



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA LOCAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU RELACIÓN CON ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y CONDUCTUALES DURANTE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIÓL. JACQUELINE VIRIDIANA LARA ESPINOSA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO  
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ISABEL SADA OVALLE  
[Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias](#)  
DR. RAÚL MANCILLA JIMENEZ  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

México, Ciudad de México, noviembre de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



*Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico; es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.*

*Marie Curie*



# **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA LOCAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU RELACIÓN CON ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y CONDUCTUALES DURANTE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA**

## **RECONOCIMIENTOS**

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando en el Laboratorio de Patología Experimental, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

El comité tutorial que supervisó el desarrollo de la presente tesis está conformado por:

- **Dr. Raúl Mancilla Jiménez**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- **Dra. Isabel Sada Ovalle**  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- **Dr. Rogelio Hernández Pando**  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Maestría en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con el número de becario 329558.

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por la ayuda otorgada para asistir a congresos.

El jurado que evaluó la presente tesis está conformado por:

**Dra. Gohar Gevorgyan Markosain**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Dra. Angélica Zepeda Rivera**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Dr. Fredy Cifuentes Navarro**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Dra. Agnés Odile Fleury**

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

**Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por la oportunidad que me ofreció para formar parte de su laboratorio.

A la Dra. Brenda Marquina, por todo su apoyo, enseñanza y sabiduría durante la realización de este trabajo.

A los doctores, Jorge Barrios y Dulce Mata del laboratorio de patología experimental por todo su apoyo y enseñanza durante la realización de este trabajo.

A los doctores Enrique Becerril Villanueva, Gilberto Pérez Sánchez y Lenin Pavón del laboratorio de Psicoimmunología del Instituto Nacional de Psiquiatría por su participación en la realización de las pruebas conductuales y la cuantificación de neurotransmisores por HPLC.

Al M. en C. Luis Alberto Revuelta por su participación en la grabación de los videos conductuales del presente trabajo.

A Yadira, Vasti, Sujhey, Octavio, Carolina y Jacqueline por todo su apoyo.

A Rosa Luz... como tu nombre lo dice...fuiste esa luz que necesitaba en un momento muy difícil... gracias por todo.

A todos mis compañeros de Patología Experimental.

A Erick, Samantha y todos los chicos del laboratorio de psicoimmunología por su apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por albergarme en esta casa de estudios desde la preparatoria hasta hoy en día.

## DEDICATORIAS

- *Cuando era pequeña mi papá y mi mamá me enseñaron que a base de esfuerzo y perseverancia se logra lo que se quiere, así sea lo más insignificante, es por esto que esta tesis se las dedico principalmente a ellos que sin su apoyo y enseñanza hoy no estaría cumpliendo esta meta que comencé hace ya dos años, gracias por todo su enseñanza y amor, que a pesar de todo siempre han estado conmigo cuando los he necesitado.*
  
- *También se la quiero dedicar a las personas que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, que saben cómo estoy de loquita y aun así me soportan y apoyan: a mi abuelita Remedios, a mi Tía Maru, a Yose y a mi Cinthya hermosa.*
  
- *Finalmente, este trabajo lo dedico a Dios por darme la vida, salud y bienestar para lograr y realizar lo que me gusta, y darme el gusto de enamorarme cada día de lo hermosa que es la naturaleza y que en conjunto con la ciencia llenan mi vida.*

## ÍNDICE

- Lista de Abreviaturas.....I
- Índice de figuras y cuadros.....II
- Resumen.....V
- Abstract.....VI

### 1) INTRODUCCIÓN

- 1.1 Generalidades sobre la Tuberculosis.....1
- 1.2 Respuesta Inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*.....3
- 1.3 TB pulmonar progresiva, el modelo experimental.....7
- 1.4 Regulación neuroinmunoendocrina.....10
- 1.5 La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal  
y su contribución en la inmunopatología de la TB.....14
- 1.6 Citocinas en el Sistema Nervioso Central.....14

### 2) ANTECEDENTES

- 2.1 Cambios conductuales durante enfermedades infecciosas.....17
- 2.2 Cambios conductuales causados por micobacterias.....18
- 2.3 Cambios conductuales durante TB pulmonar.....19

### 3) JUSTIFICACIÓN.....20

### 4) HIPÓTESIS.....21

### 5) OBJETIVOS.....21

### 6) METODOLOGÍA

- 6.1 Reactivos.....22
- 6.2 Ubicación.....22
- 6.3 Diseño experimental.....22
- 6.4 Preparación de inóculos.....24
- 6.5 Modelo murino de TB pulmonar progresiva.....24

6.6 Determinación de la carga bacilar en pulmón y en cerebro por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	25
6.7 Análisis de citocinas por RT- PCR.....	25
6.8 Estudios de conducta.....	26
6.9 Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	32
6.10 Análisis morfológico.....	34
6.11 Análisis estadístico.....	34

## **7) RESULTADOS**

7.1 Sobrevida.....	35
7.2 Carga bacilar.....	35
7.3 Expresión de citocinas por RT-PCR.....	36
7.4 Cambios conductuales.....	45
7.5 Cambios neuroquímicos.....	50
7.6 Cambios morfológicos en el SNC.....	55

<b>8) DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
--------------------------	-----------

<b>9) CONCLUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
---------------------------	-----------

<b>10) LITERATURA CITADA.....</b>	<b>71</b>
-----------------------------------	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT: Serotonina
- ACTH: Hormona estimulante de la corteza suprarrenal
- BALB/c: Cepa de la especie *Mus musculus* utilizada en la investigación
- BCG: *Bacillus Calmette-Guerin*
- CRH: Hormona liberadora de corticotropina
- DA: Dopamina
- DCs: Células dendríticas
- H37RV: Cepa prototipo de laboratorio de *Mycobacterium tuberculosis*
- HHA: Hipotálamo-hipófisis-adrenales
- IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa
- IL: Interleucina
- INEI: Interacciones neuroinmunoendocrinológicas
- $INF\gamma$ : Interferon gama
- LAM: Familia de *Mycobacterium tuberculosis* Latinoamericano-Mediterráneo
- LPS: Lipopolisacárido
- LsT: Linfocitos T
- LTP: Potenciación a largo plazo
- $L\gamma\delta$ s: linfocitos gama delta
- MTBC: Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*
- $M\phi$ s: macrófagos
- NKs: Células natural killers
- OADC: Suplemento de crecimiento para micobacterias (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa)
- ON: óxido nítrico
- PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos
- PMNs: Polimorfo nucleares
- TB: Tuberculosis
- $TGF\beta$ : Factor de crecimiento transformante tipo beta
- Th1: Linfocitos cooperadores tipo 1
- Th2: Linfocitos cooperadores tipo 2
- TLR: Receptor de tipo Toll
- $TNF\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa
- UFC: Unidades formadoras de colonias

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1</i>	Respuesta inmune en TB	7
<i>Figura 2</i>	TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c.	9
<i>Figura 3</i>	Estimulación del cerebro vía neural por las citocinas periféricas.	13
<i>Figura 4</i>	Estimulación del cerebro vía humoral por las citocinas periféricas.	13
<i>Figura 5</i>	Diagrama de diseño experimental seguido en este trabajo. Los detalles de la metodología se describen en el texto.	23
<i>Figura 6</i>	Imágenes representativas de la prueba realizada para evaluar el estado neurológico de los ratones.	28
<i>Figura 7</i>	Imágenes representativas de la prueba para evaluar la conducta locomotora.	29
<i>Figura 8</i>	Imágenes representativas de la prueba de reconocimiento de objetos realizada para evaluar la memoria a corto y largo plazo.	30
<i>Figura 9</i>	Imágenes representativas de la prueba Toldo de Postura de Atención Extrema SAP para evaluar ansiedad.	31
<i>Figura 10</i>	Imágenes representativas de la prueba de suspensión de la cola para evaluar conducta similar a la depresión.	31
<i>Figura 11</i>	Curvas de linealidad obtenidas para la epinefrina, norepinefrina, dopamina y serotonina bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto	33
<i>Figura 12</i>	Porcentaje de sobrevida a lo largo del tiempo producido por la cepa prototipo H37RV en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal.	35
<i>Figura 13</i>	Determinación de la carga bacilar en homogenizados de pulmón y cerebro de ratones infectados con la cepa H37RV	36
<i>Figura 14</i>	Expresión génica de TNF $\alpha$ por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	38
<i>Figura 15</i>	Expresión génica de IL12 por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	39
<i>Figura 16</i>	Expresión génica de IFN $\gamma$ por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	40
<i>Figura 17</i>	Expresión génica de iNOS por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	41

<i>Figura 18</i>	Expresión génica deIDO por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	42
<i>Figura 19</i>	Expresión génica de TGF $\beta$ por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	43
<i>Figura 20</i>	Expresión génica de IL4 por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	44
<i>Figura 21</i>	Expresión génica de IL10 por RT-PCR en cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	45
<i>Figura 22</i>	Actividad locomotora durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control.	46
<i>Figura 23</i>	Peso corporal durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control.	47
<i>Figura 24</i>	Tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de cola durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control	47
<i>Figura 25</i>	Puntuación obtenida en la prueba para evaluar el estado neurológico durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control.	48
<i>Figura 26</i>	Prueba de SAP para evaluar conducta de ansiedad durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control.	48
<i>Figura 27</i>	Prueba de reconocimiento de objetos para evaluar la memoria a corto plazo (A) y largo plazo (B), durante la infección con H37RV.	49
<i>Figura 28</i>	Concentración de norepinefrina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	51
<i>Figura 29</i>	Concentración de epinefrina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	52
<i>Figura 30</i>	Concentración de dopamina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	53
<i>Figura 31</i>	Concentración de serotonina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar.	54
<i>Figura 32</i>	Histología del cerebro al día 3 de infección con la cepa H37RV	56
<i>Figura 33</i>	Histología del cerebro al día 60 de infección con la cepa H37RV	57

<i>Figura 34</i>	Imágenes de los plexos coroideos estudiadas mediante microscopía electrónica durante TB pulmonar progresiva utilizando la cepa prototipo H37RV días 7,14 y 21.	58
<i>Figura 35</i>	Imágenes de los plexos coroideos estudiadas mediante microscopía electrónica durante TB pulmonar progresiva utilizando la cepa prototipo H37RV días 28, 60 y 120.	59

## CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<i>Cuadro 1</i>	Características de la respuesta inmune en el modelo de TB pulmonar experimental en ratones	9
<i>Cuadro 2</i>	Factores de dilución utilizados para cuantificar UFC	25
<i>Cuadro 3</i>	Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real	26
<i>Cuadro 4</i>	Parámetros evaluados para determinar el estado neurológico de los ratones.	28
<i>Cuadro 5</i>	Programa de gradientes utilizado para la cuantificación de neurotransmisores.	33
<i>Cuadro 6</i>	Resumen de los resultados obtenidos	61

## RESUMEN

Durante el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos existe una compleja actividad de áreas cerebrales específicas, produciendo activación neuronal con modificaciones en la síntesis, producción y activación de neurotransmisores y citocinas que además de contribuir en respuestas eferentes que regulan las respuestas inflamatorias e inmunológicas, también pueden afectar funciones como la capacidad de aprendizaje, la memoria y el estado de ánimo. La TB pulmonar es una enfermedad infecciosa que cursa con inflamación crónica y es probable que estas alteraciones neuroinmunológicas también se produzcan en ausencia de infección cerebral. Debido a esto en el presente trabajo se evaluó la respuesta inflamatoria e inmunológica local; así como las anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales en el SNC en un modelo murino de TB pulmonar progresiva. Para esto, ratones BALB/c machos fueron infectados con la cepa H37RV vía intratraqueal con 250 mil UFC y a un grupo se le administró solución salina. En cerebelo, hipocampo e hipotálamo de cada animal se midieron citocinas por RT-PCR; se cuantificaron neurotransmisores por HPLC y se estableció el efecto de la infección en el comportamiento con distintas pruebas conductuales. Finalmente, se determinó el daño histológico con microscopía de luz y microscopía electrónica. Los resultados mostraron que desde los animales infectados presentan un aumento en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de las citocinas proinflamatorias  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  e  $IL12$ , de las enzimas  $IDO$  e  $iNOS$  y de  $IL10$ ,  $IL4$  y  $TGF\beta$ . Se presentó conducta similar a la depresión, conducta de enfermedad, conducta de ansiedad, daño neurológico y un deterioro tanto en la memoria a corto plazo como a largo plazo, lo cual coincide con cambios de los neurotransmisores epinefrina, norepinefrina, dopamina y serotonina en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de los animales infectados. Se observó muerte neuronal caracterizada por núcleos picnóticos y citoplasma acidófilo en el hipocampo y la corteza frontal, así como en las células epiteliales de los plexos coroides. Estos resultados indican que la extensa inflamación pulmonar y producción de citocinas está asociada con la presencia en el SNC de citocinas, cambios neuroinflamatorios y producción de neurotransmisores que podrían ser los causantes de la muerte neuronal y de las anomalías conductuales presentes en los animales con TB pulmonar en ausencia de bacterias cultivables en el cerebro.

**ABSTRACT**

During the development of chronic inflammatory processes there is a complex activity of specific brain areas, producing neuronal activation and changes in the synthesis, production and activation of neurotransmitters and cytokines that in addition to contributing in efferent responses that regulate inflammatory and immune responses, may also affect neuropsychoaffective functions such as learning ability, memory and mood. Pulmonary TB is an infectious disease that brings about chronic inflammation and it may be conceivable that these neuroimmunological changes also may occur in the absence of brain infection. The aim of this study was to determine the inflammatory and local immune response as well as morphological, biochemical and behavioral abnormalities in the CNS in a mouse model of progressive pulmonary TB. The animals were intratracheally infected with 250,000 UFC of the strain H37RV and a control group received saline solution. Cytokines were measured by RT-PCR in the cerebellum, hippocampus and hypothalamus of each animal; neurotransmitters were quantified by HPLC and the effect of infection in the behavior was established by different behavioral tests. Finally the histological damage was determined by light and electron microscopy. Our results show that infected animals display an increase in the hypothalamus, hippocampus and cerebellum of proinflammatory cytokines  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  and IL-12, IDO and iNOS enzymes and IL10, IL4 and  $TGF\beta$ . Depressive like behavior, sickness behavior, anxiety like behavior, neurological damage and an impairment not only in the short term memory but also in long term memory were presented, which coincides with changes in the neurotransmitters epinephrine, norepinephrine, dopamine and serotonin in the hypothalamus, hippocampus and cerebellum of infected animals. Neuronal death characterized by pyknotic nuclei and acidophilic cytoplasm in the hippocampus and frontal cortex was observed, as well as in epithelial cells of the choroid plexus. These results indicate that the extensive lung inflammation and cytokine production is associated with the presence in the CNS of cytokines, neuroinflammatory changes and production of neurotransmitters that could be the cause of neuronal death and behavioral abnormalities present in animals with pulmonary TB in the absence of culturable bacteria in the brain.

## 1) INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tuberculosis

#### Generalidades sobre la Tuberculosis

##### Historia

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo de la historia, y ha sido causa de enfermedad y muerte durante más de 20,000 años. Fue reconocida y descrita por Hipócrates y Galeno en el Mundo Clásico (Xarchus y Bourandas, 2003), además en el antiguo Egipto, la India y el Lejano Oriente (Morse, 1961). Los síntomas que atrajeron la atención fueron los de la TB ósea, donde el daño en las vértebras tuvo como consecuencia escoliosis y la enfermedad de Pott. Además de los síntomas asociados con la TB pulmonar, como fiebre, pérdida de peso y la hemoptisis (tos con sangre). En el Reino Unido, las lesiones tuberculosas de los ganglios linfáticos conocidas como escrófula (linfadenitis cervical), o mal del rey, y lesiones tuberculosas de la piel fueron descritas como *Lupus vulgaris* o chancro tuberculoso. La paleopatología de restos óseos antiguos, junto con los informes clásicos e históricos, demuestran que la TB se produjo en la prehistoria. Desde un punto de vista histórico evolutivo, existen evidencias de TB espinal desde el neolítico, pero es a partir de la revolución industrial donde la enfermedad adquiere carácter endémico, debido a una mayor aglomeración de la población en las urbes, lo cual facilitó su diseminación (Minnikin *et al.*, 2010).

A partir de 1985, comienza a emerger la TB en los países desarrollados. Los factores postulados para explicar esta reemergencia de la enfermedad son varios (Rodríguez, 2012):

- ❖ El compromiso del sistema inmune en los individuos infectados por el VIH, que permite tanto una reactivación de una antigua infección, como un aumento de la susceptibilidad a una nueva infección
- ❖ Cambios sociales: aumento del índice de pobreza y hacinamiento
- ❖ Falla en los sistemas de control de la salud pública
- ❖ Emergencia de bacilos tuberculosos multirresistentes a las drogas
- ❖ Escasa asignación de recursos para la investigación de nuevas drogas, nuevos métodos diagnósticos y vacunas.

## Etiología

Las micobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han acompañado al hombre a lo largo de su historia. *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* son los agentes etiológicos más frecuentes de las dos enfermedades más conocidas de este género. Poco tiempo después que Roberto Koch descubriera *M. tuberculosis* en 1882, fueron identificadas otras micobacterias, constituyendo el grupo de las micobacterias atípicas. El hallazgo de estas últimas estuvo vinculado por años a colonización transitoria o contaminación de la muestra clínica, pero es a partir de 1950 que se les ha asignado un rol en determinadas patologías (Minnikin *et al.*, 2010).

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otras lento. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). El contenido de bases de guanina más citosina en la molécula de ADN es de 62 a 70 % (Zambrano *et al.*, 2012).

La TB es causada por miembros de un grupo de bacterias muy estrechamente relacionados, denominado Complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC por sus siglas en inglés), las cuales son micobacterias de crecimiento lento, que están estrechamente relacionados a nivel del ADN y comparten secuencias idénticas de genes 16S pero difieren en términos de fenotipos y la preferencia del huésped. El MTBC incluye las cepas que afectan a los humanos: *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. Canetti*. Estas bacterias son parásitos obligados y tienen la capacidad de alterar la respuesta inmune mediada por células del huésped con el fin de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos (Zambrano *et al.*, 2012).

## Aspectos clínicos y patológicos

La infección con *M. tuberculosis* sigue ciertos patrones que se han establecido a partir de los modelos en animales, así como de la observación de la TB humana. Estudios experimentales sugieren que la transmisión se realiza por vía aérea y comienza con la inhalación de aerosoles (gotitas de 1 a 2 micras) que contienen al bacilo y que fueron

producidas por un individuo o animal enfermo. Una vez alojado el bacilo en los alveolos, comienza la propagación a otros tejidos, la formación de lesiones y la destrucción del sitio afectado. Al llegar a los pulmones puede diseminarse a todo el organismo (TB miliar) (Ferraz *et al.*, 2006).

La TB puede ser clasificada en tres estados: TB primaria, latente y secundaria. La TB primaria usualmente ocurre durante la infancia después de un contacto inicial con el bacilo tuberculoso. Frecuentemente es asintomática. Después de una alveolitis, hay formación de granulomas con la llegada de neutrófilos y monocitos, linfocitos B y T alrededor de macrófagos, células dendríticas y fibroblastos. La infección primaria es frecuentemente controlada en ese momento, pero llegan a persistir algunos bacilos por meses o años, sin crecimiento, pero viables, a esta característica se le ha llamado “persistencia no replicativa” o TB latente, donde el hospedero monta una fuerte respuesta inmune, la cual contiene, pero no elimina la infección. Al fallar los mecanismos de resistencia inmune, puede reactivarse la infección y desarrollarse una TB secundaria. En este estado hay un proceso inflamatorio exudativo con características neumónicas y con síntomas clásicos de la enfermedad como son: tos, expectoración, fiebre, sudoración nocturna, anorexia y pérdida de peso. Puede haber hemoptisis como resultado de la formación de cavitaciones, áreas caseosas y fibrosis, es decir, el proceso infeccioso se vuelve crónico (Ferraz *et al.*, 2006).

## **1.2 Respuesta Inmune contra *Mycobacterium tuberculosis***

El pulmón es el sitio principal de infección por *M. tuberculosis* y por lo tanto es un órgano crítico, por esta razón, el que se establezca una respuesta inmune no controlada fácilmente puede interrumpir su función fisiológica esencial (Cooper *et al.*, 2011).

### **Respuesta inmune innata**

*M. tuberculosis* expresa una serie de moléculas que interactúan con las diferentes células del hospedero e inducen una respuesta inmune lenta y por lo general insuficiente durante la cual el bacilo tiene la oportunidad de proliferar ampliamente (Dheda *et al.*, 2010).

En la defensa contra *M. tuberculosis* participan diferentes células como polimorfo nucleares (PMNs), natural killers (NKs), linfocitos  $\gamma\delta$  ( $L\gamma\delta$ s), macrófagos (M $\phi$ s) y células dendríticas (DCs) algunas de las cuales inducen, además, la respuesta inmune adquirida (Russell, 2011).

- PMNs: Ejercen una moderada acción bactericida. Forman parte de los granulomas.

- NKs: Migran al lugar por el cual ingresa el bacilo, después de las PMN, e inician la producción de IFN- $\gamma$  para activar a los M $\phi$ s. Participan en el proceso de apoptosis de macrófagos invadidos por el bacilo.
- L $\gamma$  $\delta$ s: Reconocen glicolípidos que les son presentados por moléculas CD1, y que los activan haciéndolos citotóxicos. Su número se incrementa notoriamente en pacientes con tuberculina positiva. Se sospecha que participan en la inducción de la apoptosis de los M $\phi$ s infectados con el bacilo.
- M $\phi$ s: La acción de estas células contra *M. tuberculosis* es compleja. El bacilo se adhiere al M $\phi$  por medio de diferentes receptores, como los del complemento, CR1, CR2, CR3, y CR4, el receptor para manosa y el TLR-2, entre otros. Una vez dentro del fagosoma, la bacteria emplea diferentes estrategias para evitar los mecanismos de la respuesta inmune innata. Con ellas convierte al M $\phi$ , en un hábitat ideal dentro del cual “vive tranquilamente”. Paradójicamente la célula encargada de la destrucción del bacilo, el M $\phi$ , le sirve inicialmente de albergue y protección contra los anticuerpos y linfocitos T activados. El hospedero produce LRG-47 (análoga al óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)), que induce la acidificación de los lisosomas y la fusión de estos al fagosoma para facilitar la destrucción del bacilo. También produce SP110, encargada de controlar la replicación de la micobacterias y define si el M $\phi$  debe morir por necrosis o por apoptosis. La muerte por necrosis libera bacilos vivos que diseminan la enfermedad, en tanto que en la muerte por apoptosis se liberan antígenos que al ser capturados por las DCs y presentados a los linfocitos T, inician una respuesta inmune adquirida.
- DCs: Capturan, interiorizan y generan los radicales más antigénicos que son presentados por moléculas HLA. Migran luego a los ganglios linfáticos mediastinales para presentar los distintos antígenos a los linfocitos T CD4+, que migran al pulmón e inician la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , citocinas que actúan sobre los M $\phi$ s. Al fagocitar nuevos bacilos estos M $\phi$ s activados logran iniciar una serie de mecanismos metabólicos encaminados a producir radicales del O<sub>2</sub>, para destruirlo. Si los bacilos logran salir del M $\phi$  antes de que este sea activado, invaden otros que estén cerca de la zona afectada, se incrementa el riesgo de diseminación porque pueden escapar al torrente circulatorio generando una bacteriemia que difunde la infección a territorios fuera del pulmón (Nicod, 2007).

