticamente granulomas en la segunda semana de infección [19].

Los granulomas son las estructuras histopatológicamente distintivas de la tuberculosis y corresponden a un tipo de inflamación crónica producida por la presencia de material poco o no biodegradable [19]. Los granulomas están constituidos por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos y se les considera como las estructuras fundamentales para contener a las bacterias. Durante la fase temprana de la infección en nuestro modelo experimental, específicamente en la segunda semana post-infección los granulomas empiezan a formarse y una semana después alcanzan su máxima madurez [19].

Estos granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio intersticial y perivascular coexistente están constituidos principalmente por linfocitos T CD-4 de tipo 1 productores de las citocinas interferón gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) y macrófagos activados productores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) [20].

### **Fase progresiva respuesta Th2.**

La segunda etapa de la enfermedad en este modelo experimental corresponde a la fase avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por gran incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conduce a la muerte [21]. Desde el punto de vista inmunológico, durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2), los cuales se caracterizan por producir las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13 [22]. En consecuencia, consideramos que la presencia de los linfocitos Th-2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th-1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria [23].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El sistema inmunológico interactúa activamente con el sistema endócrino y nervioso a lo largo de la infección con tuberculosis por lo que se piensa que los linfocitos que participan en la respuesta Th1 y Th2 expresan adrenoreceptores de tipo  $\beta 1$  y  $\beta 2$  para llevar a cabo la liberación de noradrenalina y de esta manera favorecer un desbalance de citocinas a lo largo de la enfermedad, por lo que su medición y marcaje será de suma importancia para lograr comprender su comportamiento durante el transcurso de la tuberculosis.

## **HIPÓTESIS**

Durante el desarrollo de la tuberculosis pulmonar experimental se presentarán cambios en la concentración tisular de catecolaminas provocando una inhibición de la respuesta Th1 para posteriormente propiciar una respuesta inmune de tipo Th2, fomentando un desbalance de citocinas que contribuirá a la progresión de la enfermedad

## OBJETIVOS

- Analizar la participación del sistema nervioso simpático en la regulación del sistema inmune durante el curso de la tuberculosis pulmonar experimental.
- Utilizando un modelo murino de tuberculosis pulmonar, determinar las concentraciones tisulares de noradrenalina en pulmón.
- Analizar la expresión de adrenoreceptores tanto  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en linfocitos T a lo largo de la enfermedad
- En caso de encontrar cambios en la concentración tisular de noradrenalina a lo largo de la infección, discutir el papel que podrían tener dichos cambios en el sistema inmune, así como en el balance de citocinas hacia condiciones que podrían contribuir a la progresión de la enfermedad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Inicialmente se hizo un preparado de la micobacterias cepa virulenta H37Rv como se indica a continuación:

El crecimiento de la micobacteria se realizó en medio Middlebrook 7H9 Broth el cual se preparó según las indicaciones del fabricante (4.7 g de polvo en 900 mL de agua destilada adicionando 5 mL de glicerol), se esterilizó en autoclave a 121°C por 10 minutos, una vez esterilizado se dejó enfriar 37°C.

Una campana de bioseguridad tipo 3 se limpió perfectamente y se procedió a adicionar 100 mL de ADC (albúmina, glucosa, catalasa) enriquecimiento BD por cada 900 mL de medio, se homogenizó y vertió en botellas de cultivo de 600 mL dejándolas en la incubadora por 3 días a 37°C y en 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo se recuperó la micobacteria en una campana de bioseguridad tipo 3 la cual se limpió perfectamente, se colectó la micobacteria en tubos Falcon de 50 mL, se centrifugó a 2500 rpm, 10 min. El sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en 5 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) Tween 80 0.05% se colocaron perlas de vidrio de 0.03 cm estériles y se cerró perfectamente el tubo dejándolo en agitación a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente se agitaron los tubos en vortex durante 1 min y se dejó reposar 1 min esto se realizó 10 veces, se centrifugó a 2500 rpm 15 min, y se repitió el proceso de homogenizado para posteriormente centrifugar de nuevo a 1500 rpm

15 min. Se recuperó el sobrenadante colocándolo en un tubo nuevo de 50 mL y se lavó dos veces con PBS estéril guardándolo a -70° C.

Tres días antes de la inoculación las bacterias se pasaron de -70°C a -20°C por 1 día y al siguiente se colocaron en refrigeración (evitando la descongelación brusca) una vez descongelada se hizo un lavado con PBS estéril para eliminar las bacterias muertas y se procedió a realizar la cuenta de la siguiente manera:

En campana de bioseguridad tipo 3, se colectó la bacteria ya recuperada con anterioridad en tubos de 50 mL, adicionando PBS o SSI (solución salina isotónica) estéril llevando a 20 mL, se colocaron las perlas de vidrio de 0.3 cm estériles y se selló perfectamente el tubo.

Se agitaron los tubos en vortex 1 min y se dejaron reposar 1min, este procedimiento se realizó 10 veces, centrifugando a 2500 rpm 15 min, se repitió el proceso de homogenizado y centrifugado a 1500 rpm 15 min. El sobrenadante se recuperó colocándolo en un tubo nuevo de 50 mL y se lavó con PBS o SSI estéril (1:3). Se centrifugó a 2500 rpm 5 min, eliminando el sobrenadante y nuevamente se lavó con PBS o SSI estéril.

Se volvió a centrifugar a 2500 rpm 5 min, eliminando el sobrenadante y se resuspendió en volumen final de 5 mL de PBS o SSI para proceder a la cuenta.

La cuenta de micobacterias se realizó preparando con anterioridad una solución stock de DAF (Diacetato de Fluoresceína) disolviendo 5 mg de DAF en 1 mL de acetona fría conservándola a -20° C hasta su uso; a continuación a partir de esta solución stock se preparó una solución de trabajo homogenizando 12.5 µL de la

solución stock en 1 mL de PSB o SSI. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 de la siguiente manera:

1  $\mu$ L de muestra (H37Rv)

49  $\mu$ L de solución de trabajo

50  $\mu$ L de PBS o SSI

El volumen de la muestra utilizado para la dilución se tomó de los 5 mL recuperados anteriormente de las micobacterias; esta dilución se incubó por 20 minutos protegida de la luz para posteriormente leer al microscopio y con la siguiente fórmula obtener el número total de micobacterias.

$$\text{No. bacterias/mL} = \frac{\text{No. micobacterias contadas}}{\text{No. cuadrantes contados}} \times \text{dilución} \times 10^4$$

Se ajustó a 250, 000 bacterias por 100  $\mu$ l de solución y este volumen es lo que se inoculó a cada animal vía intratraqueal utilizando una cánula especial y como anestésico y relajante sevofluorano.

## **Modelo experimental**

Se utilizaron 50 ratones de la cepa Balb/c de entre 6 y 8 semanas de edad, los cuales fueron inoculados vía intratraqueal con  $2.5 \times 10^5$  bacterias vivas de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* contenidas en 100 $\mu$ L de solución salina isotónica. Los animales se sacrificaron en grupos de 6 y en tiempos ya establecidos de 1,3,7,14,21,28,60 y 120 días post-infección, de los cuales se obtuvieron pulmones alternados izquierdo y derecho así como las glándulas adrenales los cuales fueron utilizados para FACS (citometría de flujo) y HPLC (cromatografía líquida) respectivamente.

## **Citometría de flujo (FACS)**

### ***Determinación de receptores B1 Y B2 en pulmón por citometría***

Tres pulmones y glándulas adrenales de cada sacrificio (1, 3, 7, 14, 21, 28,60 y 120 días después de la infección) se obtuvieron en esterilidad bajo campana de flujo laminar y fueron colocados en un criotubo con 1mL de medio RPMI (medio

suplementado) GIBCO y 4  $\mu$ L de colagenasa tipo II. Posteriormente se disgregaron los órganos en tubos independientes utilizando una coladera (cell steiner BD Falcon) para cada tejido y el homogenizado se colectó en tubos falcon de 50 mL, se añadió aproximadamente 2mL de SSI para lavar. Los tubos fueron centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, los adrenales se resuspendieron en 200  $\mu$ L de RPMI. A los pulmones se les añadió amortiguador de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  + EDTA) para retirar glóbulos rojos, los tubos fueron centrifugados 2000 rpm durante 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y a cada muestra se le agregó 1 mL de SSI y se centrifugó 2000 rpm durante 5 minutos eliminando el sobrenadante. Cada pulmón se resuspendió en 1000  $\mu$ L de RPMI.

Se contaron las células que había en cada muestra en cámara de Neubauer realizando una dilución 1:100 de la muestra con azul de tripano, contadas las células se ajustó el volumen para obtener  $1 \times 10^6$  células y marcarlas con anticuerpos anti ( $\text{CD4}^+$  Cy-chrome BD,  $\text{CD8}^+$  ficoeritrina BD,  $\text{CD11b}^+$  FITC BD y para las adrenales se utilizó anticuerpo frío contra receptor  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , utilizando anticuerpo secundario marcado con Isocianato de fluoresceína BD) de la siguiente manera:

<b>Población a detectar:</b>	
<b>Ctrl</b>	
<b>CD4<sup>+</sup> / <math>\beta</math>1</b>	Linfocitos T CD4 con el receptor $\beta$ 1
<b>CD4<sup>+</sup> / <math>\beta</math>2</b>	Linfocitos T CD 4 con el receptor $\beta$ 2
<b>CD8<sup>+</sup> / <math>\beta</math>1</b>	Linfocitos T CTX con $\beta$ 1
<b>CD8<sup>+</sup> / <math>\beta</math>2</b>	Linfocitos T CTX con $\beta$ 2
<b>CD11b<sup>+</sup>/<math>\beta</math>1</b>	Macrófagos
<b>CD11b<sup>+</sup>/<math>\beta</math>2</b>	Macrófagos

Las células fueron leídas en un citómetro FACSCalibur ( BD Biosciences ) y se utilizó el programa Flow-Jo para analizar los datos.

### **Determinación de las concentraciones de noradrenalina en pulmón por HPLC**

Cada pulmón se homogenizó con un politrón (PT 3100 POLYTRON KINEMATICA) en un tubo de 1.5 mL conteniendo 600  $\mu$ L de solución de análisis (ácido perclórico 0.1M y ácido etilendiaminotetracético 0.1mM) en frío (4<sup>a</sup>C) . Los homogenizados fueron centrifugados a velocidad máxima 14 000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0.45  $\mu$ m (Millipore Millex) y almacenados a -70<sup>a</sup>C en oscuridad hasta su análisis. Los precipitados fueron disueltos en NaOH 10 mM para determinación de proteínas a través del método de Bradford. (ANEXO 1)

Para el HPLC se utilizó como eluyente o fase móvil el amortiguador acetonitrilo (95:5 v/v y pH 3.71). Dicho amortiguador contiene: ácido cítrico 12.16 mM, fosfato de amonio dibásico 11.60 mM, octilsulfonato de sodio 2.54 mM, fosfato de

dibutilamina 3.32 mM y EDTA disódico 1.11 mM. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min. La columna cromatográfica utilizada fue una Spherisorb ODS2 (Sigma Aldrich) de 4.6 mm de diámetro interno por 250 mm de longitud con partículas de silicón de 5  $\mu$ m. El sistema cromatográfico consistió en una bomba HPLC semi-micro marca JASCO Modelo PU-2085; un inyector automático WATERS 717 y un detector electroquímico DECADE II (Antec-Leyden SDC). Como sistema de adquisición y procesamiento de datos se utilizó el software Millennium 32 versión 3.