## Respuesta inmune adaptativa

### Linfocitos T CD4+

Son esenciales en la defensa contra *M. tuberculosis*. La activación de linfocitos T vírgenes tiene lugar transcurridas varias semanas de la entrada de la micobacteria por vía aérea, y esto ocurre únicamente en los ganglios linfáticos de drenaje a donde el bacilo es llevado por las DCs (Nicod, 2007).

Los linfocitos T CD4+ activados en el ganglio migran al pulmón en donde empiezan a acumularse para iniciar un proceso inflamatorio que, por lo general, logra detener la reproducción del bacilo. El IFN $\gamma$ , generado por los linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y NKs es clave en la activación de los M $\phi$ s para la destrucción de los bacilos, pero no es suficiente por sí solo, se necesita de la participación del TNF $\alpha$  producido por los M $\phi$ s, DCs, y linfocitos T que actúa sinérgicamente con el IFN $\gamma$  para destruir al bacilo (Nicod, 2007).

Con el incremento en la producción de IFN- $\gamma$  las DCs responden a la presencia de *M. tuberculosis* con la producción de IL23 e IL12 (Nicod, 2007).

Diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ participan en la defensa contra *M. tuberculosis* (Nicod, 2007).

- Linfocitos Th17: Atraen y activan PMNs, células que cumplen una acción muy limitada en la defensa contra la bacteria. Producen la citocina proinflamatoria IL17.
- Linfocitos Th1: Generan citocinas proinflamatorias que activan a los M $\phi$ s.
- Linfocitos Th2: Producen IL4 e IL5, que ayudan en la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos que, actuando como opsoninas, facilitan la fagocitosis de los bacilos liberados por lisis de células infectadas.
- Linfocitos Treg: Pueden ser activados en infecciones prolongadas y frenar la defensa dada por los linfocitos Th1 ocasionando una reactivación de la infección.

Los linfocitos T CD8+ participan en el control de la infección por *M. tuberculosis*, pero en menor grado que los linfocitos T CD4+. Lo hacen por medio de la producción de granulosinas que son tóxicas para el bacilo. Estos linfocitos son activados en los ganglios por las DCs y por antígenos liberados de la bacteria que pasan del fagosoma al citoplasma

de los Mφs, estos antígenos son transportados a la membrana del Mφ para ser presentados por moléculas HLA-1 y CD1 (Nicod, 2007).

La respuesta inmune contra *M. tuberculosis* involucra las citocinas IL12, IL18, IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ , necesarias para la activación del Mφ. La IL10 tiene una acción perjudicial ya que disminuye el efecto de la IL12 y del TNF $\alpha$ . El factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) activa a los Mφs infectados, pero disminuye la acción de los linfocitos T (Nicod, 2007).

Los linfocitos T CD4+ que son activados en los ganglios linfáticos por las DCs, migran al pulmón y además de activar a los Mφs, inducen la formación de granulomas por medio de IFN $\gamma$  y de las IL1 e IL2 (Nicod, 2007).

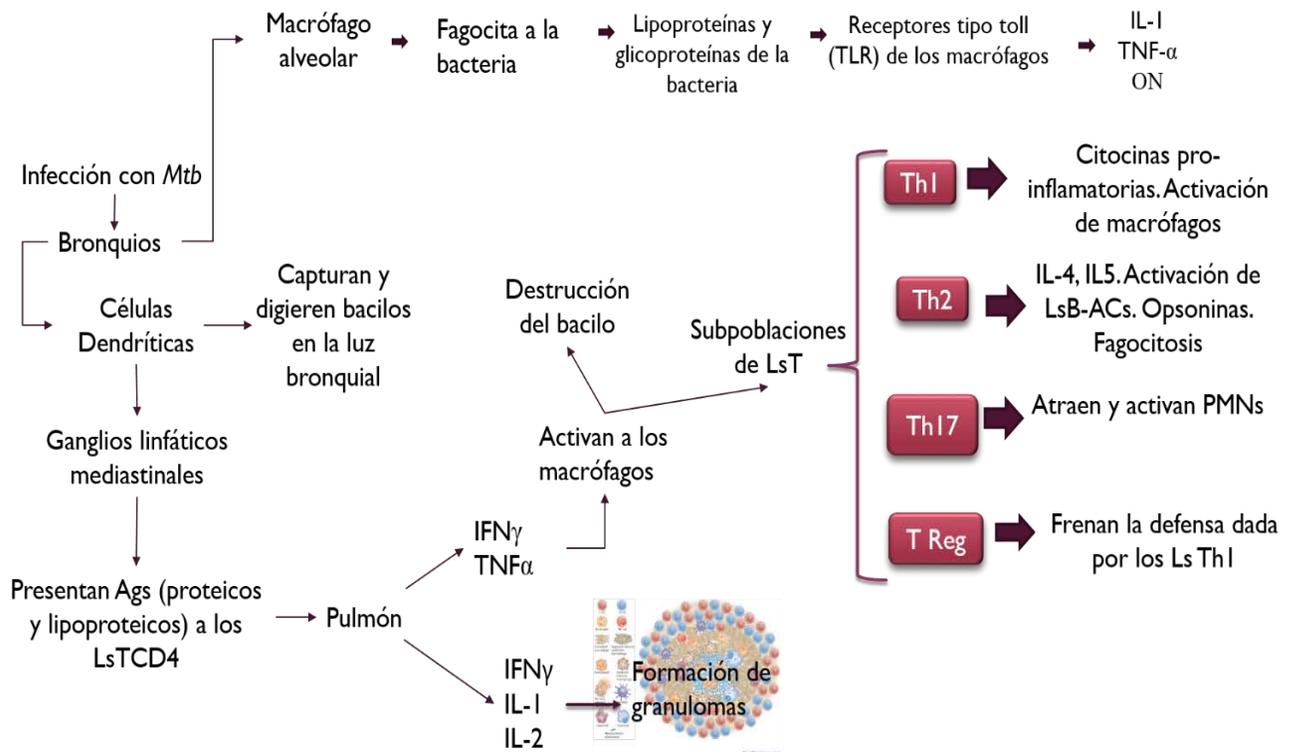
El granuloma tuberculoso en el humano se forma de un núcleo central de células epitelioides y Mφ que es rodeado por LT CD4+ y más externamente por LT CD8+ y finalmente por fibroblastos que forman un halo de fibrosis que llega a calcificarse y crea un área de hipoxia. Con este proceso se liberan bacilos que fuera del Mφ encuentran nutrientes e inician la activación de genes que les permiten adaptarse a un metabolismo anaerobio y sobrevivir por décadas dentro del granuloma. Con la hipoxia se induce la muerte de las células colindantes con la zona necrótica aumentando la cantidad de cáseum, que puede erosionar la capsula fibrosa del granuloma, y escapar a un bronquiolo facilitando la dispersión intrapulmonar de la infección y dando origen a la formación de cavernas, características de la TB avanzada (Figura 1) (Nicod, 2007).

### **Evasión de la respuesta inmune**

*M. tuberculosis* induce en los Mφs modificaciones importantes gracias a cuatro estrategias diferentes (Rojas *et al.*, 2015):

- Evitar el paso al citoplasma e impedir la unión de los lisosomas al fagosoma, por la formación de una cubierta rica en triptófano y aspartato, conocida como TACO.
- Producir dentro del fagosoma lipoarabinomano y P13P fosfatasa, moléculas que interrumpen la maduración del fagosoma.
- El bacilo impide la acidificación del fagosoma para disminuir la producción de TNF, IL1 e iNOS e induce la producción de citocinas regulatorias como IL10 y TGF $\beta$  que desvían la respuesta inmune de Th1 a Th 2.

- Induce la generación de prostaglandina E2, para reforzar el proceso de desactivación de los Mφs.



**Figura 1.** Respuesta inmune en TB. Modificado de Rojas *et al.*, 2015.

### 1.3 TB pulmonar progresiva, el modelo experimental

El modelo experimental de TB pulmonar progresiva desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Hernández-Pando, se fundamenta en el uso de una cepa de ratones genéticamente idénticos (BALB/c) de 6 a 8 semanas de edad, que son infectados vía intra-traqueal con bacterias vivas y virulentas de la cepa prototipo de *M. tuberculosis* H37Rv a una dosis elevada de  $2.5 \times 10^5$  UFC ya que los ratones no son huéspedes naturales de las micobacterias (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

Se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad (Figura 2) (Cuadro 1).

### **Etapa temprana**

La primera fase es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia en pulmón de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, y la formación de granulomas en la segunda semana de infección, constituidos principalmente por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos, organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos para contener a las bacterias. Dichos granulomas están constituidos principalmente por linfocitos T CD4+ productores de citocinas tales como IFN $\gamma$  e IL2 y macrófagos activados productores de TNF $\alpha$ , IL1 y gran cantidad de iNOS. En el modelo, el día clave que corresponde al clímax de una respuesta protectora es el día 21, cuando los granulomas alcanzan su plena madurez (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

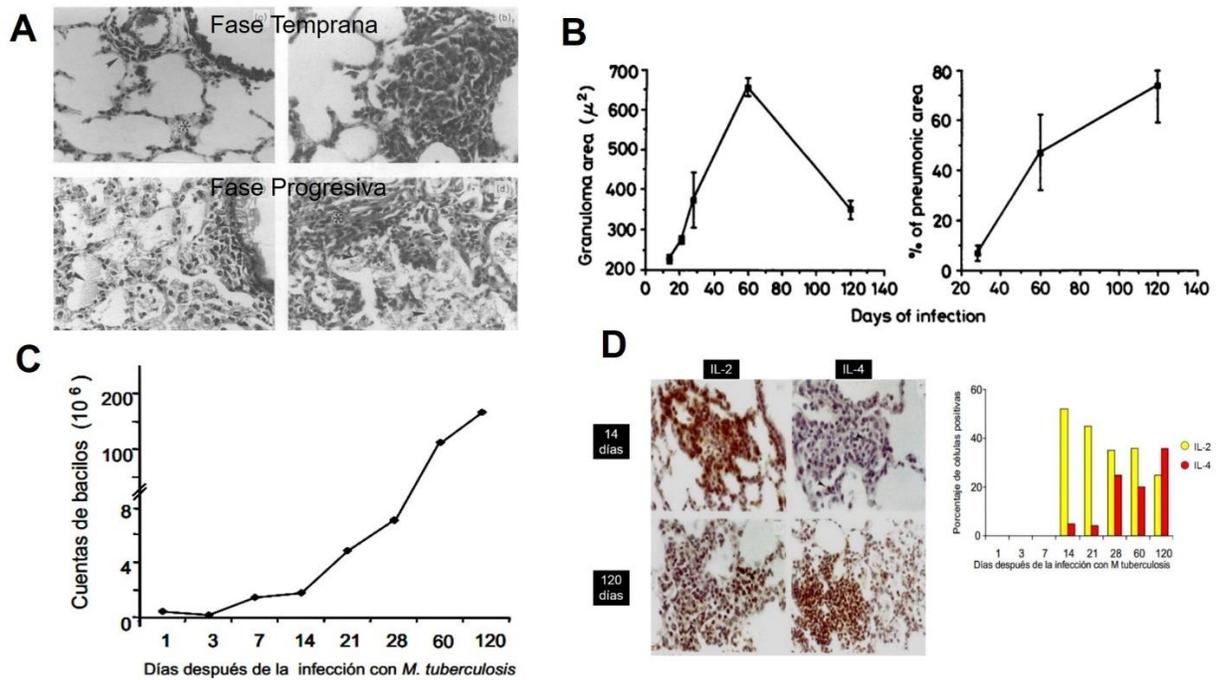
### **Etapa progresiva**

La segunda fase de la enfermedad corresponde a la etapa avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por un gran incremento en el número de bacterias vivas a nivel pulmonar, así como por áreas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial. Durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2), que se caracterizan por producir IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13. En particular, la IL4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos; además, la IL4 al igual que la IL10 y la IL13 son eficientes antagonistas de las células Th1 y de esta manera se desvía la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad. Los M $\phi$ s disminuyen significativamente la producción de TNF $\alpha$ , IL1 e iNOS, e incrementan notablemente su capacidad productora de potentes citocinas anti-inflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el TGF $\beta$  y la IL10. El TGF $\beta$  es también una eficiente citocina inductora de la proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena, contribuyendo así a generar fibrosis (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

Existe predominio de células IL2 positivas durante la fase temprana de la enfermedad (14-28 días postinfección), mientras que durante la fase progresiva de la enfermedad (días 60 y 120 postinfección) hay un balance mixto de células productoras de IL2 e IL4 (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

**Cuadro 1.** Características de la respuesta inmune en el modelo de TB pulmonar experimental en ratones (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

Temprana	Progresiva
<ul style="list-style-type: none"> <li>•1-28 (días)</li> <li>•Infiltrado inflamatorio intersticial, perivascular y peribronquial</li> <li>•Formación de granulomas</li> <li>•Predominio de citocinas Th1</li> <li>•Alta producción de IL1, TNF<math>\alpha</math>, IL2, IL12, INF<math>\gamma</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•28-120 (días)</li> <li>•Balance Th1/Th2 (mayor IL4)</li> <li>•Macrófagos desactivados</li> <li>•Predominio de células CD8</li> <li>•Neumonía, fibrosis y necrosis</li> <li>•Aumento de la carga bacilar.</li> <li>•Supresión de la inmunidad celular.</li> <li>•Progresión de la enfermedad y muerte</li> </ul>



**Figura 2.** TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c. A) Imagen histológica de la fase temprana o aguda (inflamación y granulomas) y fase progresiva o crónica (neumonía, necrosis y fibrosis). B) Morfometría automatizada del tamaño y porcentaje de la superficie pulmonar afectada por neumonía a lo largo de la enfermedad y el área de granulomas. C) Determinación de unidades formadoras de colonias bacterianas en homogenizados pulmonares. D) Cinética de producción de IL2 e IL4 en los granulomas pulmonares durante el curso de la enfermedad. (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva

#### 1.4 Regulación neuroinmunoendocrina

Actualmente se sabe que los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico mantienen una activa comunicación entre ellos a través de un proceso fisiológico conocido como *interacciones neuroendocrinoinmunológicas* (INEI), esta comunicación está mediada por hormonas, neurotransmisores y citocinas, así como receptores expresados constitutivamente en linfocitos y neuronas. La comunicación entre estos tres sistemas permite mantener la homeostasis ante la presencia de estímulos estresantes como las lesiones tisulares o las infecciones mediadas por bacterias, virus, parásitos y hongos, lo mismo que frente a los estímulos estresantes de tipo procesivo (aquellos que dependen de la percepción que tiene del entorno cada individuo) (Pavón-Romero y Garcés- Álvarez, 2016).

Mecanismos complejos como la termorregulación, el sueño, la ingesta de alimento, el dolor y el estrés son integrados a nivel cerebral, sin embargo, también son modulados por medidores endocrinos y por citocinas producidas a nivel periférico (Besedovsky y Del Rey, 2011).

El estrés es un proceso de adaptación al entorno; la respuesta fisiológica involucra la liberación de mediadores solubles por parte de los sistemas inmunológico, nervioso y endocrino. Por parte de la respuesta inmune se liberan citocinas y proteínas inflamatorias, y el sistema endocrino contribuye con hormonas como la CRH (hormona liberadora de corticotropina), la ACTH (hormona adrenocorticotrópica), cortisol y DHEA (dehidroepiandrosterona). El sistema nervioso libera neurotransmisores, por ejemplo, serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y acetilcolina (Ach). La variación conjunta en los niveles de los mediadores solubles induce cambios conductuales que son necesarios para afrontar los estímulos estresantes del entorno (Pavón-Romero y Garcés- Álvarez, 2016).

De acuerdo con la duración, los estímulos estresantes pueden presentarse de forma aguda o crónica. El estrés agudo induce la secreción de bajos niveles de cortisol circulante durante periodos cortos y, al desaparecer el estímulo estresante, los glucocorticoides conducen las INEI a un estado fisiológico basal. Sin embargo, si el estímulo estresante se mantiene por un periodo prolongado, se convierte en un proceso crónico donde la alta concentración de cortisol circulante afecta el sistema neuroendocrino y la respuesta inmunológica y conllevan a la predisposición a la enfermedad (Pavón-Romero y Garcés- Álvarez, 2016).

La comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico regula múltiples procesos fisiológicos, uno de los más estudiados es el efecto que se presenta en la respuesta inflamatoria periférica por medio de las vías neural y la humoral (Pavón-Romero y Garcés- Álvarez, 2016).

### **Vía neural**

El mecanismo neural de las INEI involucra la activación de las fibras sensitivas del nervio vago aferente, que le indican al cerebro que un proceso inflamatorio está en curso (Figura 3). Los estímulos inmunológicos activan las aferencias vagales de forma directa o indirecta; la estimulación directa se presenta a través de las citocinas liberadas por fibroblastos, células endoteliales, células dendríticas, macrófagos y otras células involucradas en la respuesta inmunológico o si el estímulo inflamatorio es producido por agentes infecciosos las denominadas moléculas pertenecientes a los llamados patrones de reconocimiento de la inmunidad innata (PAMS) pueden unirse respectivamente a receptores para citocinas y TLRs que existen en el nervio vago. La estimulación indirecta se ejerce mediante células quimiorreceptoras asociadas con el paraganglio vagal. Las fibras aferentes del vago visceral, situadas en el ganglio nodoso, terminan dentro del complejo dorsal vagal (DVC) del bulbo raquídeo. El DVC está constituido el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo motor dorsal del vago (DMN) y el área postrema (AP). El núcleo motor dorsal es el sitio donde se inician las fibras aferentes preganglionicas del vago y se genera la respuesta antiinflamatoria mediada por el nervio vago. El área postrema, que carece de barrera hematoencefalica, es un órgano circunventricular que permite la comunicación humoral entre el sistema inmunológico y el tejido cerebral (Pérez *et al.*, 2009).

La información sensorial que llega al nervio vago es recibida por las neuronas del núcleo del tracto solitario, las cuales coordinan las funciones autónomas e interaccionan con el sistema endocrino. Las proyecciones ascendentes del NTS alcanzan regiones como el núcleo hipotalámico, la corteza y corteza insular. Uno de los núcleos hipotalámicos que reciben información del NTS es el núcleo paraventricular (PVN), que está asociado con la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que, a su vez, está involucrada en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA). Este vínculo ascendente entre el NTS y el PVN provee una ruta de modulación neurohormonal para la respuesta inflamatoria (Pérez *et al.*, 2009).

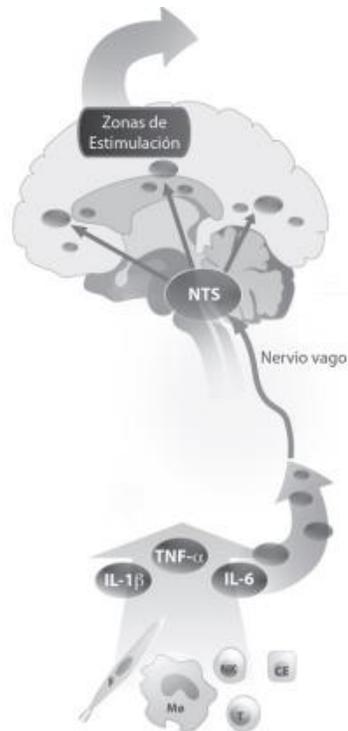
Los contactos sinápticos también se realizan entre las neuronas del NTS y las de la región C1 de la médula rostral ventrolateral (RVM), la cual tiene una importante función en el control del homeostasis cardiovascular. Las neuronas de la RVM se proyectan hacia el locus coeruleus (LC), principal fuente de inervaciones noradrenérgicas de sitios altos del cerebro, entre los que se incluyen el hipotálamo y el PVN. Entre las proyecciones que se originan en la RVM y el LC hacia las neuronas simpáticas pregangliónicas en la médula espinal, también hay rutas descendentes del PVN al RVM y el NTS, estas conexiones ascendentes y descendentes proporcionan un substrato neuronal para las interacciones entre el eje HHA y el Sistema Nervioso Simpático (SNS) como un mecanismo inmunomodulatorio (Pérez *et al.*, 2009).

La transmisión de la señal mediada por citocinas hacia el cerebro a través de las neuronas sensoriales vagales dependen sobre todo de la intensidad del reto inmunológico, la lesión o el estrés psicológico, lo que está directamente relacionado con la concentración de citocinas en circulación (Pavón-Romero y Garcés-Álvarez, 2016).

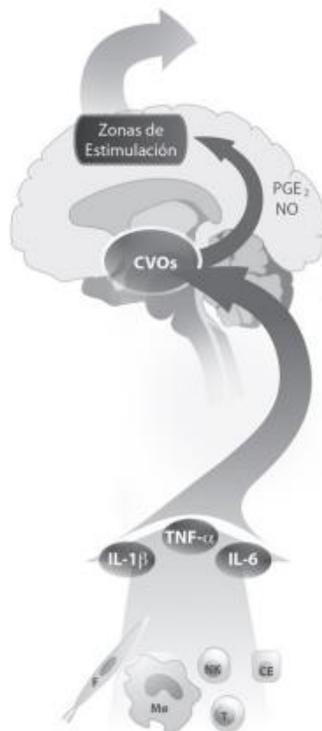
### **Vía humoral**

En la vía humoral (Figura 4), IL1, TNF $\alpha$  e IL-6 periféricas pueden cruzar la barrera hematoencefálica y alcanzar el líquido cefalorraquídeo, el fluido de los espacios intersticiales del cerebro y la médula espinal por medio de un mecanismo dependiente de un transportador saturable que funciona en concentraciones plasmáticas muy elevadas. Las citocinas periféricas también unirse a los receptores de la superficie del endotelio vascular en el cerebro, incrementando la síntesis y la secreción de prostaglandinas y el óxido nítrico que se difunden en el parénquima cerebral para modular la actividad de neuronas lo que se asocia con la aparición de fiebre y la activación del eje HHA. La comunicación entre las citocinas periféricas y el cerebro también se presenta en los plexos coroideos y en los órganos circunventriculares que carecen de barrera hematoencefálica, principalmente el AP recibe y traduce el estímulo mediado por las citocinas periféricas (Pavón-Romero y Garcés-Álvarez, 2016).

Las citocinas periféricas inducen la síntesis de prostaglandinas dentro del AP. El NTS y el RVM activan la liberación de catecolaminas hacia el PVN, resultando en la activación del eje HHA, lo que favorece una respuesta anti-inflamatoria (Pavón-Romero y Garcés-Álvarez, 2016).



**Figura 3.** Estimulación del cerebro vía neural por citocinas periféricas (Becerril *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Estimulación del cerebro vía humoral por citocinas periféricas (Becerril *et al.*, 2012).

Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva

### **1.5 La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su contribución en la inmunopatología de la TB.**

En el modelo experimental de TB pulmonar progresiva se ha demostrado que cuando la inmunidad protectora es máxima, al establecerse granulomas maduros constituidos por abundantes linfocitos Th1 y macrófagos (día 21 postinfección), las citocinas macrófagicas proinflamatorias IL1, IL6 y el  $TNF\alpha$  que se producen en los pulmones ejercen acciones locales fundamentales en la protección antibacteriana, pero estas citocinas también circulan sistémicamente, estimulando la producción de proteínas hepáticas de fase aguda (Hernández *et al.*, 1998) y activando a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (Hernández *et al.*, 1995). Las glándulas suprarrenales duplican su peso incrementando el cortisol plasmático, y se estimula a las células Th2 (Hernández *et al.*, 1995). Catabolitos no funcionales del cortisol (corticosterona) son reconvertidos en la forma activa de la hormona (cortisol), a través de la actividad de la enzima 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, contribuyendo así a generar una mayor concentración de cortisol en los pulmones enfermos (Rook *et al.*, 2000). Estas mismas anomalías se han observado en pacientes tuberculosos (Rook *et al.*, 1997).

### **1.6 Citocinas en el Sistema Nervioso Central**

La producción de citocinas en el Sistema Nervioso Central (SNC) se da principalmente por los astrocitos y la microglia, sin embargo, las neuronas pueden secretar citocinas en determinadas condiciones (Freidin *et al.*, 1992). Las citocinas se producen en la región circunventricular, el hipotálamo, el hipocampo, el cerebelo, los ganglios basales y en los núcleos del tallo cerebral (Maier *et al.*, 1998). Existen receptores para citocinas en el Sistema Nervioso Periférico y en el SNC. Principalmente, receptores para IL1, IL2, IL6 y  $TNF\alpha$  se encuentran altamente distribuidos en el hipocampo y el hipotálamo (Rothwell *et al.*, 1996).

El papel de las citocinas en el Sistema Nervioso es dual, ya que en un estado de homeostasis participan en procesos como la neurogénesis, el proceso de memoria y aprendizaje, la plasticidad neuronal y la neurogénesis (Marin y Kipnis, 2013); sin embargo, cuando el proceso inflamatorio se vuelve crónico y se establece un estado de neuroinflamación, se induce daño cerebral importante (Wang y Jin, 2015). Las estructuras del SNC afectadas por las citocinas producidas centralmente son el Locus cerúleo, el hipocampo, la corteza prefrontal y el hipotálamo (Anisman y Merali, 2003).

Dos procesos importantes que se han relacionado con el daño inducido por las citocinas en el SNC son la “conducta de enfermedad” (*Sickness behavior*) y la depresión mayor (Becerril *et al.*, 2012).

### **Conducta de enfermedad (*Sickness behavior*)**

La conducta de enfermedad se define como una serie de cambios conductuales coordinados que se presenta en individuos enfermos durante el curso de una infección, incluidos fiebre y cambios psicológicos. A nivel molecular, estos cambios se deben principalmente al efecto de las citocinas proinflamatorias como IL1 y TNF $\alpha$  en el cerebro. Como ya se mencionó, la producción de citocinas periféricas tiene un efecto en SNC a través de las vías neural y humoral. A nivel conductual, la conducta de enfermedad es una respuesta del individuo a los mecanismos que se presentan para “combatir” la infección (Dantzer, 2001). Etiológicamente, la conducta de enfermedad se conceptualiza como una fase de corta duración en respuesta a infecciones agudas y los traumas que generan inflamación (Maes *et al.*, 2012).

Dentro de los cambios conductuales que se presentan se encuentran sentimientos de desesperanza, estados depresivos, ansiedad, hipersomnia, pérdida del apetito, anhedonia y pérdida de la concentración (Dantzer, 2001).

El proceso que se presenta para combatir el fenómeno infeccioso consume gran cantidad de energía, por lo que se disminuye la cantidad de energía disponible. Las citocinas proinflamatorias, por ejemplo, TNF $\alpha$  modula el balance entre el aumento de la energía requerida por el organismo y la energía suplementada, así como el alimento ingerido, el gasto de energía y la utilización de sustratos. Las citocinas que llegan al SNC por medio de las vías neural y humoral apagan los procesos que consumen energía, como la actividad locomotora, la actividad cognitiva y la actividad reproductiva. La energía conservada al apagar estos procesos contribuye a mantener el estado febril y a aumentar el estado inflamatorio de las células inmunes. Muchos de los síntomas de la conducta de enfermedad, como la anergia, el malestar general, somnolencia, la pérdida de la actividad locomotora, déficits neurológicos y la pérdida de libido limitan la actividad motora, sexual y cerebral, y por ende disminuyen el gasto metabólico con el fin de combatir a la infección (Maes *et al.*, 2012).

El estado febril que se presenta en la conducta de enfermedad aumenta la defensa del hospedero contra la infección, ya que incrementa la fagocitosis, aumenta la movilidad de

leucocitos polimorfonucleares al sitio de infección, promueve la muerte bacteriana y previene la replicación viral. La pérdida de peso que se presenta durante la conducta de enfermedad se debe a la anorexia establecida por la respuesta inflamatoria. Esta pérdida de peso atenua la respuesta inflamatoria al disminuir las citocinas inflamatorias, como IL6 y  $TNF\alpha$  y aumentar los niveles plasmáticos de adiponectina que actúa como una proteína antiinflamatoria (Sharman y Volek, 2004).

### **Depresión**

Debido a las similitudes entre los síntomas de la enfermedad y los síntomas clínicos de la depresión, cualquiera de éstas enfermedades es probablemente un factor de riesgo para la aparición de trastornos depresivos mayores. Se ha determinado que la depresión mayor se asocia con elevaciones significativas en los niveles de citocinas proinflamatorias circulantes, en particular la IL-6 (Maes *et al.*, 2012). Es así como la activación crónica del sistema inmune innato puede propiciar el desarrollo de los trastornos depresivos, como se ejemplifica por las alteraciones psicopatológicas que ocurren en pacientes que reciben inyecciones repetidas de citocinas recombinantes, principalmente IL2 o  $IFN\alpha$ , para el tratamiento de infecciones virales (hepatitis C) o cáncer (Maes *et al.*, 2012). Durante las primeras etapas de la terapia con citocinas, todos los pacientes suelen desarrollar un episodio de comportamiento de la enfermedad, que se caracteriza por síntomas como fiebre, malestar general, anorexia, dolor y fatiga. En etapas posteriores de tratamiento, hasta un tercio de los pacientes desarrollan alteraciones del humor característico de la depresión, incluyendo tristeza, incapacidad de sentir, estado de ánimo. Estos cambios depresivos se han relacionado con la disminución del triptófano, lo cual se encuentra conexo con la disminución de la producción de serotonina y un aumento en las citocinas proinflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  que induce la activación de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que degrada el triptófano en quinurenina y ácido quinolínico. IDO está presente en los macrófagos y monocitos, células endoteliales y células gliales del cerebro (Dantzer *et al.*, 2008).

Es así como observamos que la producción de citocinas proinflamatorias induce conducta de enfermedad, sin embargo, la producción sostenida de citocinas proinflamatorias en el contexto de insuficiente producción de moléculas antiinflamatorias puede conducir a la depresión en personas vulnerables. Muchos factores, adquiridos o genéticos, pueden contribuir a la vulnerabilidad (Dantzer *et al.*, 2008).

## 2) ANTECEDENTES

### 2.1 Cambios conductuales durante enfermedades infecciosas

Algunos de los estudios que relacionan los cambios conductuales del huésped cuando se presentan infecciones crónicas incluyen las investigaciones en el modelo murino de *Taenia crassiceps*. En este modelo de estudio los ratones muestran cambios en el comportamiento sexual, la agresividad y la respuesta ante depredadores, así como hay una disminución en la memoria a corto plazo, una disminución en la conducta locomotora, y presencia de depresión, siendo más evidente en hembras infectadas que en los machos. Estos cambios se presentaron junto con un aumento en la expresión de IL4 en el hipocampo y con una disminución en los niveles de la serotonina (Morales-Montor *et al.*, 2014).

Otros estudios se han realizado en modelos animales coinfectados con *Toxocara canis* y con *Toxoplasma gondii* donde se ha observado que tanto ratones como ratas, crónicamente infectados, presentan cambios conductuales caracterizados por problemas de aprendizaje, daño en la memoria a corto plazo, aumento en la ansiedad y presencia de depresión (Queiroz *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2014).

Se ha observado daño en el Sistema Nervioso como respuesta a la inflamación causada durante sepsis ya que hay un aumento en los niveles de citocinas, quimiocinas prostaglandina y óxido nítrico (ON). Los pacientes con sepsis sufren de disfunción cerebral lo que causa déficits a largo tiempo como daño en la memoria, la atención y en la comunicación verbal, así como desordenes psiquiátricos incluyendo depresión, ansiedad y trastornos de estrés postraumático (Mazeraud *et al.*, 2016).

En un modelo animal de sepsis se observó daño significativo en la memoria a corto y largo plazo en la prueba de reconocimiento de objetos y síntomas similares a la depresión, ya que aumentó el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado; sin embargo, no se presentaron cambios en la ansiedad de los animales (Barichello *et al.*, 2007). En este mismo modelo se presentó una disminución en la ingesta de glucosa, parámetro utilizado para determinar conducta similar a la depresión, lo cual se asoció con disminución del peso corporal, incremento en el peso de la glándula adrenal y aumento en la concentración de corticosterona y ACTH, aunado a una significativa disminución del peso del hipotálamo y de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Comim *et al.*, 2010). Este cambio de tipo depresivo observado en los animales sobrevivientes a sepsis se relaciona con el aumento de  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  en el líquido cefalorraquídeo y con un aumento en la

producción de especies reactivas de oxígeno; es decir, se establece un estado de inflamación cerebral agudo que genera daño cognitivo y pérdida de la memoria en los animales con sepsis (Biff *et al.*, 2013). Hasta la fecha, no se sabe si la inflamación del cerebro y el daño oxidativo son una consecuencia directa de la inflamación sistémica o si son impulsados por células residentes del cerebro, como la microglia y los astrocitos (Michels *et al.*, 2014); sin embargo se ha observado que al administrar intracerebroventricularmente minociclina se presenta inhibición de la activación de la microglia lo que disminuye el daño oxidativo agudo en el cerebro, la inflamación y el deterioro cognitivo a largo plazo, así como el daño a la barrera hematoencefálica de los animales sobrevivientes a sepsis (Michels *et al.*, 2015).

## 2.2 Cambios conductuales causados por micobacterias

Con el fin de evaluar las bases neurobiológicas de la conducta similar a la depresión y la conducta de enfermedad se desarrolló un modelo de inflamación crónica inducido por la inoculación del *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) en ratones. En este modelo de estudio se ha observado que la inoculación de  $10^7$  UFC de este bacilo por vía intraperitoneal en ratones CD1 (Moreau *et al.*, 2008), ratones C57BL/6J (O'Connor *et al.*, 2009; Rodríguez-Zas *et al.*, 2015) y ratones BALB/c (Kelley *et al.*, 2013).

Este mismo modelo con BCG induce cambios conductuales agudos caracterizados por la presencia de conducta de enfermedad (pérdida de peso significativo durante la primera semana post infección y una disminución de la actividad locomotora, así como un aumento en la temperatura corporal) y en un proceso crónico la presencia de comportamiento similar a la depresión caracterizado por un aumento en la inmovilidad en las pruebas de nado forzado y suspensión de la cola, las cuales han sido descritas como pruebas óptimas para evaluar depresión (Nestler y Hyman, 2010).

El proceso depresivo inducido en los animales infectados con BCG es sensible a los antidepresivos fluoxetina, desipramina, y diazepam (Platt *et al.*, 2013). Estos cambios conductuales se han asociado al aumento de las citocinas proinflamatorias  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL1 e IL6 en la periferia, así con la activación crónica de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en la periferia, el pulmón y el cerebro, la cual está mediada directamente por la acción del  $IFN\gamma$  en sinergia con el  $TNF\alpha$  (O'Connor *et al.*, 2009).

La conducta de enfermedad y la conducta similar a la depresión presente en los animales infectados con BCG se ven potencializados con el envejecimiento de los animales de estudio, ya que se prolonga la inflamación inducida por el BCG (Kelley *et al.*, 2013).

### **2.3 Cambios conductuales durante TB pulmonar**

La relación entre TB y enfermedades mentales es compleja, debido a que ambas entidades tienen factores de riesgo en común como la infección por HIV o la migración de países donde la TB es endémica, todo esto acompañado de estrés crónico, alcoholismo y adicciones a drogas. Por otro lado, se ha reportado que más del 70% de los pacientes tuberculosos tienen algún tipo de alteración mental o psiquiátrica, ya que se ha demostrado que el 68% de los enfermos hospitalizados sufren de enfermedad depresiva y de ansiedad (Martens, 2001).

Como ya se mencionó, las poblaciones con enfermedades mentales severas experimentan varias circunstancias que los hacen propensos a la infección de TB. Esto último lo comprueba un estudio realizado en un grupo de 71 personas con enfermedades mentales persistentes y severas (esquizofrenia, desorden esquizoafectivo, desorden delirante, psicosis y desordenes de personalidad), donde se evaluó la prevalencia de la infección de TB latente mediante un test de tuberculina cutánea (PPD), encontrando que 12 de los 71 pacientes (17%) fueron positivos para esta prueba y 8 reportaron que recibieron quimioterapia para TB en algún momento antes de la prueba, lo cual estuvo asociado al estado migratorio de los pacientes, uso de drogas inyectables, abuso de alcohol, vagabundez, desnutrición e infección con VIH (McQuiston *et al.*, 1997).

A los enfermos con TB se les ha asociado con el miedo y el aislamiento social. En un estudio realizado en pacientes tuberculosos de Vietnam se observaron tres consecuencias sociales posteriores a la adquisición de dicha enfermedad, entre las que se encuentran en primer orden una reacción negativa al diagnóstico inicial de la enfermedad, ya que la mayoría de los pacientes se mostraron en “shock”, desilusionados y pesimistas ante el diagnóstico (Long *et al.*, 2001). Otro aspecto que se observó fue que estos pacientes consideran que la enfermedad aumenta el nivel de pobreza de sus familias, lo que les genera preocupación. Finalmente, éstos se sienten aislados dentro de la familia y la comunidad por medio al contagio de la enfermedad lo cual los lleva a estados depresivos afectando las relaciones con sus amigos y familia (Long *et al.*, 2001). Resultados similares se encontraron en un estudio realizado en el Sur de la India (Rajeswari *et al.*, 2005). En relación a esto último se

ha establecido que las enfermedades pulmonares se encuentran dentro de las patologías crónicas que más fuertemente se asocian con desordenes psiquiátricos (Wells *et al.*, 1988) como la depresión y la ansiedad. Existen diversos estudios donde se demuestra que pacientes tuberculosos presentan altos niveles de estos desordenes psiquiátricos. Un ejemplo es el trabajo realizado en 100 pacientes con TB hospitalizados donde se encontró que 22 sujetos presentaron depresión leve, 38 moderada y 8 severa (Westaway y Wolmarans, 1992). Apoyando estos resultados se ha reportado que el 11.3 % de pacientes tuberculosos en un estudio realizado en el sur de Nigeria presentaron episodios de depresión menor y el 15.1% desorden generalizado de ansiedad (Aghanwa y Erhabor, 1998). En otro estudio realizado con 42 pacientes recientemente diagnosticados con TB pulmonar, 38 que abandonaron la quimioterapia y 39 diagnosticados con TB multidrogoresistente se evaluó la presencia de ansiedad y depresión por medio de un estudio GHQ-12, se encontró depresión y ansiedad en el 19% de los pacientes recientemente diagnosticados, en el 21.6 % de los que abandonan la terapia y en el 25.6 % de los pacientes con TB multidrogoresistente (Aydin y Uluşahin, 2001).

Finalmente se han realizado estudios con el fin de analizar las características psicológicas y sociales en pacientes con TB pulmonar tanto en la etapa temprana como en la crónica de la enfermedad por medio de estudios multifactoriales de personalidad, se reportó que sin importar la duración de la enfermedad, se presentan cambios conductuales caracterizados por un comportamiento alterado, alteraciones en la actitud contra otras personas y ellos mismos, así como manifestaciones peligrosas para la sociedad y comportamiento agresivo (Sukhova, 2003). De igual manera se presentan conflictos de somatización y respuesta hipostenica (respuesta inhibitoria al estrés) que conllevan al desarrollo de enfermedades psicósomáticas que tienen como consecuencia la aparición de depresión mayor (Sukhova, 2004). Finalmente se ha observado que los pacientes con TB desarrollan fobia social y reacciones depresivas con una actitud destructiva hacia la enfermedad (Sukhova *et al.*, 2006).

### **3) JUSTIFICACIÓN**

Como se ha mencionado anteriormente, en buena medida la explicación de las alteraciones mentales que sufren los pacientes tuberculosos tales como depresión, ansiedad, pérdida de la memoria y déficit cognitivo se han relacionado con factores sociales como la marginación, estigmatización y preocupación generada por saber que se es portador de una enfermedad grave y altamente contagiosa. Sin embargo, se ha observado en diversos

estudios que las citocinas proinflamatorias, participan en el desencadenamiento de alteraciones conductuales. Debido a que la TB pulmonar es una enfermedad infecciosa que cursa con inflamación crónica, es probable que estas alteraciones neuroinmunológicas también se produzcan en ausencia de infección cerebral por las micobacterias, por lo que es necesario conocer los cambios en la respuesta inflamatoria, inmunológica y conductual en el cerebro durante la TB pulmonar progresiva.

#### 4) HIPÓTESIS

La TB pulmonar, estimula al cerebro por las vías humoral y neural, particularmente al hipocampo e hipotálamo de forma prolongada e induce la producción crónica de diversas citocinas, como  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e  $IL12$  por neuronas y microglia, las cuales producen un estado de neuroinflamación que genera daño neuronal con alteración en la producción de neurotransmisores y manifestaciones neuropsiquiátricas como conducta de enfermedad ("*Sickness behavior*"), daño en el estado neurológico, pérdida de la memoria, conducta de ansiedad y conducta de depresión.

#### 5) OBJETIVOS

##### a) GENERAL

Analizar algunos componentes de la respuesta inflamatoria e inmunológica local en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo, así como los cambios en la estructura celular del cerebro, la neurotransmisión y la conducta en un modelo murino de TB pulmonar progresiva sin infección cerebral.

##### b) PARTICULARES

En el modelo murino de TB pulmonar sin infección cerebral

- ❖ Caracterizar la respuesta inmunológica al evaluar la expresión génica de  $IL1\beta$ ,  $IL4$ ,  $IL6$ ,  $IL10$ ,  $IL12$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ,  $iNOS$ ,  $TGF\beta$  e  $IDO$  en el hipotálamo, cerebelo e hipocampo.
- ❖ Determinar los cambios celulares en el cerebro por histología y microscopía electrónica.
- ❖ Estudiar los cambios neuroquímicos al cuantificar la cantidad de los neurotransmisores dopamina, noradrenalina, epinefrina y serotonina en el hipotálamo, cerebelo e hipocampo.

- ❖ Realizar pruebas conductuales para determinar el efecto de la infección sobre el estado neurológico, conducta de enfermedad, conducta de ansiedad, conducta similar a la depresión y memoria a corto y largo plazo durante el curso de la enfermedad.

## 6) METODOLOGÍA

### 6.1 Reactivos

Los medios Middlebrook 7H9 y 7H10 y el OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa) se obtuvieron de Beckton-Dickinson (Difco™, USA). El Rneasy® Mini Kit para la extracción de RNA, el Omniscript® Reverse Transcription Kit para la obtención de DNA complementario y el QuantiTect™ SYBR® para RT-PCR se obtuvieron de Qiagen (USA). Los primers de los genes analizados se obtuvieron de Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific (California, USA). Los estándares de dopamina, serotonina, epinefrina y norepinefrina, así como el ácido ascórbico y la L-cisteína se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El acetonitrilo grado HPLC, el ácido perclórico y el EDTA se obtuvieron de J.T. Baker (Ciudad de México, México). El kit Pierce BCA Protein Assay para la cuantificación de proteínas se obtuvo de Thermo Fisher Scientific (California, USA).

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

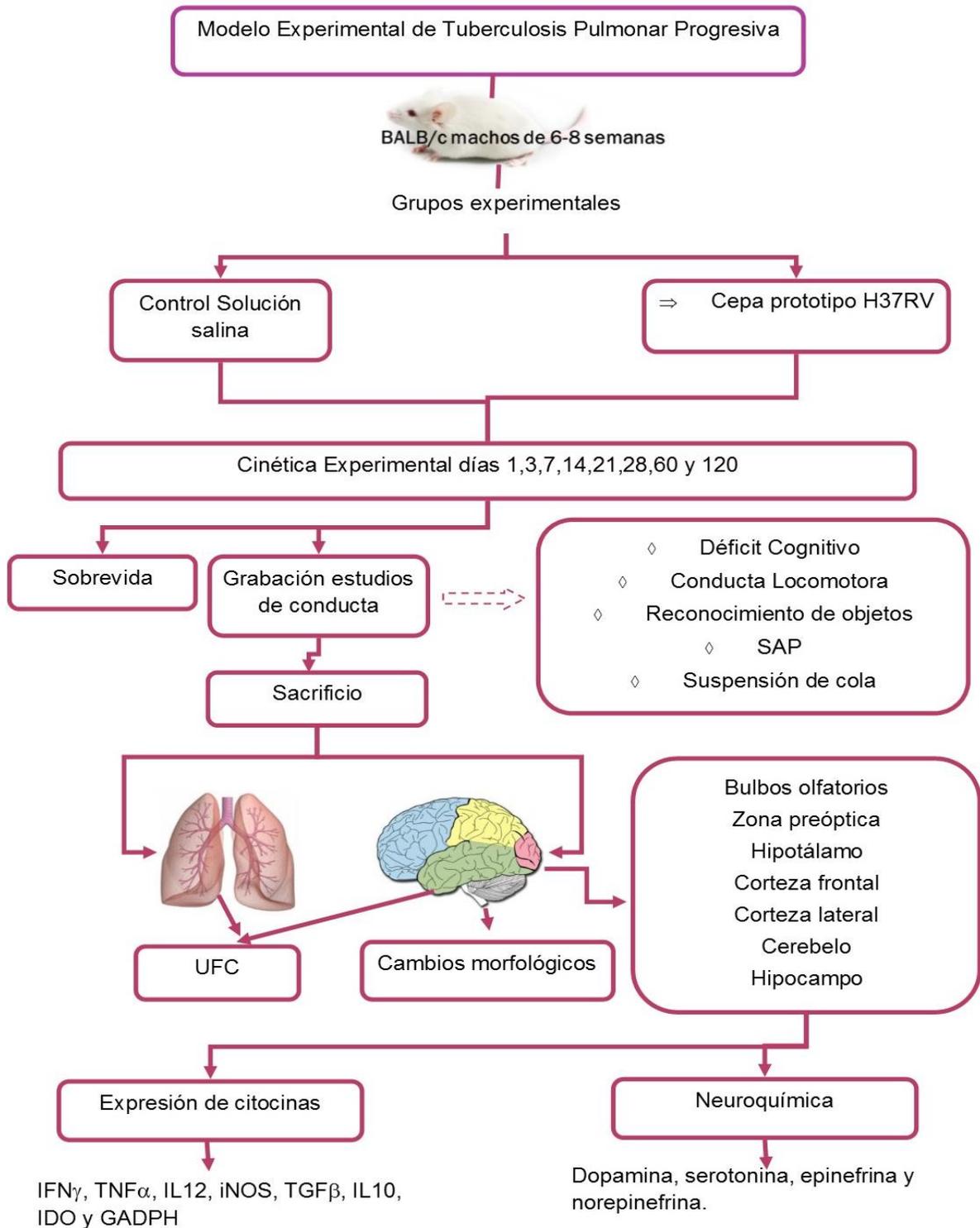
Se utilizó agua desionizada obtenida con un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA) para preparar las soluciones.