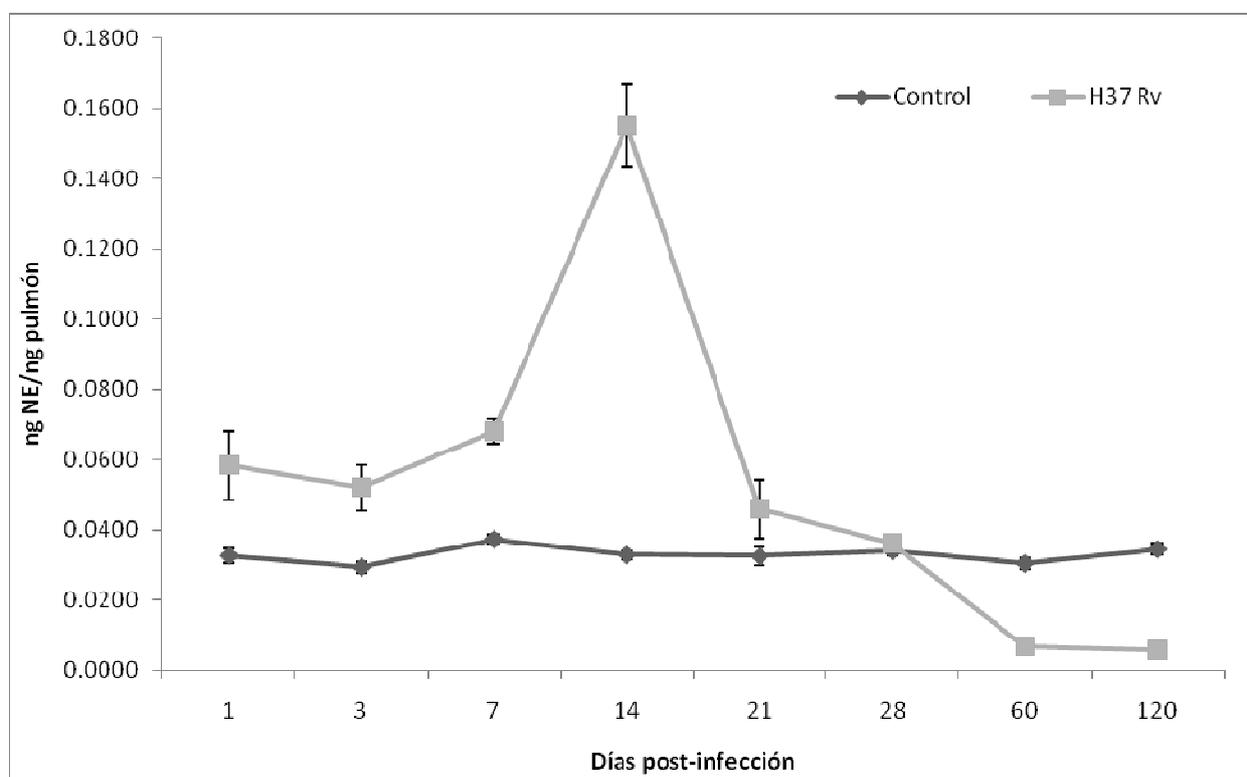
### **Análisis estadístico**

Se calculó como medidas descriptivas media y desviación estándar y como modelos de comparación la t de Student y ANOVA con prueba de Dunnet como stock; considerándose un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### Determinación de noradrenalina en tejido de pulmón a lo largo de la infección con tuberculosis por HPLC.

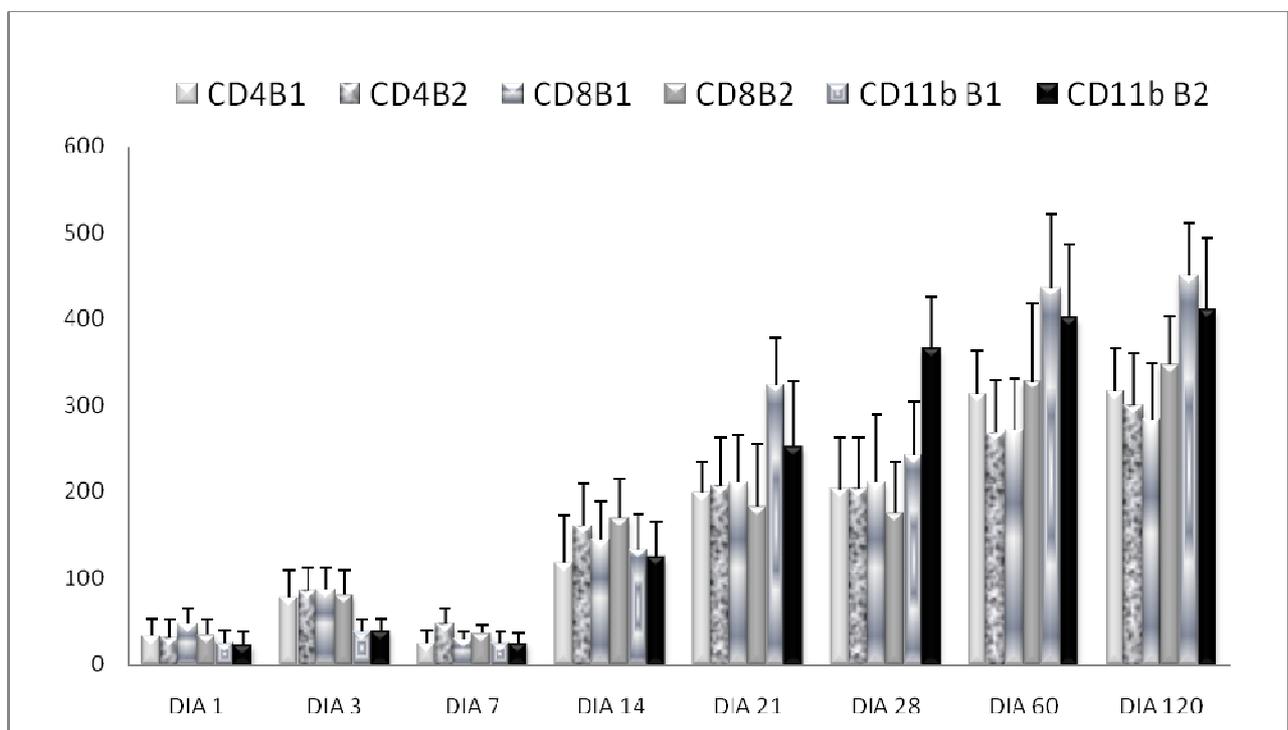
Extraído el tejido de pulmón y manipulado con la solución de análisis (ácido perclórico 0.1M y ácido etilendiaminotetracético 0.1mM) para HPLC se observó que a los 14 días post-infección hay un incremento de NA (Figura 3)



**Figura 3.** Cuantificación de noradrenalina expresada en ng de NA/mg pulmón por cada día de sacrificio post-infección 1,3,7,14,21,28,60,120 de los órganos infectados con H37Rv vs. Control.

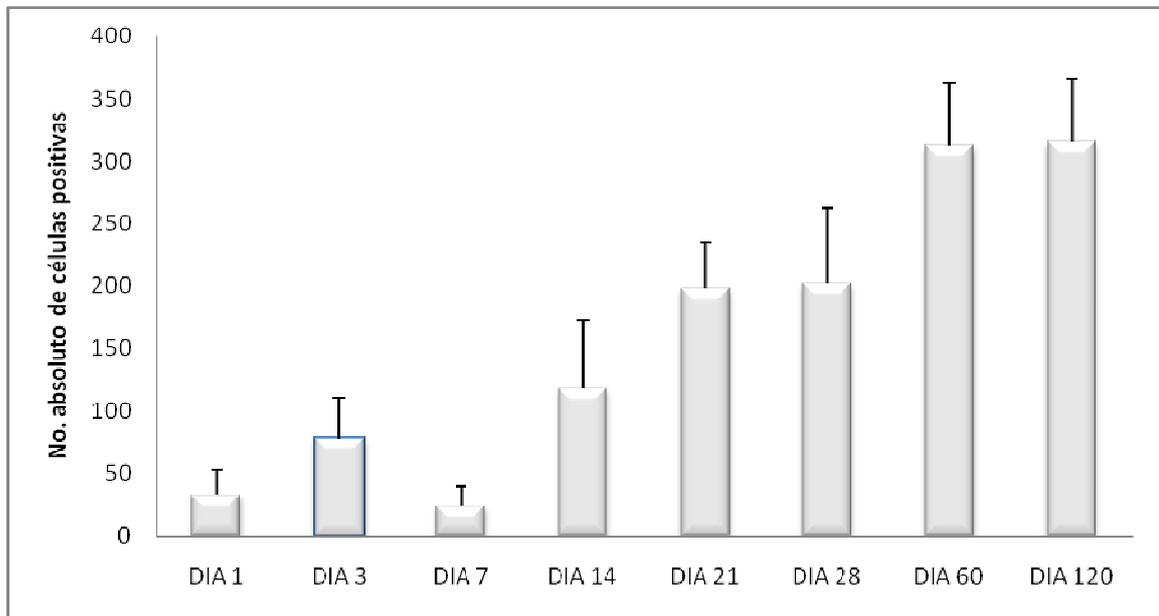
### Determinación de adrenoreceptores en linfocitos T

A partir del homogenizado de pulmón se procedió analizar las células marcadas para FACS, en donde pudimos observar que a partir del día 14 hay incremento en la expresión de linfocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> así como CD11b<sup>+</sup> (Figura 4).

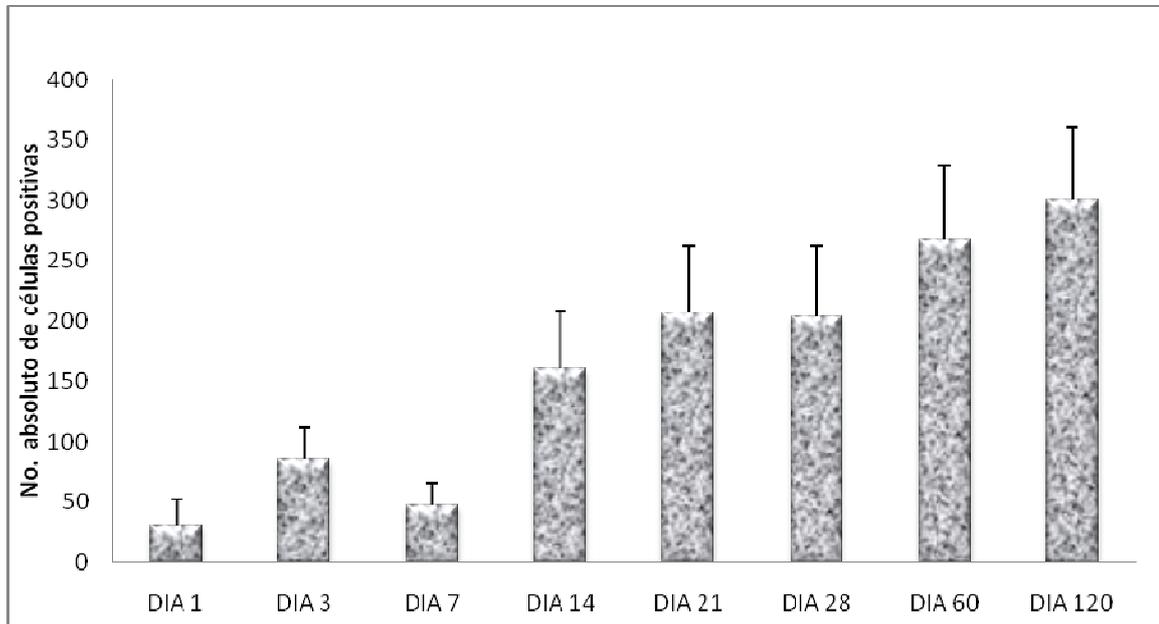


**Figura 4.** Expresión en número absoluto de adrenoreceptores en linfocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> así como en CD11b<sup>+</sup> durante la cinética de sacrificio post-infección.