### 6.2 Ubicación

La parte experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) y en el Laboratorio de Psicoimmunología del Departamento de Investigación en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INP).

### 6.3 Diseño experimental

Con el fin de cumplir los objetivos del presente trabajo se planteó el siguiente esquema metodológico (Figura 5):



**Figura 5.** Diagrama de diseño experimental seguido en este trabajo. Los detalles de la metodología se describen en el texto.

#### 6.4 Preparación de inóculos

Para la infección con *M. tuberculosis*, se utilizó la cepa prototipo H37RV. La cepa se creció en medio 7H9 Middlebrook (Difco) enriquecido con OADC (Becton Dickinson) a 37°C en agitación constante por aproximadamente 21 días. El crecimiento bacteriano fue monitoreado por densitometría (600 nm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Una vez en esta etapa, las bacterias fueron cosechadas y almacenadas en alícuotas a -70°C. Se prepararon inóculos ajustando a  $2.5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 µL de solución salina, los cuales fueron ocupados inmediatamente para la infección.

#### 6.5 Modelo murino de TB pulmonar progresiva

El modelo murino de TB pulmonar progresiva ha sido previamente descrito (Hernández-Pando *et al.*, 1996). En este experimento por cada cepa se anestesiaron 24 ratones singénicos BALB/c machos de 6-8 semanas de edad con sevoflurano (Sevorane) y se inocularon vía intra-traqueal con  $2.5 \times 10^5$  UFC de la cepa H37RV en 100 µL de solución salina. Los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación (presencia de reflejos y contracción muscular); después fueron albergados en grupos de 10 animales en cajas de policarbonato (microaisladores) almacenadas dentro de un sistema de micro-ventilación individual positiva (Allentown). Durante todo el experimento se monitoreó la sobrevivencia de los animales. Se sacrificaron 3 ratones por grupo en cada tiempo de sacrificio los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 pos-infección mediante dislocación cervical. Se recuperaron ambos pulmones los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido para la determinación de UFC y para estudios de biología molecular respectivamente. Además se extrajo el cerebro obteniendo por separado los bulbos olfatorios, la zona pre óptica, el hipotálamo, la corteza frontal, la corteza lateral, el cerebelo y el hipocampo de acuerdo con *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos y Franklin, 2012), los cuales se congelaron para los estudios de biología molecular y los estudios neuroquímicos por HPLC. Los últimos se realizaron en el laboratorio de Psicoinmunología del Dr. Lenin Pavon Romero en el Instituto Nacional de Psiquiatría. Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en una campana de seguridad biológica tipo 3. El uso de animales fue aprobado por el comité de ética del INCMNZZS.

## 6.6 Determinación de la carga bacilar en pulmón y en cerebro por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Tres pulmones (lóbulo derecho) y tres cerebros por tiempo de sacrificio se homogenizaron de forma mecánica con perlas de sílice y zirconia en un equipo MP fast prep24 en tubos estériles con 1 mL de solución PBS-tween 0.05%. Cuatro diluciones (Cuadro 2) y el concentrado de cada homogenizado se sembraron por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco) enriquecido con OADC (Becton Dickinson), las cuales se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. El conteo de colonias se realizó a los 14 y 21 días después de la siembra. El número total de bacterias en cada órgano se obtuvo del producto entre el número total de colonias contadas en cada dilución por su respectivo factor de dilución.

**Cuadro 2.** Factores de dilución utilizados para cuantificar UFC.

Dilución	Factor de dilución
Concentrado	100
-1	1000
-2	1*10 <sup>4</sup>
-3	1*10 <sup>5</sup>
-4	1*10 <sup>6</sup>

## 6.7 Análisis de citocinas por RT- PCR

De tres ratones por tiempo de sacrificio se extrajo ARN del hipocampo, hipotálamo y cerebelo de los animales infectados y los animales control. Cada segmento anatómico se colocó en un tubo MP y se homogenizó de forma mecánica con perlas de sílice y zirconia en un equipo MP fast prep24. Una vez que se homogenizó el tejido, la extracción prosiguió conforme a las especificaciones del Kit Mini RNeasy (Qiagen).

El ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (A 260/280) por Nanodrop (Thermo Scientific) y mediante un gel de agarosa se verificó su integridad. Se ocuparon 100 ng de ARN para la producción de cDNA mediante una reacción de retro-transcripción (RT) siguiendo las indicaciones del kit Omniscript (Qiagen). Con el producto se realizó una PCR de punto final para amplificar el gen constitutivo de la deshidrogenasa gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15

min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 60s y extensión final a 72°C por 10 min.

Para la RT- PCR en Tiempo Real (PCR-TR) se utilizó el sistema PCR-TR 7500 (Applied Biosystems), y el kit Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen), incluyendo en cada corrida las curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas de productos de PCR cuantificados de cada una de las citocinas, así como un control negativo. Primers específicos (Invitrogen) se diseñaron con el programa BLAST (Pubmed) para IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL12, iNOS, IL10 y TGF $\beta$  y el gen constitutivo GAPDH (Cuadro 3). El número de copias de cada citocina fue normalizado con un millón de copias de ARNm que codifica para el gen GAPDH. La reacción se efectuó con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 s, 60°C por 20 s y 72°C por 35 s.

**Cuadro 3.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real.

<i>Gene</i>	<b>Iniciador sentido</b>	<b>Iniciador antisentido</b>
<i>GAPDH</i>	5'-CATTGTGGAAGGGCTATGA-3'	5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'	5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3'
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	5'- CCTCAACTTGGCAATCTCATGA-3'	5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3'
<i>iNOS</i>	5'-TGGCTCGCTTTGCCACGGAC-3'	5'-GCTGCGACAGCAGGAAGGCA-3'
<i>IL1<math>\beta</math></i>	5'-AATACCTGTGGCCTTGGGC-3'	5'-GCTTGGGATCCACACCAGCATC-3'
<i>IL12</i>	5'-GGATGGAAGAGTCCCCAAA-3'	5'-GCTCTGCGGGCATTTAACAT-3'
<i>IL10</i>	5'-ACTCTGTTGCCTCC-3'	5'-TCTACGCTCGTGGGACAG-3'
<i>TGF<math>\beta</math></i>	5'-GTGGCTGAACCAAGGAGACG-3'	5'-GCTGATCCCGTTGATTTCCA-3'
<i>IDO</i>	5'-CAGGCCAGAGCAGCATCTTC-3'	5'-GCCAGCCTCGTGTTTTATTCC-3'
<i>IL4</i>	5'-GCTCTTAGGCTTTCCAGGAAG-3'	5'-GGACCCCAAACAGCTGGAATAGAGC-3'

## 6.8 Estudios de conducta

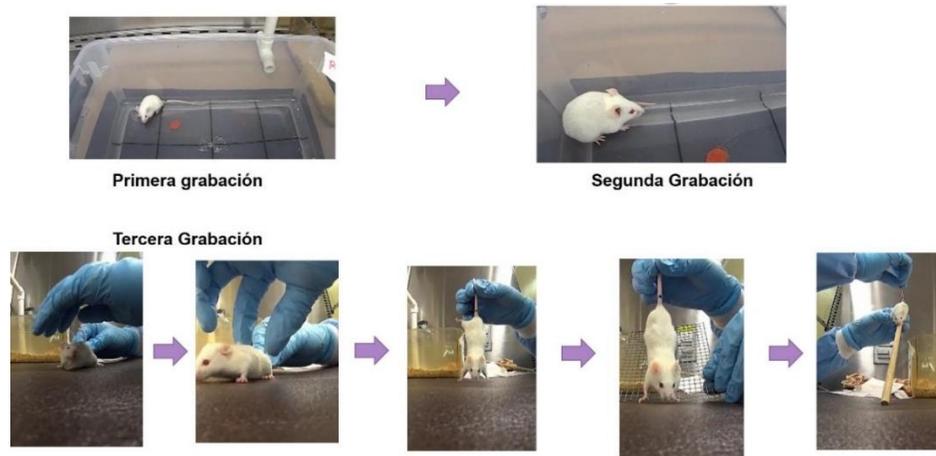
Con el fin de evaluar los cambios conductuales que se presentan durante la TB pulmonar progresiva, se realizaron pruebas conductuales para valorar el estado neurológico, la conducta motora, la memoria a corto plazo y la conducta similar a la depresión que presentan los ratones durante el curso de la enfermedad.

Para cada prueba se utilizaron 3 ratones por día de sacrificio. A continuación, se describen por separado cada una de las pruebas conductuales que se llevaron a cabo:

- *Valoración neurológica*

El déficit neurológico en humanos se define como una anomalía funcional de un área del cuerpo, debido a una disminución del funcionamiento del cerebro, la médula espinal, los músculos o los nervios. Dentro de las anomalías que se presentan encontramos pérdida de los reflejos, incapacidad para hablar, disminución de la sensibilidad, pérdida del equilibrio, problemas con la actividad mental, cambios visuales, problemas para caminar, debilidad, entre otros.

El déficit neurológico en ratones se determina con la escala de valoración sensitivo-motora, que tiene una puntuación máxima de 30 puntos (Neurological Severity Score NSS). En esta prueba se cuantifican parámetros del comportamiento como la actividad motora y la orientación. Cuenta con una serie de valoraciones que abarcan las funciones motora y sensorial, el test de equilibrio de viga y la medida de ausencia de reflejos (Bonilla *et al.*, 2012). Con el fin de evaluar estos cambios se realizó una prueba que consta de tres fases, para esto, los animales se habituaron a las cajas donde se realizaron las pruebas durante 30 min por la mañana y por la tarde, 24 h antes de que se realizaran las evaluaciones. Durante la primera filmación se colocó al animal en una caja de plástico de 45 x 20 x 20 cm y se grabó su comportamiento durante 30 s. En la segunda filmación se acercó la cámara hacia los costados, la cabeza y la cola procurando que los movimientos de la cámara fueran lentos prestando más atención en los ojos. En la tercera grabación se cubrió al animal con la mano sin impedir su escape, posteriormente con los dedos pulgar e índice se presionó los costados de la zona abdominal (parte baja del abdomen y la pelvis). Un abdomen firme se consideró como normal, mientras que un abdomen flácido se considera como anormal. Después, el animal se levantó por la cola y se descendió lentamente hasta que tocó el tapete, procurando que su nariz apuntara a la cámara, posteriormente se colocó sobre una rejilla y jaló suavemente de la cola, a continuación, se trató de poner de espaldas en dos ocasiones. En seguida se colocó al ratón sobre un palo de madera a 45° y en posición horizontal a 15-20 cm del suelo. Se pinzó moderadamente la cola a 1 cm de la base por 2 s. Finalmente, se tocó con un hisopo las vibrisas del animal, se empujó el costado izquierdo y se movió el hisopo hacia los lados enfrente a la cabeza del ratón sin tocarlo y a una distancia entre 1-2 cm y se roció el hisopo con alcohol al 70% acercándolo a la nariz del ratón (Figura 6).



**Figura 6.** Imágenes representativas de la prueba realizada para evaluar el estado neurológico de los ratones.

Durante cada grabación se observaron los siguientes puntos, calificándolos en términos de ausente (0) o presente (1), a excepción de la hipomobilidad, falta de coordinación motora y el equilibrio que se calificó como débil (1), moderado (2) o fuerte (3). La calificación máxima fue de 31 puntos considerándose normal de 3 a 5. En el cuadro 4 se muestran los parámetros evaluados en esta prueba.

**Cuadro 4.** Parámetros evaluados para determinar el estado neurológico de los ratones.

Grabación 1	Grabación 2	Grabación 3
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipomobilidad</li> <li>• Postura lateralizada</li> <li>• Postura aplanada</li> <li>• Postura encorvada</li> <li>• Piloerección</li> <li>• Ataxia</li> <li>• Vueltas</li> <li>• Temblores</li> <li>• Convulsiones</li> <li>• Respiración angustiada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pasividad</li> <li>• Hiperreactividad</li> <li>• Irritabilidad</li> <li>• Párpados caídos</li> <li>• Urinación</li> <li>• Decremento del tono muscular</li> <li>• Flexión de las extremidades</li> <li>• Decremento de la fuerza muscular</li> <li>• Rotación del cuerpo</li> <li>• Falta de coordinación motora</li> <li>• Pérdida del equilibrio</li> <li>• Hipoalgesia</li> <li>• Hiperalgesia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad al tocar las vibrisas</li> <li>• Sensibilidad al tocar el abdomen</li> <li>• Sensibilidad a los olores</li> </ul>

- *Prueba de conducta locomotora*

Con el fin de evaluar la conducta locomotora se llevó a cabo el test de exploración libre. Este test es un procedimiento desprovisto de estímulos estresantes, que permite indagar los efectos sobre la ansiedad y sobre la actividad locomotora (Cárdenas y Navarro, 2002). Para realizar esta prueba los animales fueron habituados por 5 min en una caja de 45 x 20 x 20 cm, la cual se dividió en 8 cuadrantes del mismo tamaño. Posteriormente se colocaron y filmaron en el interior de la caja durante 15 min, se contó el número de veces que el animal cruzó el cuerpo completo de un cuadrante a otro (Figura 7).



Duración 15 minutos

**Figura 7.** Imágenes representativas de la prueba para evaluar la conducta locomotora.

- *Prueba de reconocimiento de objetos*

Esta prueba fue realizada con el fin de valorar los efectos de la enfermedad sobre la memoria y los mecanismos neurobiológicos relacionados con el aprendizaje y la memoria; se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos y ambientes y compararlos con otros que les son familiares. Al exponer al ratón a una serie de objetos se espera a que éste los explore y se mide el tiempo de exploración, que se define como el período durante el cual el animal olfatea el objeto con las patas delanteras a una distancia menor o igual a 1 cm (Navarrete *et al.*, 2008). Esta prueba se basó en lo descrito por Leger *et al.*, 2013 y se desarrolló en tres sesiones. En la primera sesión los animales se sometieron a una habituación corta por 15 min en una caja de 45 x 20 x 20 cm marcada con dos puntos rojos en la parte media anterior. Durante la habituación se dejó explorar el entorno de la caja. En la segunda sesión se colocó un objeto A (piedra) y se dejó explorar durante 3 min, posteriormente se regresó al animal a su microaislador y 30 min después se colocó el objeto B (letra de plástico) junto al objeto A (piedra) y se colocó el animal nuevamente en la parte media de la caja y se dejó explorar durante 3 min. Después de 24

h se realizó la tercera sesión, donde se colocaron los objetos A (piedra) y C (sacapuntas) sobre los dos puntos rojos marcados en la caja y se siguió el comportamiento por 3 min (Figura 8). Para evaluar la memoria a corto plazo se obtuvo la frecuencia de interacción del objeto B en comparación con el objeto A, y para la memoria a largo plazo del objeto C con el objeto A con las siguientes formulas:

$$\text{Frecuencia de interacción de A} = \frac{\# \text{ de interacciones con A}}{\# \text{ de interacciones de A} + \# \text{ de interacciones de B ó C}}$$

$$\begin{aligned} & \text{Frecuencia de interacción de B ó C} \\ &= \frac{\# \text{ de interacciones con B ó C}}{\# \text{ de interacciones de A} + \# \text{ de interacciones de B ó C}} \end{aligned}$$



**Figura 8.** Imágenes representativas de la prueba de reconocimiento de objetos realizada para evaluar la memoria a corto y largo plazo.

- *Prueba de Toldo de Postura de Atención Extrema SAP*

La conducta de SAP se interpreta como un método conductual no social para estudiar conductas de conflicto (Kaesermann, 1986). La postura de atención extrema es un componente importante de las conductas de riesgo que forman parte del repertorio de conductas defensivas de los roedores. Esta postura de SAP refleja cierta ambivalencia entre aproximación y evitación. En ella, el animal se estira en toda su longitud sin desplazarse o moviéndose muy lentamente (Cárdenas y Navarro, 2002). En esta prueba se utilizó una plataforma circular grande, elevada a 35-40 cm del piso de la campana y se colocó a 4 cm un toldo circular chico sujetado por el pilar central. Posteriormente se introdujo al ratón en la zona cubierta de la plataforma y se filmó durante 5 min con la cámara sobre

la plataforma abarcando toda su circunferencia. Se contó el número de veces que el ratón saco la cabeza completa de la zona cubierta de la plataforma (Figura 9).



**Figura 9.** Imágenes representativas de la prueba Toldo de Postura de Atención Extrema SAP para evaluar ansiedad.

- *Prueba de suspensión de la cola*

La prueba de suspensión de cola es un test validado para evaluar conducta similar a la depresión en roedores (Nestler y Hyman, 2010). Esta prueba se basa en la observación de que los ratones, que inicialmente siguen movimientos de escapatoria, desarrollan una postura de inmovilidad cuando se encuentran en un sitio sin salida, la inmovilidad refleja una pérdida de persistencia en el comportamiento de escape (desesperanza conductual) o el desarrollo de un comportamiento pasivo (Cárdenas y Navarro, 2002). Para realizar esta prueba los animales se colgaron por la cola durante 6 min en un tripie de 30 cm de altura y se grabó su comportamiento poniendo mayor énfasis en el momento en el que el animal dejaba de moverse. Se cuantificó el tiempo que el animal permanece tanto móvil, como inmóvil durante los 6 min de grabación (Figura 10). El tiempo de inmovilidad es directamente proporcional al grado de depresión que presenta el animal.



**Figura 10.** Imágenes representativas de la prueba de suspensión de la cola para evaluar conducta similar a la depresión.

Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva

## 6.9 Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El hipotálamo, hipocampo y cerebelo se disectaron de encéfalos frescos, recién obtenidos de 3 ratones machos infectados y 3 animales control no infectados en cada uno de los tiempos de sacrificio mencionados. Cada muestra se colocó en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL los cuales contenían 300  $\mu$ L de buffer de conservación compuesto de ácido ascórbico 5%, fosfato dibásico 200 mM, L-cisteína 2.5 mM y EDTA 2.5 mM y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Extracción de neurotransmisores

Para el procesamiento de la muestra estas se homogenizaron de forma mecánica agregando 75  $\mu$ L de  $\text{HClO}_4$  3.4 M con el fin de precipitar las proteínas, una vez macerado el tejido se centrifugó a 16128 rcf durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido se filtró con unidades de filtración con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  con el fin de eliminar pequeñas partículas, una vez realizado esto, las muestras se colocaron en una columna de extracción en fase sólida (SPE) ( $\text{C}_{18}$ ), la cual se equilibró previamente con 1 mL de la fase móvil A (fosfatos 20 mM, pH 2.5). Se colectó la muestra eluída a través de la columna SPE y se colocaron en viales para HPLC, para determinar los niveles de neurotransmisores: dopamina, norepinefrina, epinefrina y serotonina.

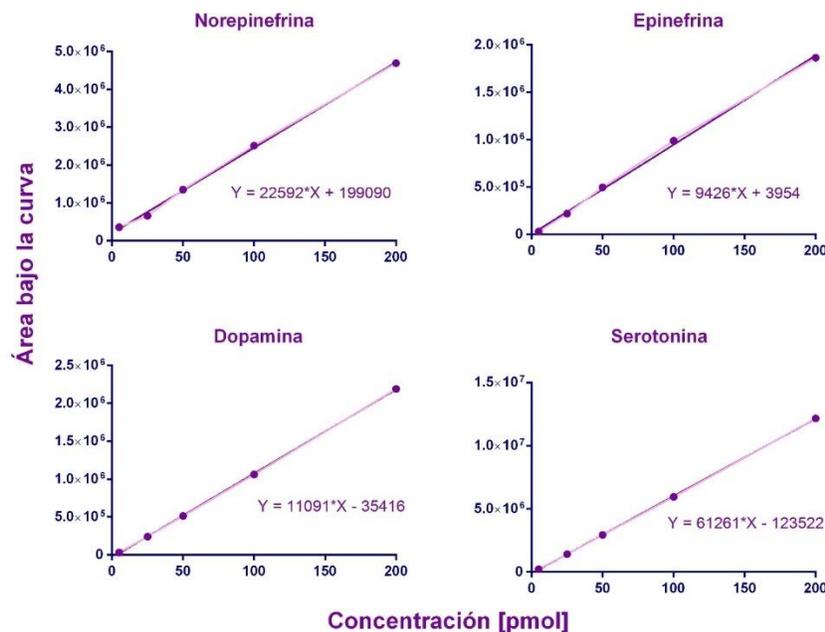
### Condiciones cromatográficas

Las concentraciones de neurotransmisores se determinaron mediante análisis cromatográfico de fase reversa. Los analitos se separaron con un gradiente isocrático de fase móvil de fosfatos 20 mM pH 2.5 con una temperatura de columna de  $30^{\circ}\text{C}$  y un flujo de 0.8 mL/minuto durante 20 min, tiempo suficiente para la elución de los analitos de interés. Posteriormente, se utilizó el modo gradiente para subir el porcentaje de la fase móvil B (50% de fase móvil A y 50% de acetonitrilo) hasta 80 % hasta los 24 min para regenerar la columna y finalmente se equilibró la columna del minuto 25 al 40, como se describe en el cuadro 5. Todas las muestras se analizaron por triplicado. El análisis cromatográfico se realizó utilizando una bomba marca Waters modelo 515, un automuestreador marca Waters modelo 717 plus, un detector de fluorescencia marca Jasco modelo X-LC3120FP y una columna cromatográfica de fase reversa marca Phenomenex modelo Júpiter (5 $\mu$ /C18/300A) de 250 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula. La detección se realizó ajustando el detector a una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión de 315 nm. Los perfiles cromatográficos obtenidos fueron procesados

utilizando el software Millenium (Waters™). Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico descrito se realizó una curva patrón con concentraciones de 5 pmol hasta 200 pmol de los neurotransmisores a analizar. La representación gráfica del área de cada neurotransmisor en el eje de ordenadas y de la concentración de cada neurotransmisor en el eje de abscisas se ajustó a una línea recta (Figura 11). Se obtuvo la concentración de cada neurotransmisor en relación a los  $\mu\text{g}$  de proteína en cada muestra, las cuales fueron cuantificadas con el kit Pierce BCA ProteinAssay (ThermoScientific).