**A)**

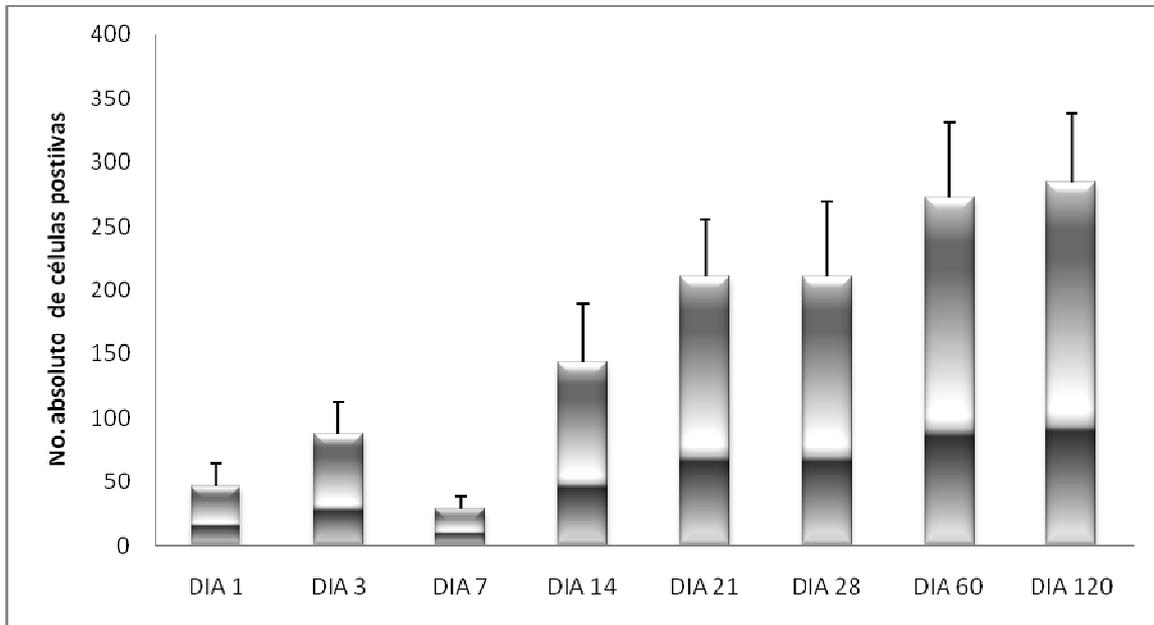


**B)**

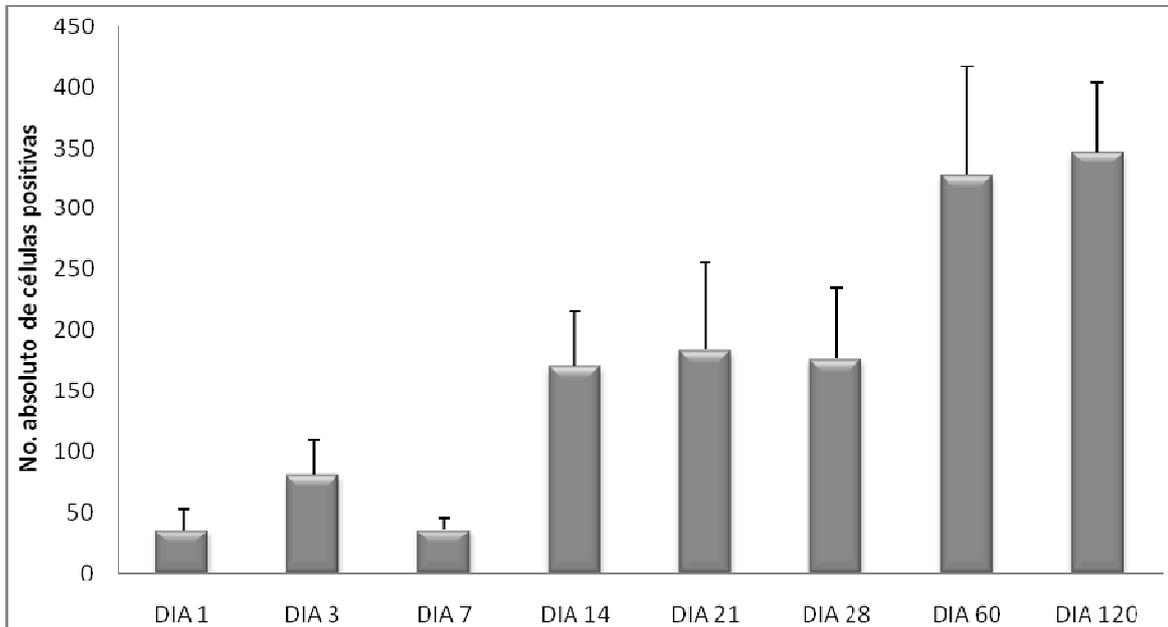


**Figura 5.** Expresión en número absoluto de adrenoreceptores en linfocitos durante la cinética de sacrificio post-infección. **A)** CD4<sup>+</sup> con receptor  $\beta$ 1 **B)** CD4<sup>+</sup> con receptor  $\beta$ 2

C)