**Cuadro 5.** Programa de gradientes utilizado para la cuantificación de neurotransmisores.

Tiempo (min)	Flujo	% Fase A	% Fase B
0	0.8	100	0
19	0.8	100	0
20	0.8	20	80
24	0.8	20	80
25	0.8	100	0
40	0.8	100	0



**Figura 11.** Curvas de linealidad obtenidas para la epinefrina, norepinefrina, dopamina y serotonina bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto

### 6.10 Análisis morfológico

Un grupo de 24 ratones machos BALB/c fueron infectados por vía intratraqueal con  $2.5 \times 10^5$  bacterias vivas de la cepa de referencia H37RV. Se contó con un grupo control con el mismo número de animales al cual se le administró solución salina vía intratraqueal. En los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120, grupos de 3 ratones fueron perfundidos por vía intracardiaca con paraformaldehído al 4% disuelto en PBS. Posterior a la perfusión se obtuvieron los cerebros y se incluyeron en parafina para procesarlos con la técnica histológica. Cada bloque obtenido se cortó en secciones de 4  $\mu\text{m}$ . Los cortes en parafina se tiñeron con hematoxilina/eosina para evaluar muerte neuronal. Por otro lado, una parte del material se procesó para microscopia electrónica, para realizar esto se incluyó en resina Epon previa post-fijación con tetraóxido de osmio, se realizaron cortes finos de 70 a 80 nm los cuales se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para posteriormente analizarlos con el microscopio electrónico.

### 6.11 Análisis estadístico

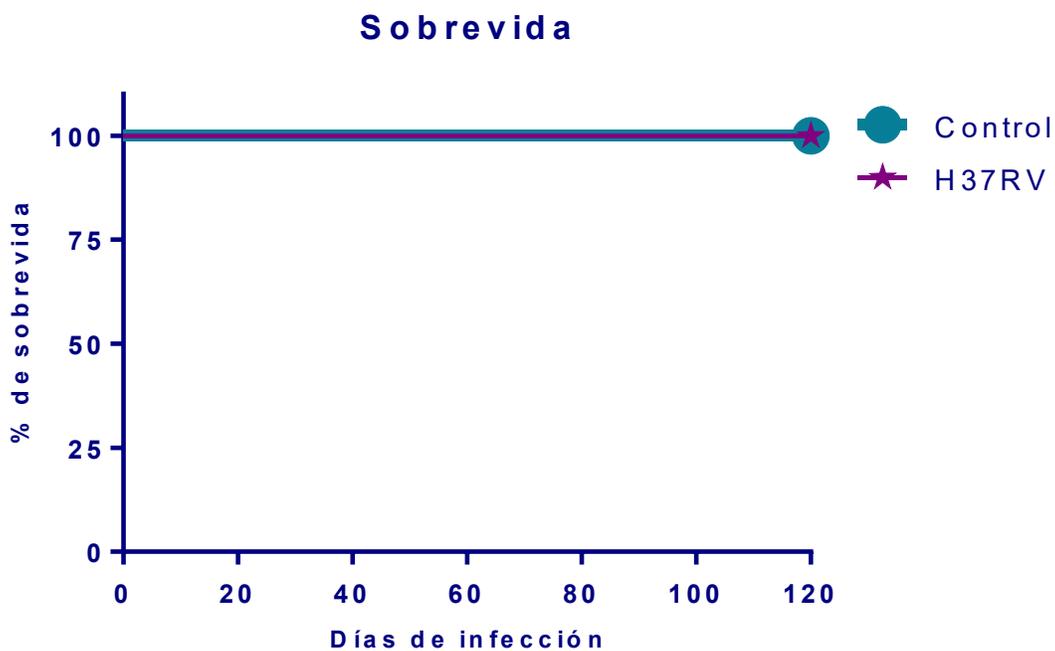
El análisis estadístico se realizó mediante el software Prism versión 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para la curva de supervivencia se utilizó la prueba de Log Rank y Kaplan-Meier. La expresión de citocinas por RT-PCR, las pruebas conductuales y los niveles de neurotransmisores se analizaron por ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Sidak (comparación de cada grupo contra el control). Los pesos corporales se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## 7) RESULTADOS

Tomando como referencia el modelo murino de TB pulmonar progresiva anteriormente descrito, se infectó un grupo de ratones con la cepa de *M. tuberculosis* H37RV.

### 7.1 Sobrevida

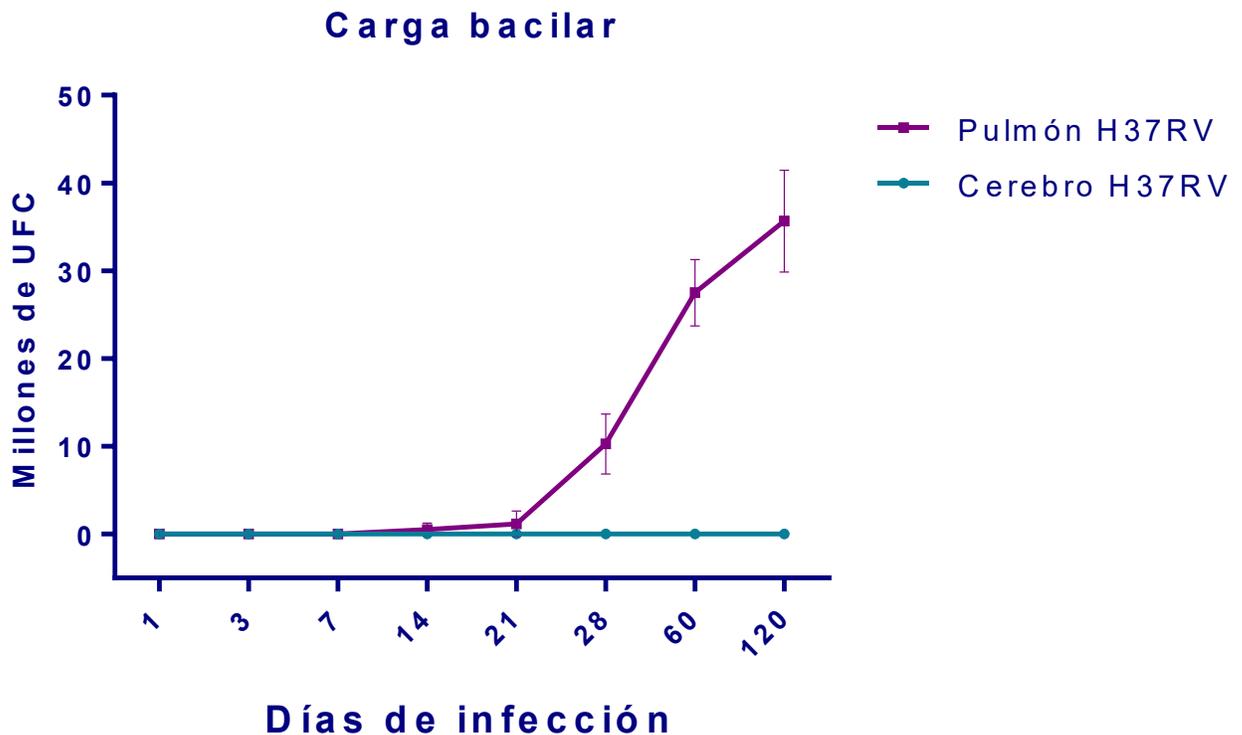
Durante el transcurso de la enfermedad se monitoreo la sobrevida de los animales infectados. Los animales infectados con la cepa prototipo H37RV mostraron el 100% de sobrevida durante todo el experimento (4 meses) al igual que el grupo control (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje de sobrevida a lo largo del tiempo producido por la cepa prototipo H37RV en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal. No se presentaron diferencias estadísticas en comparación con el grupo control sin infectar mediante la prueba estadística Kaplan-Meier (n=24 ratones por grupo experimental).

### 7.2 Carga Bacilar

En cuanto a la carga bacilar en el cerebro, en los animales infectados no se presentó crecimiento; por otro lado, en los pulmones de los animales infectados con la cepa H37RV se presentó una carga de bacterias que fue incrementando de forma progresiva desde el día 1 hasta el día 120 de infección (Figura 13).



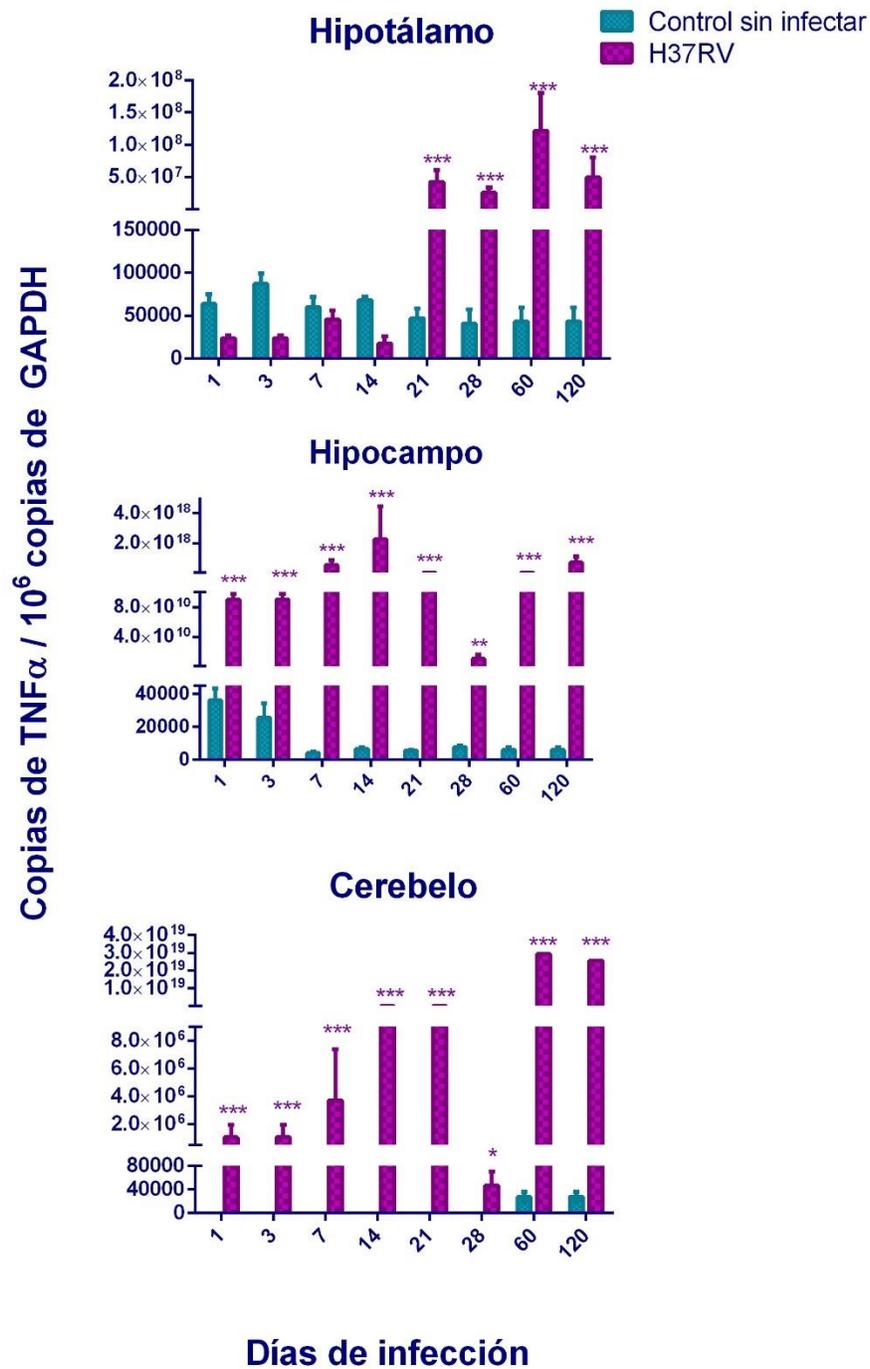
**Figura 13.** Determinación de la carga bacilar en homogenizados de pulmón y cerebro de ratones infectados con la cepa H37RV (n=24).

### 7.3 Expresión de citocinas por RT-PCR

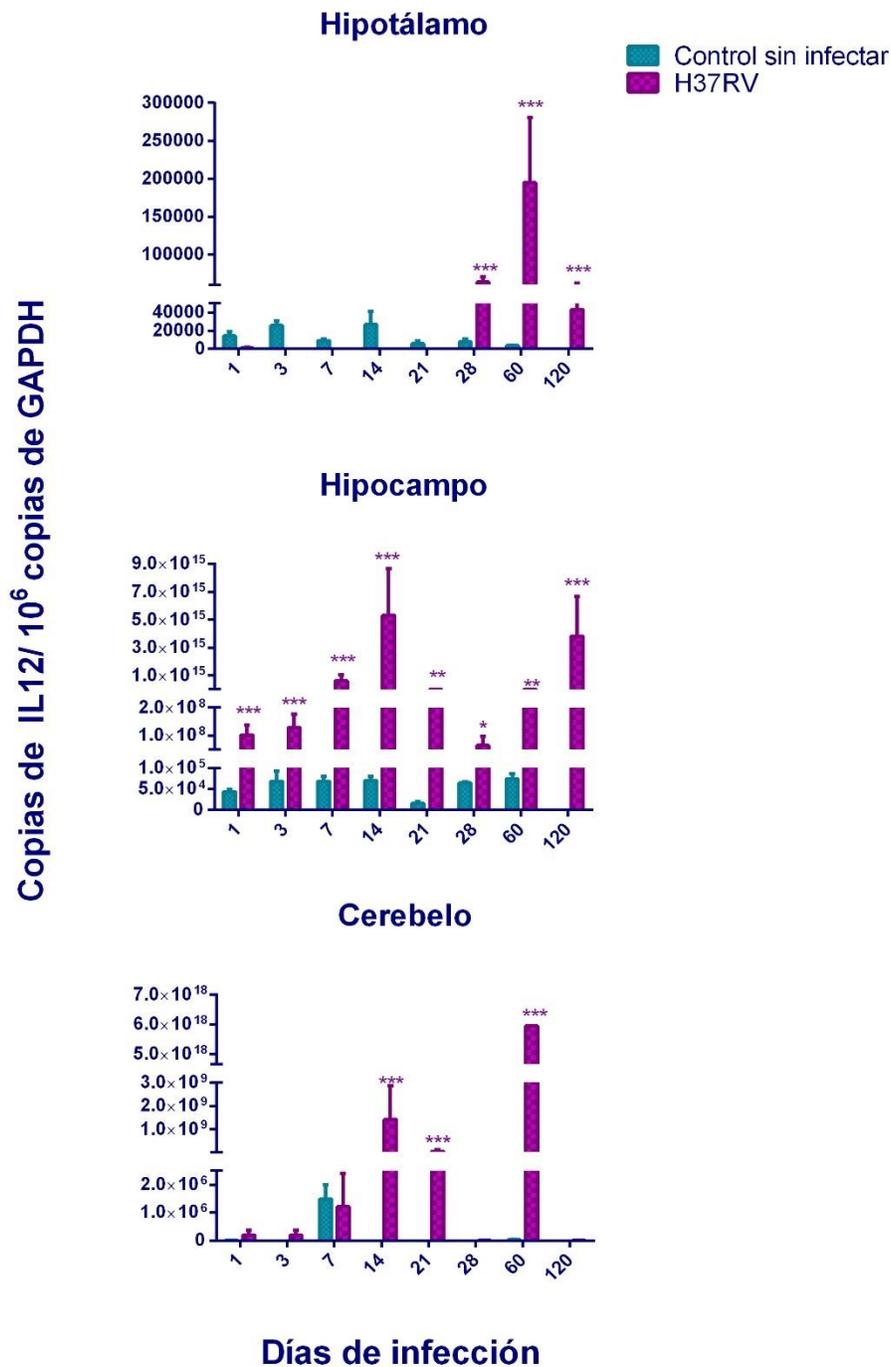
Al realizar el análisis de la respuesta inmune en el cerebelo, hipocampo e hipotálamo cuando se presenta TB pulmonar se observó que el  $TNF\alpha$  tiene un aumento significativo a partir del día 21 en el hipotálamo cuando comienza la fase progresiva de la enfermedad; mientras que en el hipocampo y el cerebelo desde el día uno pos infección se presenta una mayor expresión comparado con los animales control sin infección, la cual fue constante durante el progreso de la enfermedad utilizando la cepa H37RV (Figura 14). Un comportamiento similar se presentó para el caso de IL12, que en el hipotálamo aumentó su expresión en los animales infectados a partir de la fase progresiva de la enfermedad, mientras que en el hipocampo y el cerebelo vemos que la expresión de IL12 es mucho mayor en los animales infectados desde el día uno en comparación con el grupo control (Figura 15). En el caso del  $IFN\gamma$ , se observó una disminución en el hipotálamo cuando hay infección con *M. tuberculosis* H37RV en comparación con el grupo control, al contrario, a lo

que sucedió en el hipocampo y el cerebelo donde el grupo infectado presentó mayor expresión de esta citocina (Figura 16). Al analizar la expresión de la enzima iNOS se observó un comportamiento similar a lo que se encontró con  $TNF\alpha$  e IL12, donde en el hipotálamo aumentó su expresión a nivel de mensajero a partir del día 21 de infección, mientras que, en el hipocampo y cerebelo aumentó desde el primer día de infección, siendo mucho mayor que en los animales control (Figura 17). Similares resultados se observaron con la enzima IDO (Figura 18). En el caso de  $TGF\beta$  se encontró su expresión aumentada en las tres regiones estudiadas siendo mayor a partir del día 7 de infección (Figura 19), mientras que la IL4 en el hipotálamo aumentó de manera significativa a partir del día 21 después de la infección y en el hipocampo y cerebelo desde el día 1 post infección (Figura 20). Finalmente, la IL10 solamente se expresó en el cerebelo de los animales infectados desde el día 1 después de la infección en pequeñas cantidades, aumentando de manera significativa a partir del día 14 de infección (Figura 21).

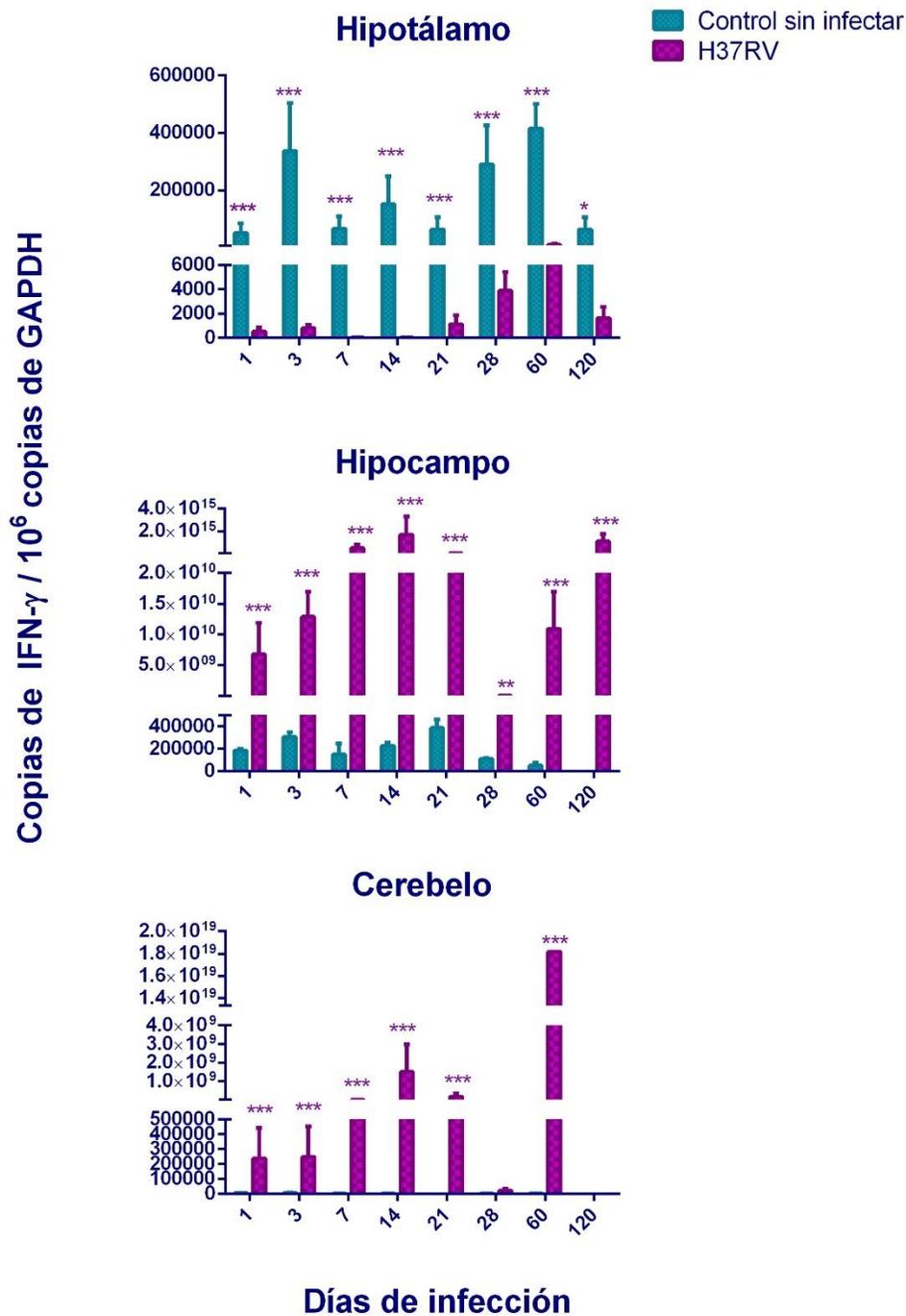
Por otro lado, se evaluó la expresión de IL-1 $\beta$ ; sin embargo, no se encontró expresión en ninguno de los grupos experimentales (sanos e infectados).



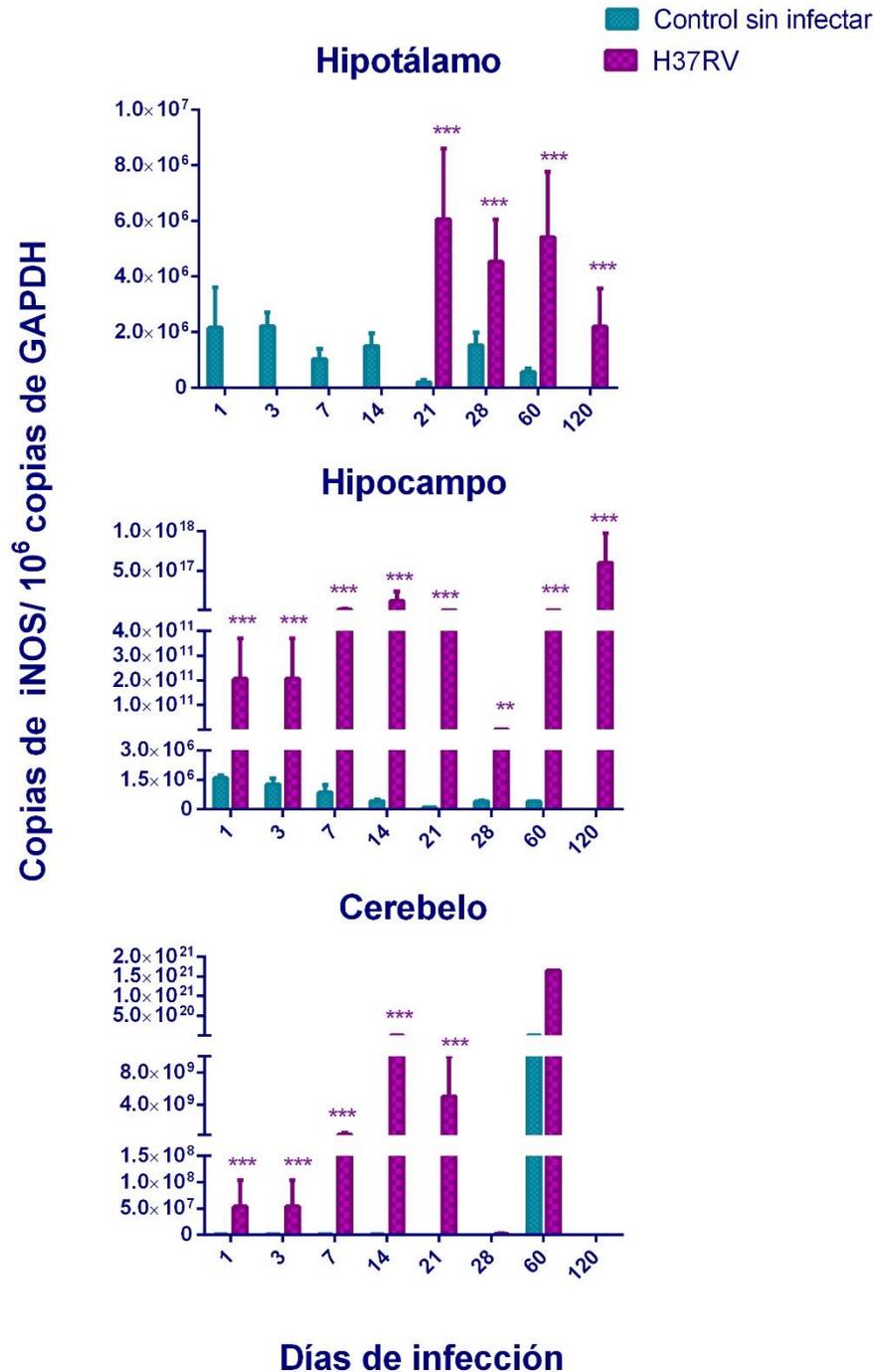
**Figura 14.** Expresión génica de TNF $\alpha$  por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



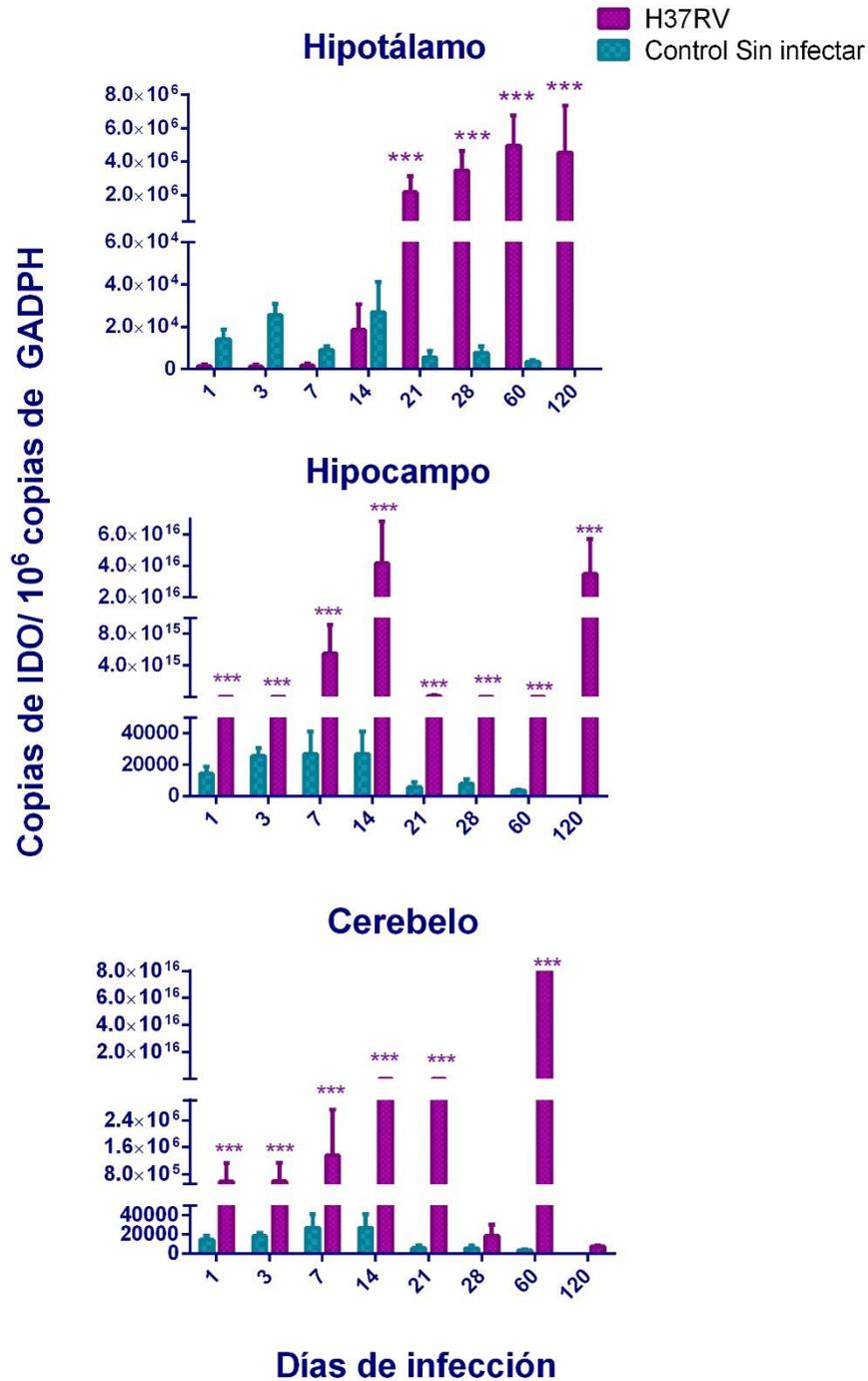
**Figura 15.** Expresión génica de IL12 por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



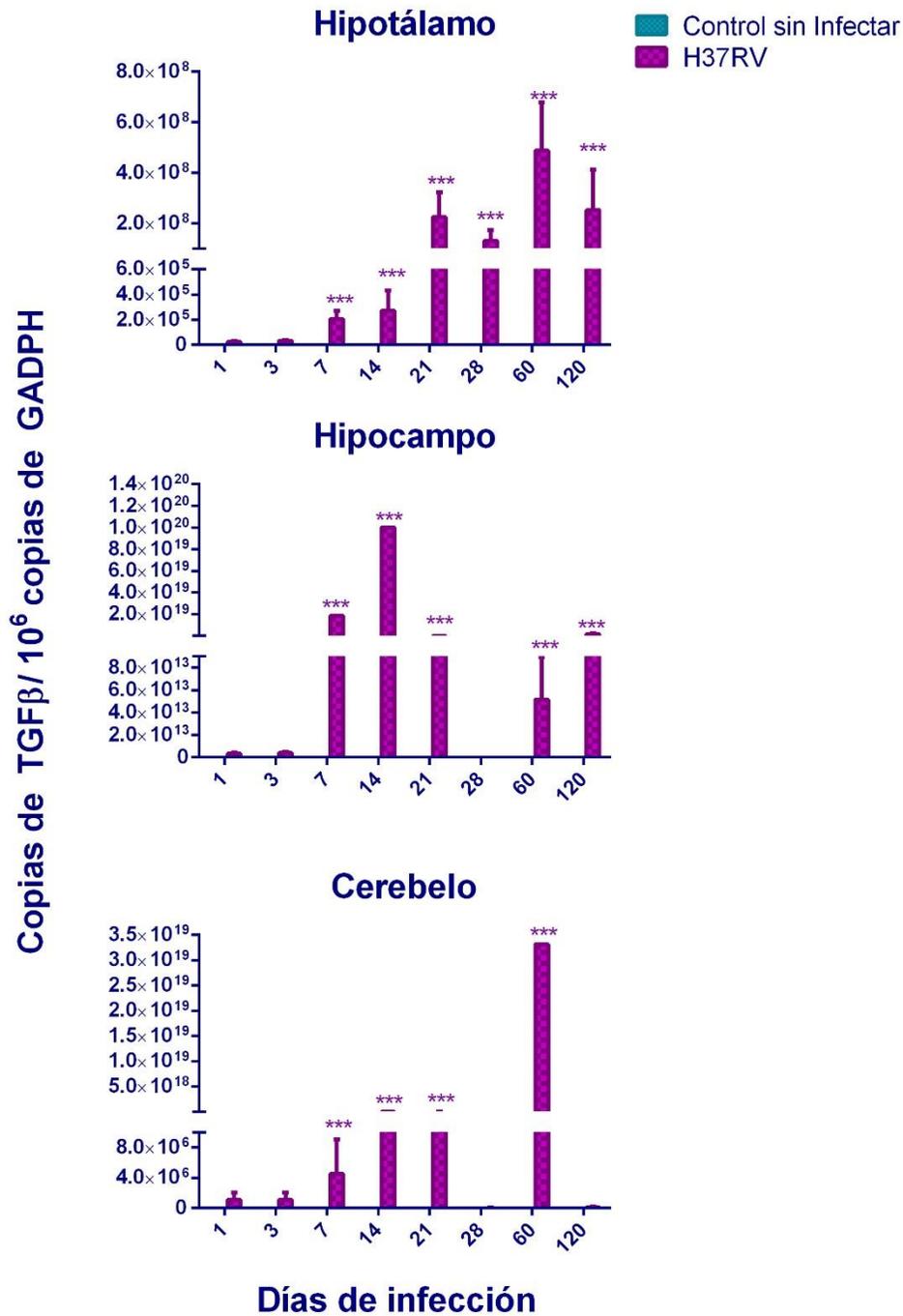
**Figura 16.** Expresión génica de IFN $\gamma$  por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



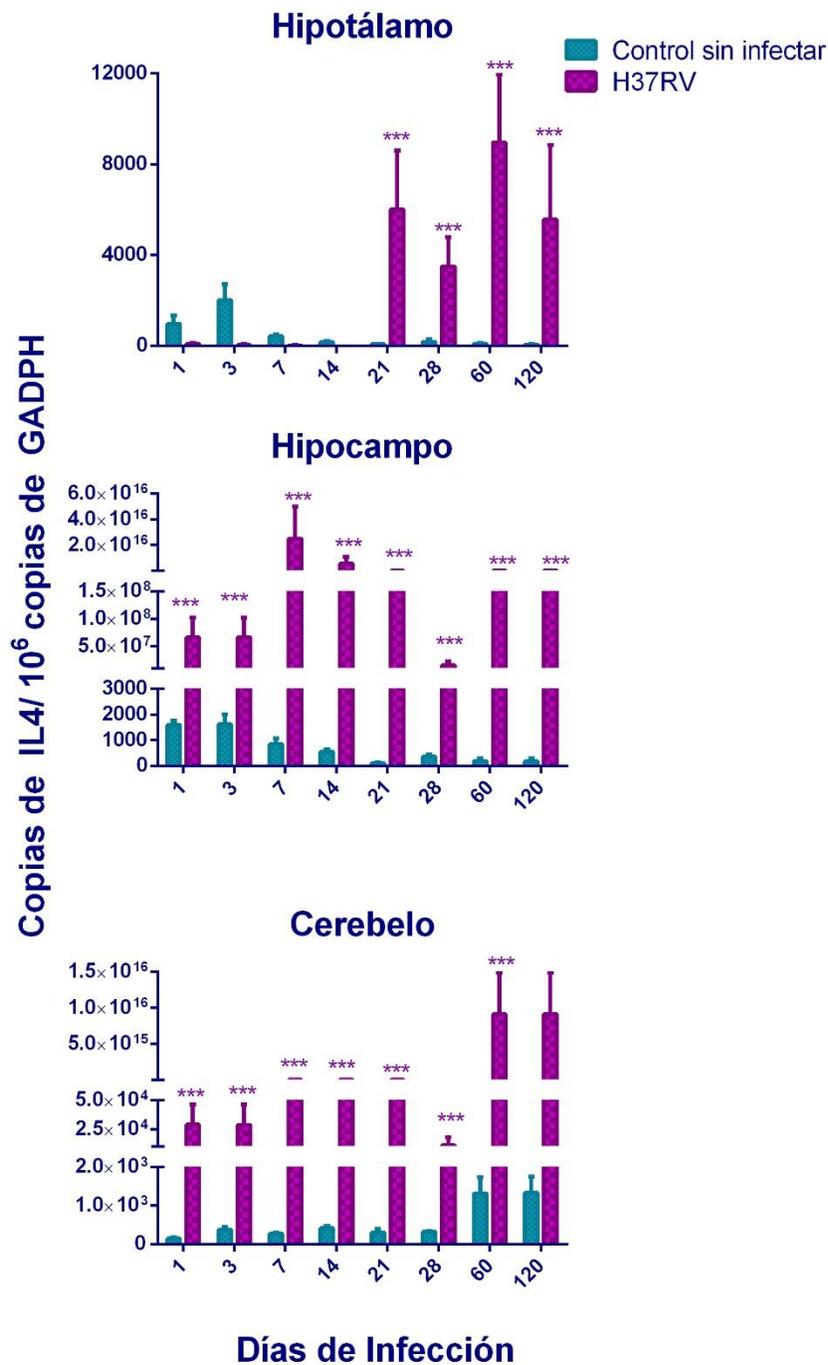
**Figura 17.** Expresión génica de iNOS por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



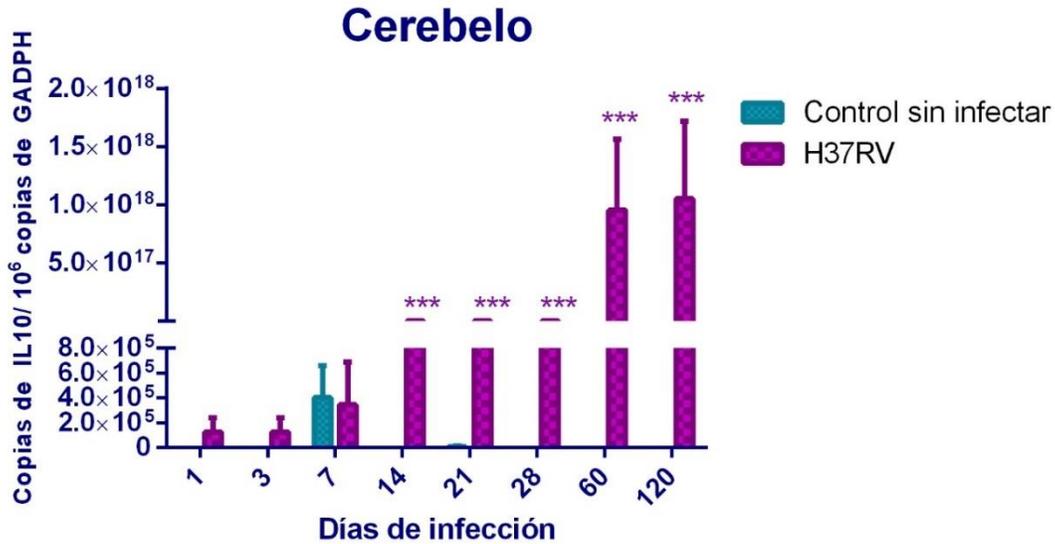
**Figura 18.** Expresión génica de IDO por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



**Figura 19.** Expresión génica de TGFβ por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



**Figura 20.** Expresión génica de IL4 por RT-PCR en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.



**Figura 21.** Expresión génica de IL10 por RT-PCR en cerebelo de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Los valores representan la media y la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001) en comparación al grupo control sin infectar.

#### 7.4 Cambios conductuales

##### Conducta de enfermedad

En el análisis del comportamiento, se presentaron cambios en la actividad locomotora, esta se redujo significativamente en los animales infectados con H37RV en comparación con los animales control (sanos). Este cambio fue más evidente de los días 1 al 28 de infección (Figura 22) recuperándose a los días 60 y 120 de la infección y es característico de la conducta de enfermedad (*sickness behavior*) lo que concuerda con los cambios en el peso corporal donde se observó una disminución significativa en los animales infectados en comparación con el grupo control sin infectar (Figura 23).

##### Comportamiento similar a la depresión

La prueba de suspensión de cola es un estudio representativo de la conducta similar a la depresión (*depressive like behavior*). En el presente estudio se observó que los animales infectados con la cepa prototipo H37RV mostraron un incremento significativo en el tiempo de inmovilidad a partir del día 7 al 60 de infección, siendo más evidente este cambio en el

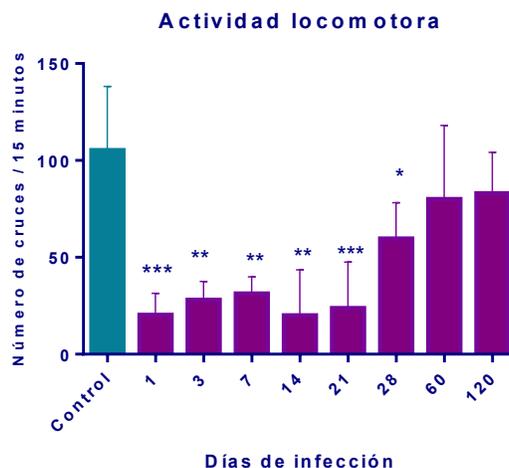
día 60 de infección (Figura 24). Esto sugiere que la infección pulmonar con H37RV induce conducta similar a la depresión a pesar de que hay ausencia de infección cerebral.

### Estado neurológico y ansiedad

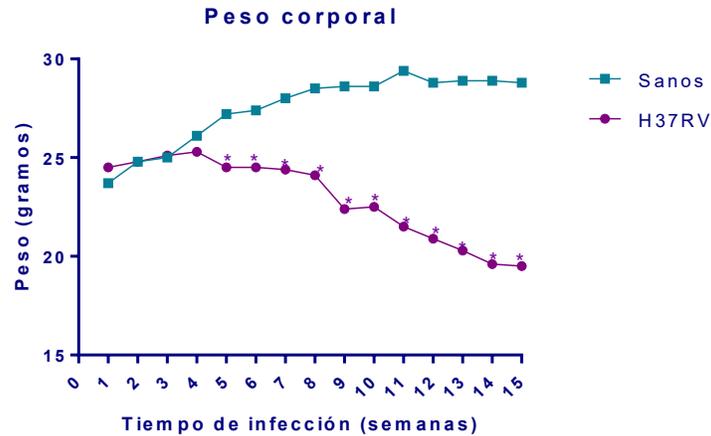
En el estudio para determinar el daño en los procesos neurológicos se encontró que los animales infectados con H37RV presentaron mayor daño neurológico que los animales sanos, este daño se observó de manera significativa a partir del día 3 de infección y se fue agravando conforme avanzó la enfermedad (Figura 25). Con el fin de estudiar la ansiedad inducida por la infección de *M. tuberculosis* se realizó la prueba de SAP, encontrándose resultados similares a los observados en el déficit neurológico (Figura 26).

### Memoria y aprendizaje

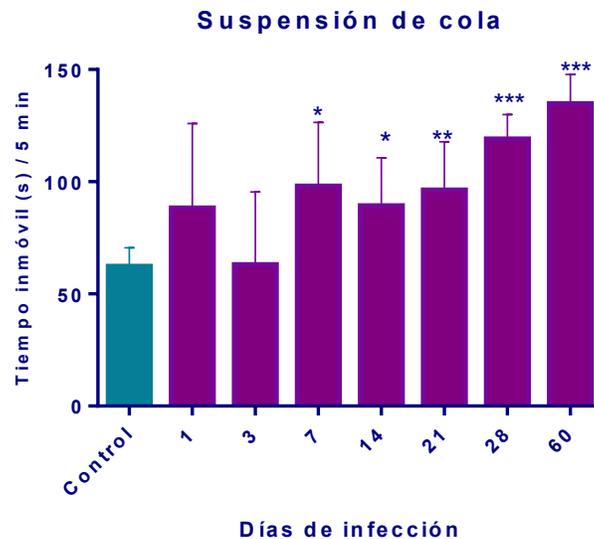
En la prueba para evaluar el efecto de la infección con *M. tuberculosis* sobre los mecanismos de memoria y aprendizaje se encontró que la enfermedad afecta de manera significativa tanto la memoria a corto plazo (Figura 27A) como la memoria a largo plazo (Figura 27B), ya que en ambas secciones de la prueba los animales infectados no mostraron diferencias entre los objetos presentados a diferencia del grupo control donde los animales interaccionaron en mayor medida con el objeto novedoso en comparación al objeto ya reconocido con anterioridad .



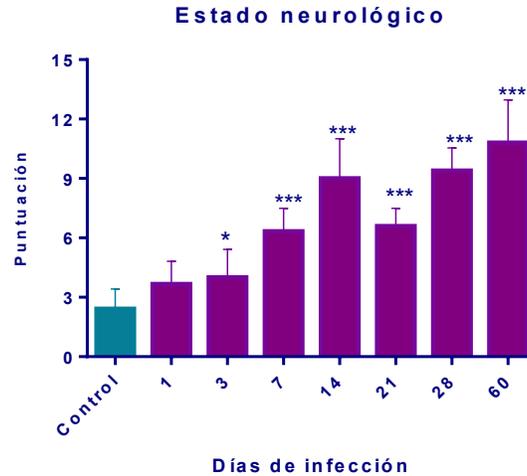
**Figura 22.** Actividad locomotora durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control. Se presentan las medias del número de cruces con la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) en comparación al grupo control sin infectar.



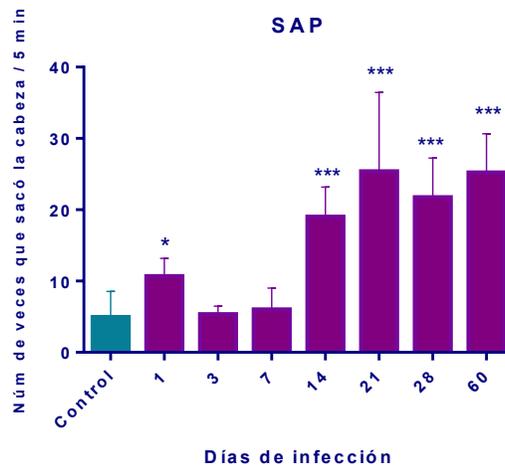
**Figura 23.** Peso corporal durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control. Se presentan las medias de los pesos (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa \* $p < 0.001$ ) en comparación al grupo control sin infectar.