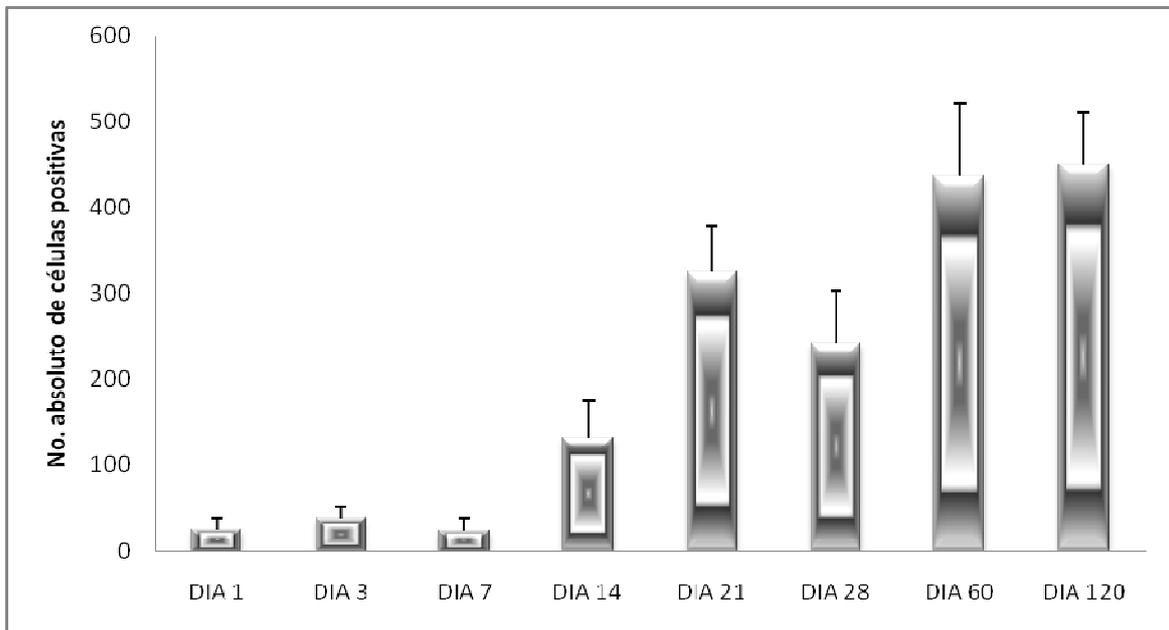


D)

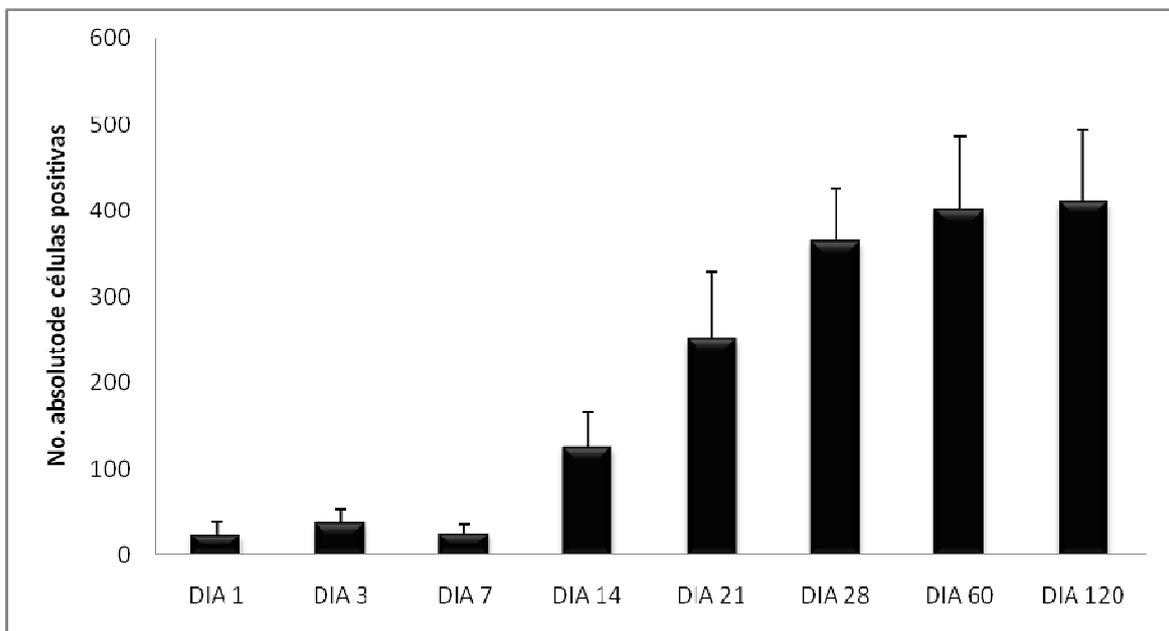


**Figura 6.** Expresión en número absoluto de adrenorreceptores en linfocitos durante la cinética de sacrificio post-infección. **C)** CD8<sup>+</sup> con receptor  $\beta$ 1 **D)** CD8<sup>+</sup> con receptor  $\beta$ 2

E)



F)



**Figura 7.** Expresión en número absoluto de adrenoreceptores en linfocitos durante la cinética de sacrificio post-infección. E) CD11b<sup>+</sup> con receptor  $\beta 1$  F) CD11b<sup>+</sup> con receptor  $\beta 2$

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La interacción entre células inmunocompetentes, particularmente linfocitos T y macrófagos, caracteriza a la respuesta inmunológica contra la tuberculosis como respuesta clásica de inmunidad celular. El patrón de respuesta que se asocia a protección en la tuberculosis es el de tipo Th1, representado por las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12, producidas por los linfocitos Th-1; así como por las citocinas IL-1 y TNF- $\alpha$ , producidas por macrófagos. Diversos estudios han demostrado que el balance de citocinas producido por las células Th-1 (IL-12, INF- $\gamma$ ) y Th-2 (IL-4, IL-13) está relacionado con la inmunopatogénesis del modelo murino de tuberculosis [24]. Mientras que las células Th1 se les ha conferido un efecto protector, a las Th-2 se les relaciona con la progresión y cronicidad de la enfermedad, así como la producción de un patrón de citocinas con capacidad de desviar la respuesta hacia una inmunidad de tipo humoral, suprimiendo a su vez la respuesta inmune celular todo esto en el modelo murino de tuberculosis.

Por lo que es primordial en la patogenia de la tuberculosis, caracterizar los factores que producen dicho desbalance del patrón de citocinas, puesto que su reversión permitiría el control de la progresión de la enfermedad. La teoría que postula una relación directa entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico ha ido reforzándose a través de los años [25]. Debido a la importancia que podría tener el SNS con el sistema inmune, se procedió a analizar la presencia de noradrenalina en pulmón mediante una técnica cuantitativa específica (HPLC).

Ya que se ha reportado que la noradrenalina, es una molécula importante en el proceso de estrés, y que esta íntimamente relacionado con la tuberculosis [26], al analizar la expresión de noradrenalina se obtuvo un aumento importante de ésta, durante los primeros días post-infección alcanzando un pico máximo en el día 14 con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.010$ ) para posteriormente disminuir (entre el día 21 y 28), hasta llegar a niveles no detectables para el día 120, mientras que el grupo control muestra una expresión constante a lo largo de la infección.