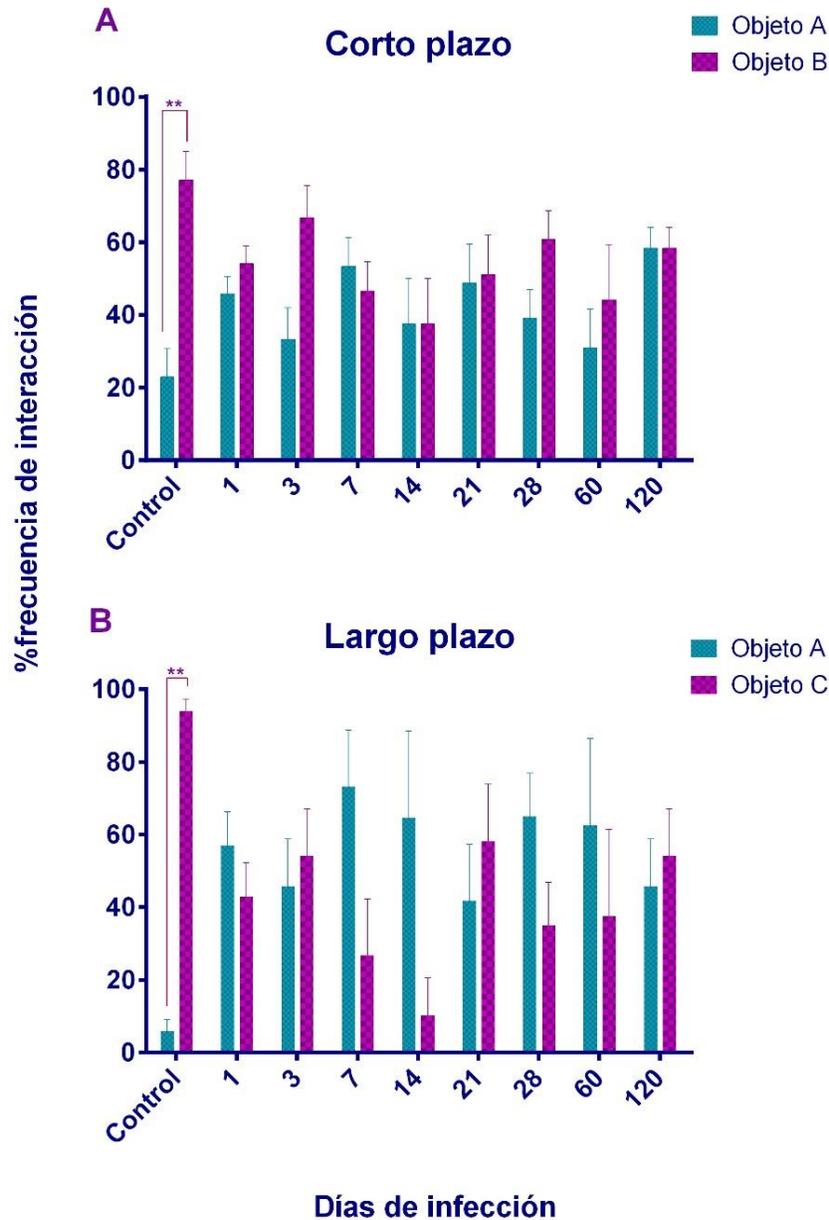
**Figura 24.** Tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de cola durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control. Se presentan las medias del tiempo inmóvil (s) con la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) en comparación al grupo control sin infectar.



**Figura 25.** Puntuación obtenida en la prueba para evaluar el estado neurológico durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control. Se presentan las medias de la puntuación obtenida con la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) en comparación al grupo control sin infectar. Se consideró normal cuando los animales obtuvieron una puntuación entre 3-5.



**Figura 26.** Prueba de SAP para evaluar conducta de ansiedad durante la infección con H37RV en comparación con el grupo control. Se presentan las medias de la puntuación obtenida con la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) en comparación al grupo control sin infectar. Se consideró normal cuando los animales obtuvieron una puntuación entre 3-5.



**Figura 27.** Prueba de reconocimiento de objetos para evaluar la memoria a corto plazo (A) y largo plazo (B), durante la infección con H37RV. Se presentan las medias de los porcentajes de la frecuencia de interacción obtenidos con la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) entre la frecuencia de interacción entre el objeto A con el objeto B y entre el objeto A con el C. Cuando se presentó diferencia entre la interacción de ambos objetos se consideró como una memoria en buen estado, mientras que cuando no se presentó diferencia se consideró como daño en la memoria.

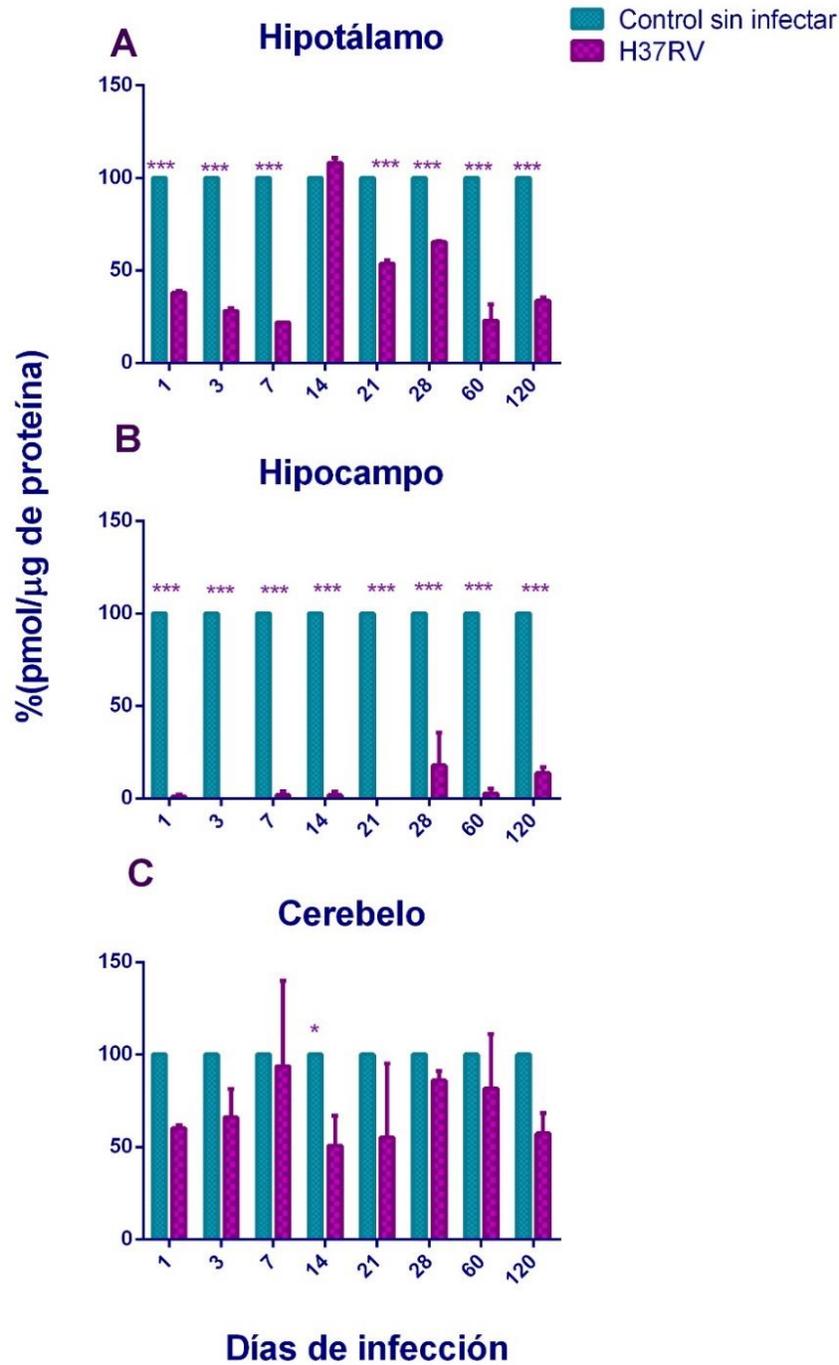
## 7.5 Cambios neuroquímicos

Al cuantificar los neurotransmisores se encontró que la norepinefrina disminuyó de los días 1 al 7 post infección en el hipotálamo de los animales regresando a niveles basales en el día 14 de infección, y disminuyendo significativamente en la etapa progresiva de la enfermedad (Figura 28A). En el hipocampo esta catecolamina se encontró completamente disminuida en comparación al grupo control (Figura 28B). En cerebelo se presentó una tendencia a disminuir de manera importante en la etapa temprana de la enfermedad, sin embargo, a partir del día 28 post infección comienza aumentar nuevamente (Figura 28C).

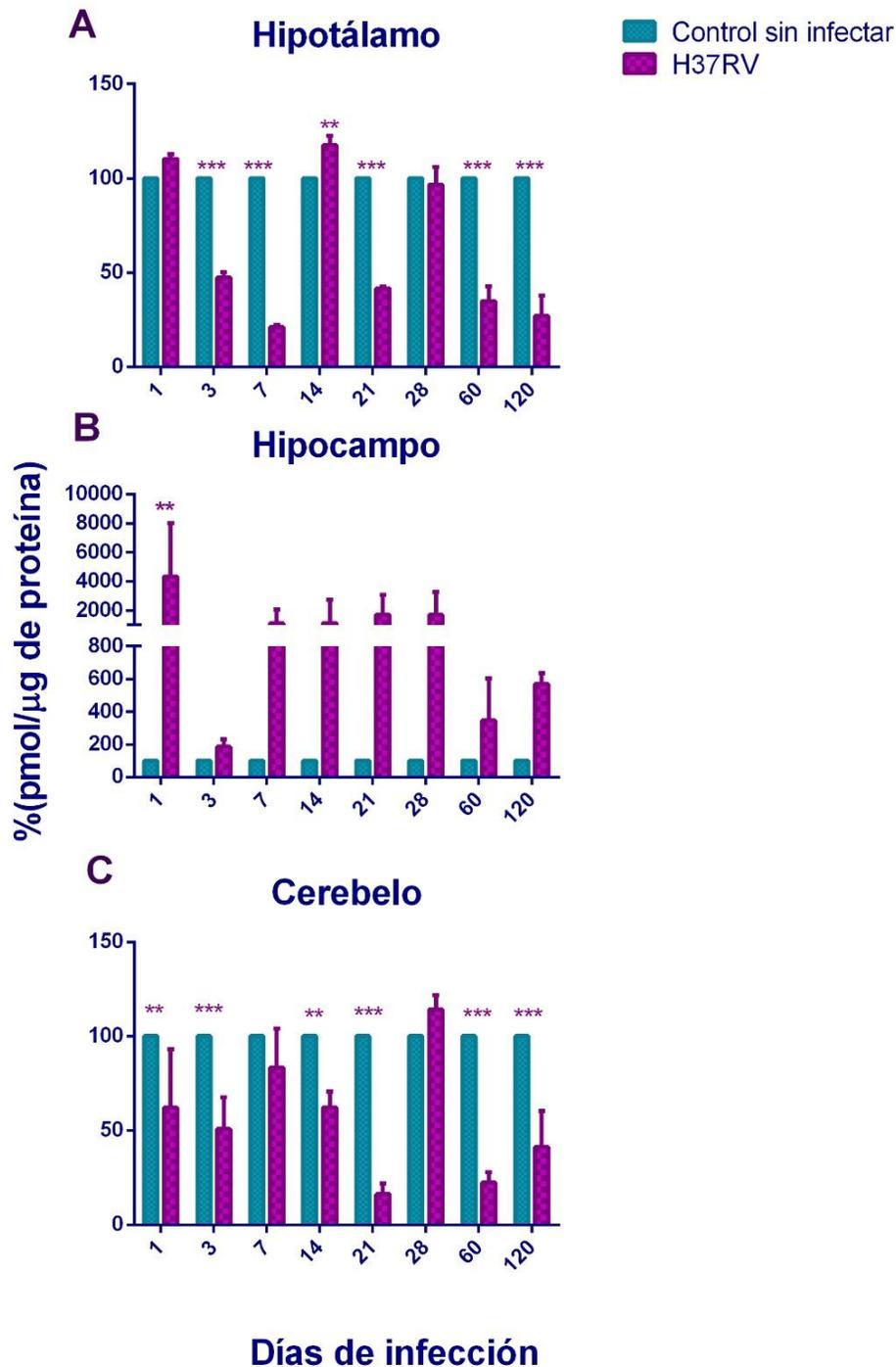
La epinefrina en el hipotálamo mostró una disminución significativa en los días 3,7, 21, 28, 60 y 120 de infección con un pico de expresión el día 14 (Figura 29A). En el hipocampo la epinefrina presentó una tendencia a aumentar todos los días de infección, sin embargo, solamente el día 1 post infección este aumento fue significativo (Figura 29B). En cerebelo la epinefrina disminuyó significativamente los días 1, 3, 14, 21, 60 y 120 en los animales infectados y regresó a los valores basales los días 7 y 28 de infección (Figura 29C).

En el caso de la dopamina, se observó una significativa disminución en la cantidad de este neurotransmisor en el hipotálamo de los animales infectados en comparación con los animales control (Figura 30A). En hipocampo la dopamina presentó una tendencia a disminuir los días 1, 3, 7, 14 y 60 regresando a niveles basales los días 21 y 28 y aumentando significativamente el día 120 post infección (Figura 30B). En el cerebelo la dopamina disminuyó significativamente todos los días de la cinética de infección excepto a los 120 días donde los niveles se observaron normales (Figura 30C).

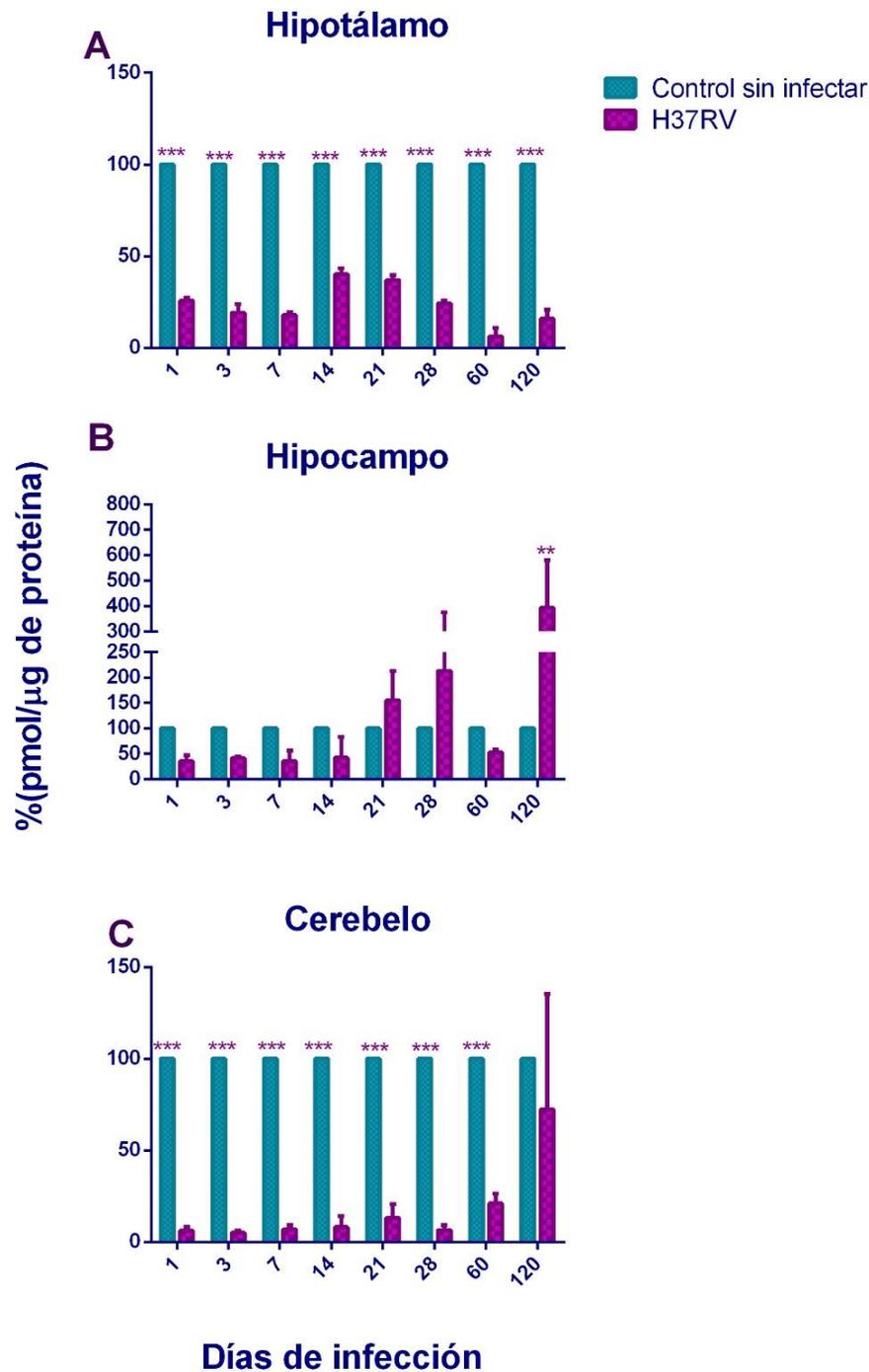
En la serotonina hubo una significativa disminución en el hipotálamo de los animales infectados los días 1,3, 7, 14, 60 y 120 con un aumento en los días 21 y 28 (Figura 31A). En el hipocampo la serotonina disminuyó significativamente los días 1, 3, 7 y 14 y regresó a niveles basales en los días 21, 28, 60 y 120 (Figura 31B). En cerebelo la serotonina solamente disminuyó significativamente los días 1, 3 y 7 de infección regresando a niveles basales el resto de la cinética de infección (Figura 31C).



**Figura 28.** Concentración de norepinefrina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Se presenta la media del porcentaje en comparación con el grupo control con la desviación estándar (n=4). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) entre el grupo infectado con el control.

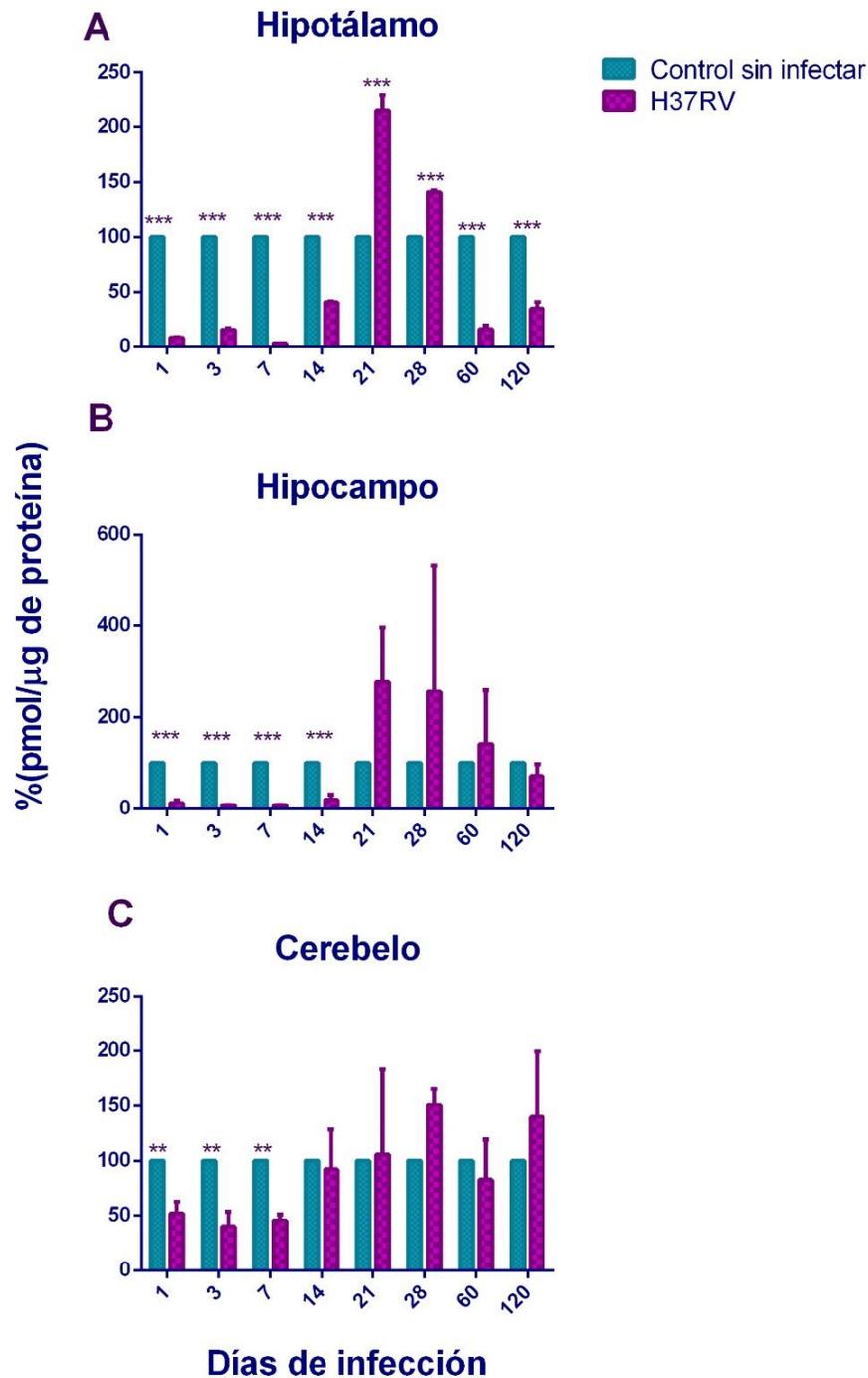


**Figura 29.** Concentración de epinefrina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Se presenta la media del porcentaje en comparación con el grupo control con la desviación estándar (n=4). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) entre el grupo infectado con el control.



**Figura 30.** Concentración de dopamina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Se presenta la media del porcentaje en comparación con el grupo control con la desviación estándar (n=4). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) entre el grupo infectado con el control.

Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva



**Figura 31.** Concentración de serotonina en hipotálamo (A), hipocampo (B) y cerebelo (C) de animales infectados con H37RV y del grupo control sin infectar. Se presenta la media del porcentaje en comparación con el grupo control con la desviación estándar (n=4). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) entre el grupo infectado con el control.