Al realizar el análisis en porcentaje de los marcadores de superficie mediante FACS y su relación con los receptores  $\beta$  adrenérgicos observamos que no hay diferencias significativas, lo que observamos es un incremento paulatino de estas poblaciones conforme progresa la enfermedad. Cuando analizamos los valores en células totales por citometría de flujo de las diferentes poblaciones celulares estudiadas, se observa un incremento del número de células positivas para receptor  $\beta$  adrenal tanto en células CD4+, CD8+ y CD11b+ a partir del día 14 post-infección, sin embargo, este marcaje se acentúa hasta el día 120 post-infección. En tanto el control manifiesta niveles normales en la expresión de células T y fagocitos.

Con estos datos se puede pensar que evidentemente existe una comunicación entre cerebro y sistema inmunológico, ya que son dos de los principales sistemas de adaptación del cuerpo, por tanto durante una respuesta inmune el cerebro y el sistema inmunológico actúan en un proceso llamado "*communication each others*", y este proceso es esencial para mantener la

homeostasis, permitiendo que exista una relación entre sistemas involucrados en esta vía como lo son el eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HPA) y el sistema nervioso simpático (SNS) [27]. Durante procesos de estrés crónico, como la tuberculosis pulmonar, las neuronas del núcleo paraventricular son activadas en gran parte por las citocinas proinflamatorias IL-1, TNF e IL-6, para las cuales estas células tienen receptores. Al activarse, las neuronas hipotalámicas secretan la hormona estimulante de corticotrofina, la cual es liberada y circula a través del sistema porta hipofisiario hasta llegar a la hipófisis anterior, en donde estimula a las células adrenocorticotrofas para que éstas secreten a la hormona estimulante de la corteza suprarrenal (ACTH) [28]. Esta hormona viaja a través de la circulación sanguínea sistémica hasta alcanzar a las células fasciculares de la corteza suprarrenal estimulando la secreción de cortisol.

El cortisol es una potente hormona antiinflamatoria y supresora de la inmunidad celular, es por tanto una eficiente inhibidora de la respuesta Th-1 promoviendo también la diferencia de las células Th-2; las citocinas macrofágicas proinflamatorias como las IL-1, IL-6 y el TNF que se están produciendo en gran cantidad en los pulmones ejercen acciones locales fundamentales en la producción antibacteriana, pero estas citocinas también circulan sistemáticamente, estimulando la producción de proteínas hepáticas de fase aguda y activando a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo; esta estimulación es tan intensa que las glándulas suprarrenales duplican su peso incrementado enormemente el cortisol plasmático, con lo cual contribuye a estimular vigorosamente a las células Th-2 [29].

Dado que las células del sistema inmune reciben inervación simpática y que las catecolaminas son capaces de modular la respuesta inmunológica, la eliminación de la aferencia simpática puede ser un procedimiento útil para evaluar la actividad del sistema nervioso sobre el inmunológico. Alteraciones inmunoendocrinológicas, específicamente en la función del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal que se presentan en el curso de la evolución de la enfermedad, también se relacionan al desbalance en el patrón de citocinas. Interesantemente, la restitución exógena de hormonas adrenales en la fase avanzada de la enfermedad restituye parcialmente el desbalance inmunológico con el consecuente mejoramiento significativo en la sobrevida y extensión de daño tisular. Si desde el inicio de la infección se administran hormonas adrenales promotoras de las células Th-1, la función de estas células es mayor y por más tiempo, lo cual también repercute en un significativo mejoramiento en la sobrevida al disminuir la carga bacilar. Otro factor potencialmente importante en la inducción de este desbalance es el exceso de producción de prostaglandina E2 (PGE2), puesto que este tipo de mediador inflamatorio es un potente inductor los linfocitos Th-2 y además se produce en grandes cantidades en el pulmón [30].

Un factor más que pudiera tener influencia en el desbalance Th-1/Th-2 es la inervación y actividad local pulmonar del sistema nervioso vegetativo (SNS). La respuesta inmune puede ser modulada por la inervación de la rama simpática del SNS. Todos los neurotransmisores, están regulados por otras moléculas que se creía originalmente exclusivas del sistema inmune.

Estos hallazgos han abierto todo un nuevo concepto teórico de la comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmune.

Por todo lo anterior, parece existir un completo "circuito" entre el sistema inmune y el SNC, de manera que el inicio de una respuesta inmune generada por un estrés conlleva a la aceleración de señales periféricas del SNC, generando una regulación de la respuesta inmune a través de la activación del **sistema nervioso simpático**.

## CONCLUSIONES

- Se encontró una posible participación del sistema nervioso simpático, particularmente de la noradrenalina en la inmunopatogénesis de la tuberculosis pulmonar.
- A través de la cuantificación de noradrenalina por HPLC se logra conocer que ocurren cambios en la concentración de NA a lo largo de la enfermedad.
- Las concentraciones de noradrenalina se incrementan desde el inicio de la enfermedad observando un pico máximo en el día 14 siendo este punto significativo con respecto al control para posteriormente descender hasta niveles que no son detectables.
- Niveles suprabasales de noradrenalina puede ser un indicativo en el cambio de patrón de citocinas observado en este modelo, en el que una respuesta protectora Th1 a partir del primer mes, cambia hacia una respuesta mixta Th1/Th2.
- Se corrobora la presencia de receptores  $\beta$  adrenérgicos subclases  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  así como en los macrófagos. Los cuales aumentan conforme progresa la enfermedad.

## **ANEXO 1**

### **Determinación de proteínas (Método Bradford)**

#### **Reconstitución del estándar**

Para reconstituir el liofilizado gamma globulina bovina y suero de albúmina estándar, se añaden 20 mL de agua desionizada se mezcla hasta que se disuelve. Si el estándar no se utilizará dentro de 60 días, se deben hacer alícuotas y congelar a -20 °C.

Nota: Las normas contienen sales amortiguadoras necesarias para solubilizar las proteínas.

1. Preparar el colorante diluyendo 1 parte del tinte reactivo concentrado con 4 partes de agua destilada o desionizada (DDI) . Filtrar a través de un filtro de Whatman # 1 (o equivalente) para eliminar las partículas. Este reactivo diluido puede ser utilizado para aproximadamente 2 semanas cuando se mantiene a temperatura ambiente.
2. Preparar tres a cinco diluciones de una proteína estándar, que es representativa de la solución de proteína de prueba. El rango lineal del ensayo para BSA (albúmina) es de 0.2 a 0.9 mg / mL, mientras que con IgG es de 0.2 a 1.5 mg / mL.
3. Pipetear 100 µl de cada estándar y muestra en un lugar limpio y seco en un tubo de ensayo. Realizarlo por duplicado.
4. Añadir 5.0 mL de colorante reactivo diluido a cada tubo y agitar.
5. Incubar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante no más de 1 hora.
6. Medir la absorción a 595 nm.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aziz MA, Wright A. The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: a model for other infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2005; 41 (Suppl 4): S258-62.
2. Rook GA, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol.* 1996; 50: 259-284.
3. Rook GA, Hernández Pando R. T-cell helper types and endocrines in the regulation of tissue damaging mechanisms in tuberculosis *Immunobiology.* 1994; 191: 478-92.
4. Adam PK, Sanders VM. Norepinephrine and  $\beta$ 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4<sup>+</sup> T and B lymphocyte function in vitro and in vivo *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 487-525.
5. Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J of Leukoc Biol.* 2006; 79:1093-1101.
6. Moyihan J., et al., Sympathetic nervous system regulation of immunity. *J Neuroimmunol.* 2004; 147: 87-90.
7. Rook GA, Hernández Pando R, Lightman S. Hormone, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunology Today.* 1994; 15: 301-303.
8. Rook GA, Hernández Pando R. The role potential of the endocrine system for tuberculosis therapy. *J Pharm Pharmacol.* 1997;( Suppl 1): 43-46.
9. Rook GA, Hernández Pando R, Baker R, Orozco EH, Arriaga K, Pavón L, Streber ML. Human and murine tuberculosis as models for immuno-endocrine interactions. Rook GAW, Lightman S (editores) *Steroid hormones and the T-cell cytokine profile* London Springer. 1997: 193-220.
10. Rook GA, Hernández Pando R. Pathogenetic role in human and murine tuberculosis of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids. *Psychoneuroimmunology.* 1997; 22: S109-S103.
11. Hernández Pando R, Orozco EH, Honour J, Silvia P, Rook GW. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis a clue to pathogenesis?. *FEMS Microbiology Immunology.* 1995; 12: 63-72.
12. Loza MJ. et. al. Beta-agonists modulate T cell functions via direct action on type 1 and type 2 cells. *Blood,* 2006; 107(5): 2052–2060.
13. Rook GA, Hernández Pando R. The influence of adrenal steroids on macrophages and T-cell function in tuberculosis. En Bendinelli M, Paradise LJ. Friedman (editores). *Opportunistic intracellular pathogens and immunity.* New York: Plenum Publishing Corp. 1999: 55-73.
14. Severn A. et. al. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and  $\beta$ -adrenergic agonist. *J Immunol.* 1992; 148: 3441-3445.
15. Hernández Pando R, Streber ML, Orozco EH, Arriaga K, Pavón L, Al-Nakhli, SA, and Rook GA. The effects of androstenrediol and dehydroepiandrosterone on the course of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology.* 1998; 95: 234-241.

16. Goleva E, Dunlap A. Differential control of Th1 versus Th2 cell responses by the combination of low dose steroids with  $\beta$ 2-adrenergic agonists. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114:183.
17. Hernández Pando, Streber M.L. et. al. Emergent therapeutic properties of a combination of glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in tuberculous Balb/c mice. *Q J Med.* 1998; 945-625.
18. Hernández Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva SJ, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary pathology. *Immunology.* 1996; 89: 26-33.
19. Hernández Pando R, Orozco EH, Arriaga K, Sampieri A, Larriva SJ, Madrid MV. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1997; 90: 507-516.
20. Rook GA, Baker R. et. al. Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917: 913-922.
21. Hernández Pando R, Pavón L, Orozco EH, Rangel J, Rook GA. Interactions between hormone-mediated and vaccine mediated immunotherapy for pulmonary tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology.* 2000; 100: 391-398.
22. Hernández Pando R, Pavón L. et al. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immunol* 1997; 6: 84-90.
23. Hernández Pando R, Aguilar León D, Orozco EH, Serrano A, Ahlem C, Trauger R, Schramm B. et. al. 16-alpha-bromoepiandrosterone (HE2000) restores Th1 and accelerates chemotherapy-induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2005; 191: 299-306.
24. Straub RH. Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 640-646.
25. Rojas N, Coto O., Temas de Microbiología Clínica II. 1994; Tomo I. : 241-300.
26. Koch, R. The antology of tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc.* 1981;. 8 (56): 87-10.
27. Lévy-Frébault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J of Syst Bacteriol.* 1995; 3:315-323.
28. Somner HM, Good RC. *Mycobacterium. Manual of clinical Microbiology*, 4 ed. Washington D.C: A society for Microbiology. 1985: 216-248.
29. Ramzi, S, Cotran VK, Stanley L, Robbins. *Patología Estructural y Funcional.* Frederick J. Schoen Editor. *Enfermedades infecciosas.* 5<sup>ta</sup> edición. Polígono San Marco EDIGRAFOS. 1998: 362-365.
30. Van Helden PD, Moller M, Babb C, Warren R, Walzl G, Uys P, Hoal E. TB epidemiology and human genetics. *Novartis Found Symp.* 2006;279:17-31; discussion 31-41, 216-9.
31. Robledo, RJ, Mejía MGI. Actualidad en el diagnóstico de Tuberculosis por el laboratorio. *Infection.* 2001; 5 (4): 251-259.