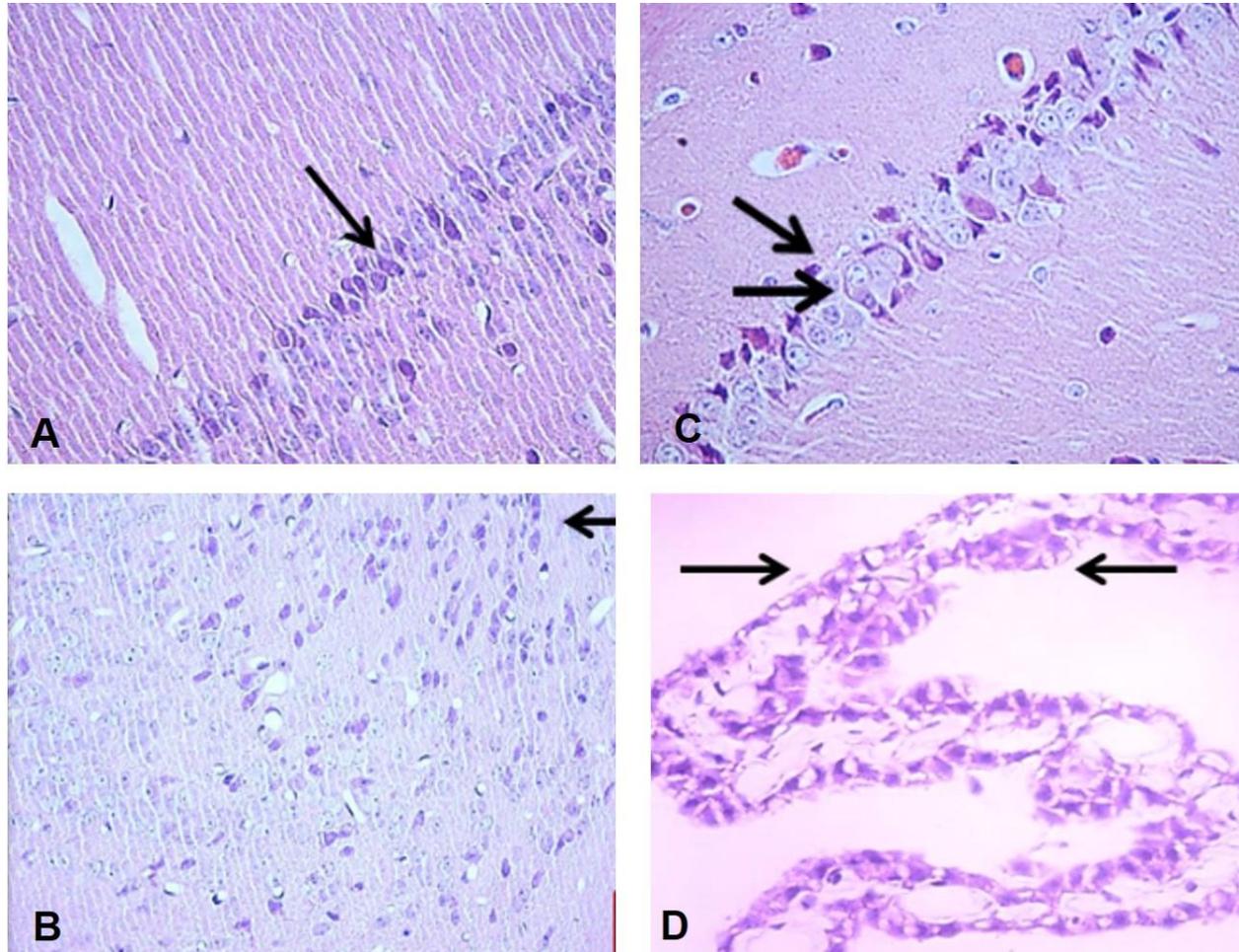
Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva

## 7.6 Cambios morfológicos en el cerebro

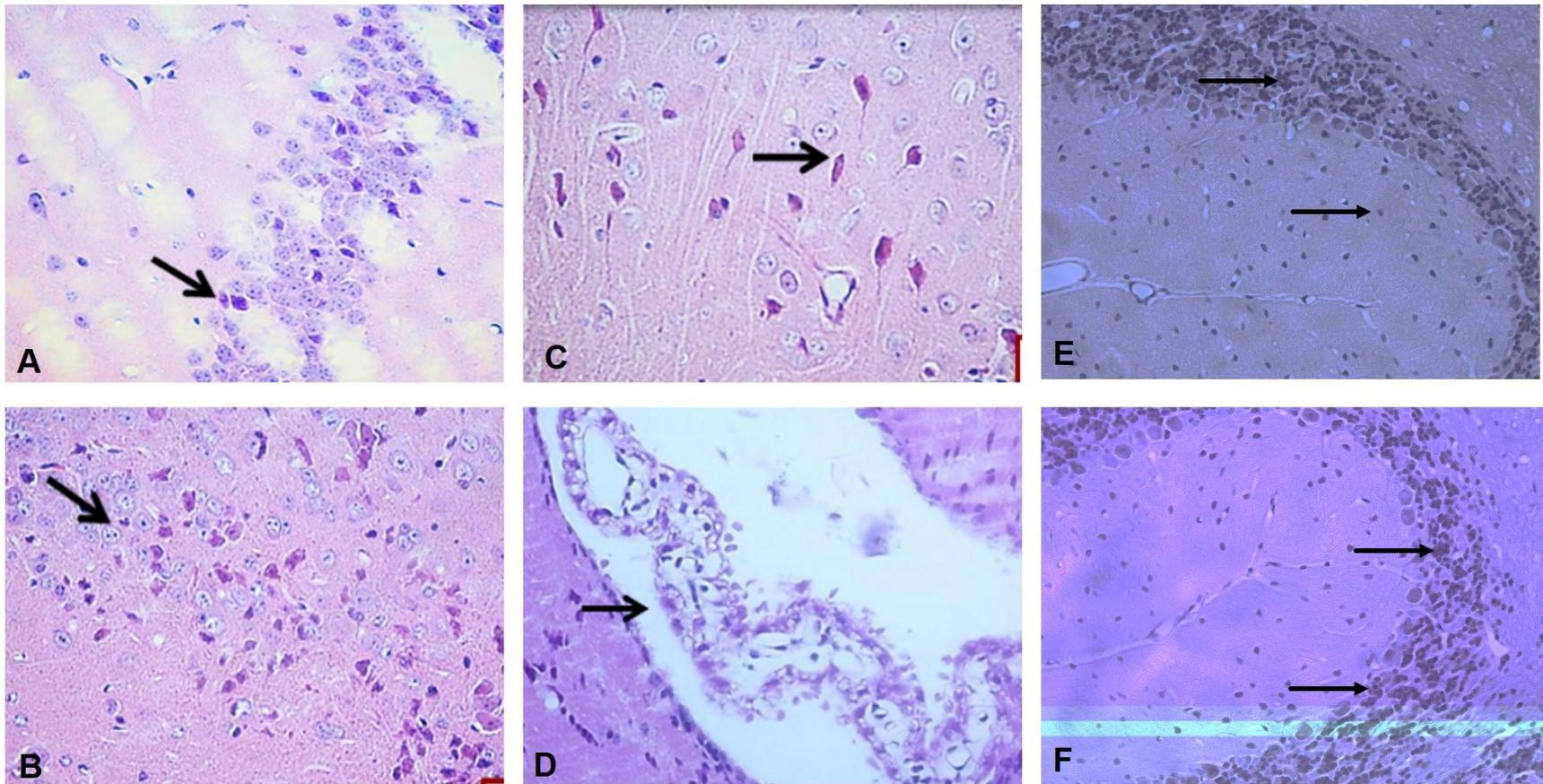
Al caracterizar los cambios morfológicos y funcionales en el SNC durante la TB pulmonar experimental y en ausencia de infección cerebral, se observaron anomalías en la histología del cerebro infectado con la cepa de laboratorio H37RV a nivel de corteza cerebral, hipocampo y plexos coroideos.

Los cambios histológicos más importantes fueron muerte neuronal en el hipocampo, el hipotálamo, la corteza frontal, así como en las células epiteliales de los plexos coroideos. Específicamente, neuronas de las áreas C1 y C3 del hipocampo y de los núcleos paraventriculares del hipotálamo mostraron desde el día 3 post-infección núcleos picnóticos y citoplasma intensamente acidofilo indicativos de muerte neuronal, los cuales fueron progresivos y claramente observados en un número importante de neuronas. En el cerebelo se presentó muerte en las células de Purkinje en los días 60 y 120 de infección. En las Figuras 32 y 33 se muestran imágenes representativas de los cambios observados en el día 3 y 60 de infección respectivamente.

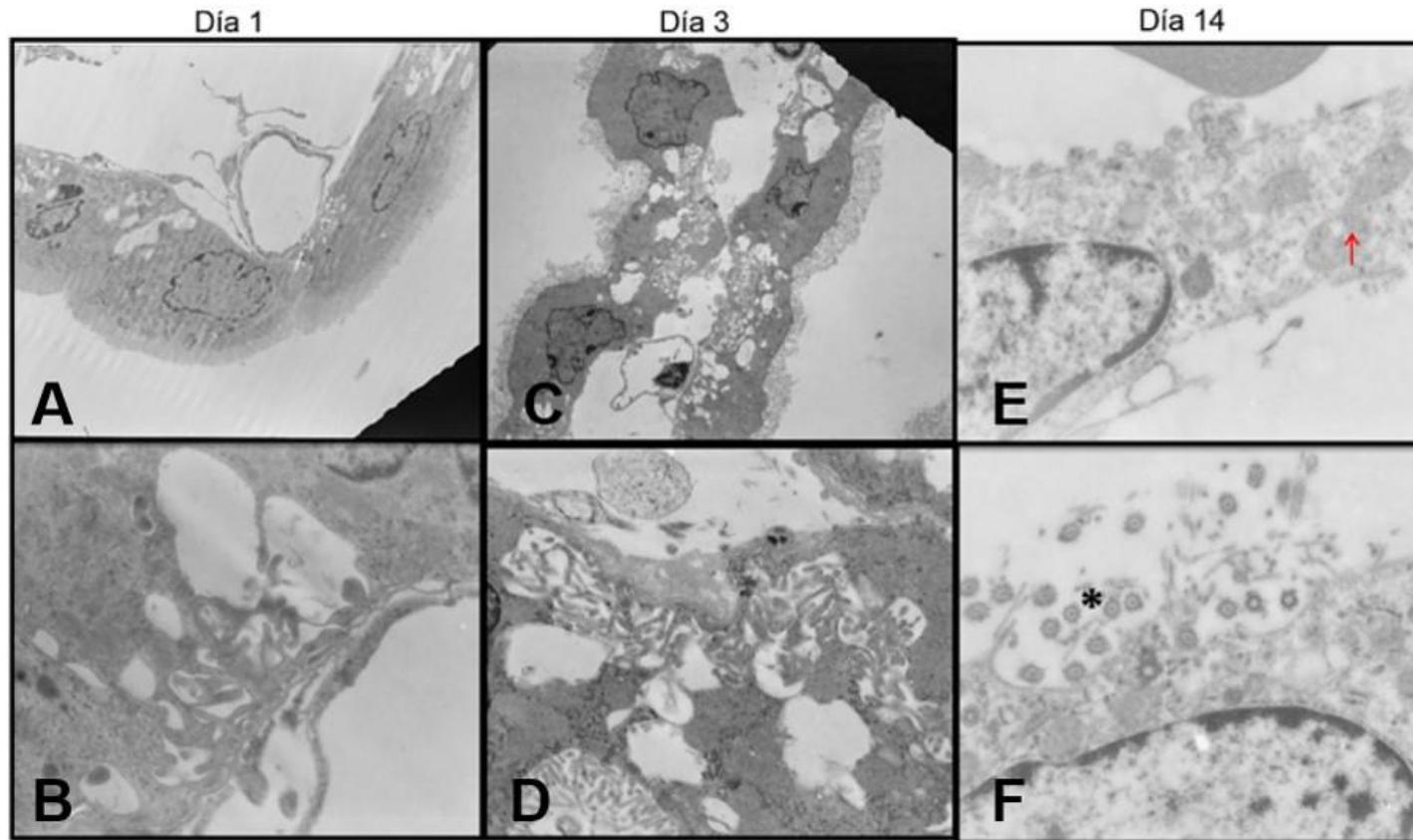
En relación con las células epiteliales de los plexos coroideos, estas mostraron vacuolación citoplasmica desde el día 7 post-infección, la cual fue progresiva y en el día 21 numerosas células con estas anomalías mostraron núcleos picnóticos y desprendimiento de la membrana basal, los cuales fueron más evidentes en el estudio ultraestructural por microscopía electrónica (Figuras 34 y 35).



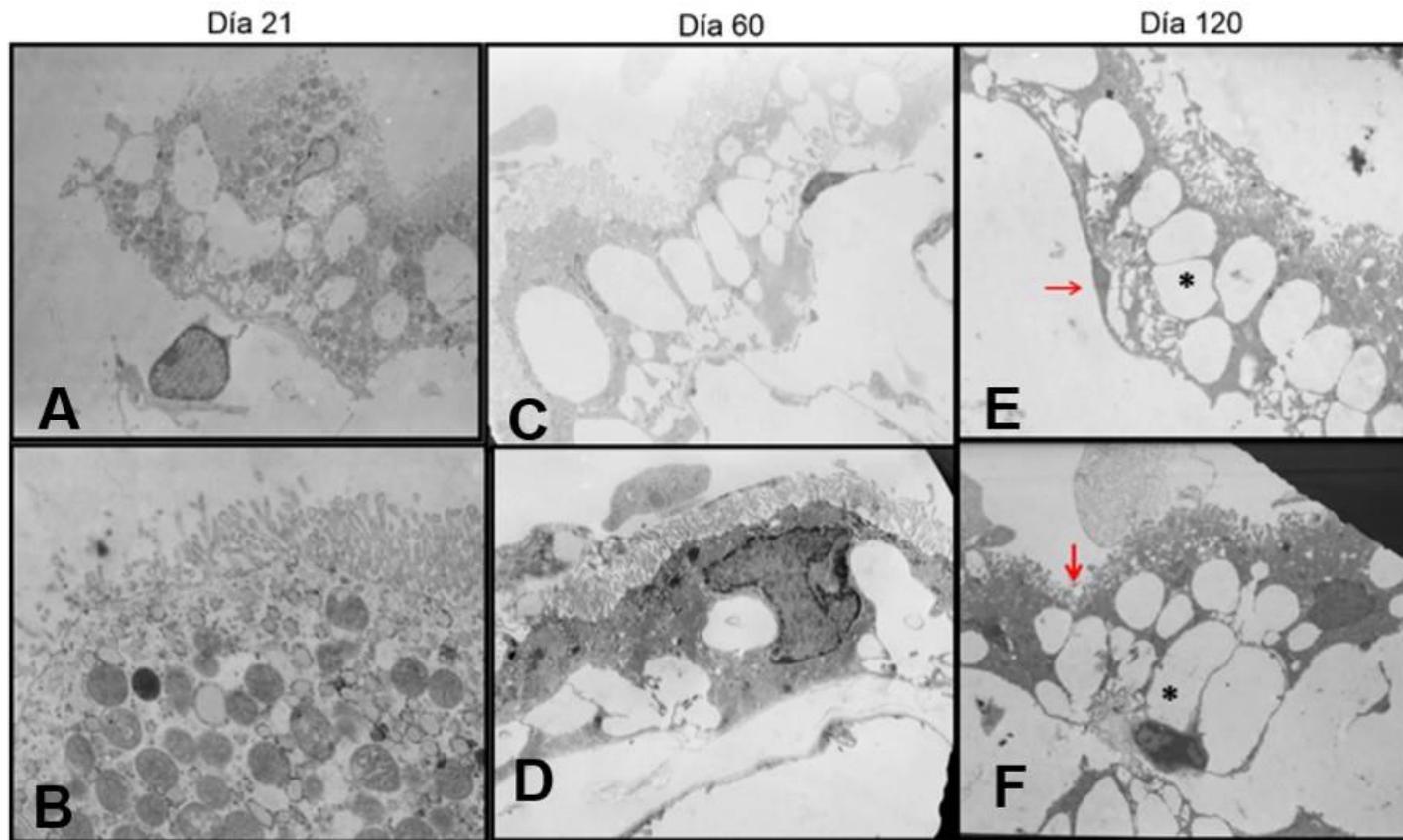
**Figura 32.** Histología del cerebro al día 3 de infección con la cepa H37RV. A) Hipocampo, B) Hipotálamo, C) Corteza frontal, d) Plexos Coroideos. Hematoxilina y Eosina. 40x. Las flechas señalan núcleos picnóticos y citoplasma acidófilo indicativos de muerte celular.



**Figura 33.** Histología del cerebro al día 60 de infección con la cepa H37RV. A) Hipocampo, B) Hipotálamo, C) Corteza frontal, D) Plexos Coroideos, E-F)Cerebelo. Hematoxilina y Eosina. 40x. Las flechas señalan núcleos picnóticos y citoplasma acidófilo indicativos de muerte celular.



**Figura 34.** Imágenes de los plexos coroideos estudiadas mediante microscopía electrónica durante TB pulmonar progresiva utilizando la cepa prototipo H37RV días 7,14 y 21. A-B) Día 7 de infección. C-D) Día 14. E-F) Día 21. Las flechas señalan el daño en las vellosidades del epitelio y los asteriscos la formación de vacuolas.



**Figura 35.** Imágenes de los plexos coroideos estudiadas mediante microscopía electrónica durante TB pulmonar progresiva utilizando la cepa prototipo H37RV días 28, 60 y 120. A-B) Día 28 de infección. C-D) Día 60. E-F) Día 120. Las flechas señalan el daño en las vellosidades del epitelio y los asteriscos la formación de vacuolas.

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo.

**Cuadro 6.** Resumen de los resultados obtenidos.

<b>CAMBIOS INMUNOLÓGICOS</b>								
<b>Región</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL12</b>	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>iNOS</b>	<b>IDO</b>	<b>TGF<math>\beta</math></b>	<b>IL4</b>	<b>IL10</b>
<b>Hipotálamo</b>	Aumentó a partir del día 21 de infección	Aumentó a partir del día 21 de infección	Disminuyó todos los días de infección	Aumentó a partir del día 21 de infección	Aumentó a partir del día 21 de infección	Aumentó a partir del día 7 de infección	Aumentó a partir del día 7 de infección	No se expresó
<b>Hipocampo</b>	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó a partir del día 7 de infección	Aumentó a partir del día 7 de infección	No se expresó
<b>Cerebelo</b>	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó desde el día 1 post infección	Aumentó a partir del día 7 de infección	Aumentó a partir del día 7 de infección	Aumentó significativamente a partir del día 14 post infección
<b>CAMBIOS NEUROQUÍMICOS</b>								
<b>Región</b>	<b>Norepinefrina</b>		<b>Epinefrina</b>		<b>Dopamina</b>		<b>Serotonina</b>	
<b>Hipotálamo</b>	Disminuyó los días 1,3,7,21,28, 60 y 120. Regresó a niveles basales el día 14		Disminuyó los días 3,7,21, 28, 60 y 120 de infección. Hay un aumento el día 14 de infección		Disminuyó significativamente todos los días de infección		Disminuyó significativamente los días 1,3,7,14,60 y 120. Aumentó significativamente los días 21 y 28.	
<b>Hipocampo</b>	Disminuyó todos los días de infección		Hay una tendencia a aumentar, aunque solo fue significativa el día 1 post infección		Hay una tendencia a disminuir los días 1,3,7,14 y 60. Regresó a niveles basales los días 21 y 28 y aumentó el día 120.		Hay una tendencia a disminuir los días 1,3,7,14 y 60. Regresó a niveles basales los días 21 y 28 y aumentó el día 120.	
<b>Cerebelo</b>	Se presentó una tendencia a disminuir todos los días de infección		Disminuyó significativamente los días 1,3,14,21,60 y 120. Regresó a niveles basales los días 7 y 28.		Disminuyó significativamente todos los días de infección, solo en el día 120 se presentó un aumento.		Disminuyó significativamente todos los días de infección, solamente aumentó el día 120.	
<b>CAMBIOS MORFOLÓGICOS</b>								
<b>Hipotálamo</b>	Muerte neuronal en el núcleo paraventricular							
<b>Hipocampo</b>	Muerte neuronal en el área C3							
<b>Cerebelo</b>	Muerte en las células de Purkinje							

Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva

## 8) DISCUSIÓN

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa importante que afecta principalmente a los pulmones y produce profundas alteraciones en el sistema inmunológico. Esta patología cursa con inflamación crónica y existen evidencias de que diversas patologías que cursan con inflamación crónica periférica como artritis, diabetes mellitus, obesidad o lupus eritromatoso afectan el sistema nervioso. Estas alteraciones se asocian a cambios en el comportamiento, como daño cognitivo o alteraciones en el aprendizaje y la memoria y la presencia de depresión. Debido a lo anterior proponemos que dichas alteraciones a nivel del SNC se podrían presentar durante la infección con *M. tuberculosis* en ausencia de infección cerebral causado principalmente por la alta inflamación periférica, secundaria a la infección con esta micobacteria. Para comprobar dicha hipótesis, en el presente trabajo se evaluó la presencia de citocinas, así como las anomalías morfológicas y conductuales en el SNC en un modelo murino de TB pulmonar progresiva sin infección cerebral utilizando la cepa prototipo H37RV.

### Cambios inmunológicos

Los animales infectados con la micobacteria no mostraron carga bacteriana en el cerebro, mientras que en el pulmón el crecimiento bacteriano fue directamente proporcional al avance de la enfermedad. El hecho de que no se haya presentado crecimiento en el cerebro es muy importante, ya que establece que la infección solo se dio a nivel sistémico. Se ha observado que distintas cepas de *M. tuberculosis* aisladas de líquido cefalorraquídeo de pacientes con TB meníngea tienen la capacidad de infectar el cerebro en el modelo murino de TB pulmonar, mientras que la cepa prototipo H37RV y diversas cepas aisladas de TB pulmonar presentan una muy limitada capacidad para infectar el cerebro (Hernández *et al.*, 2010), lo cual coincide con nuestros resultados, ya no se encontró crecimiento bacteriano en el cerebro.

A pesar de que no se presentó el crecimiento micobacteriano en el cerebro, se observaron varios cambios inmunológicos en el hipotálamo, el hipocampo y el cerebelo. Un aumento de  $TNF\alpha$  en el hipotálamo a partir del día 21 post infección, mientras que en el hipocampo y el cerebelo esto ocurrió desde el día 1 post infección. Por su parte  $IFN\gamma$  disminuyó en el hipotálamo comparado con el grupo control sin infectar; sin embargo, en el hipocampo y en el cerebelo hubo un aumento significativo en comparación al grupo control desde el día 1 post infección. Se ha observado que el aumento de citocinas proinflamatorias,

principalmente  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  afecta la proliferación, aumenta la muerte por apoptosis, el destino del linaje y la migración de células precursoras neurales de la zona subventricular en respuesta a una lesión aguda, es decir dañan la neurogenesis (Ben-Hur *et al.*, 2003). Quizá el aumento de citocinas proinflamatorias a nivel sistémico durante la infección con TB aumenta el estado reactivo de las células microgliales (Dilger y Johnson, 2008) provocando la producción de citocinas proinflamatorias en el SNC que podrían estar induciendo los cambios ya mencionados. En otro estudio realizado en el modelo murino de TB pulmonar, se observó un aumento en la expresión génica de  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  en el cerebro completo de ratones crónicamente infectados con la cepa H37RV (Hernández *et al.*, 2010).

Por otro lado, la disminución de  $IFN\gamma$  en el área de los plexos coroideos se ha asociado a daño cognitivo ya que hay un aumento de IL4 que causa que se produzca la quimiocina CCL11, el incremento de esta quimiocina bloquea la producción de IL4 mediante regulación negativa en el área de las meninges y en las zonas subgranular y subventricular del hipocampo causando el establecimiento de un estado proinflamatorio que resulta dañino para la cognición y la neurogenesis, proceso conocido como inmunosenescencia (Baruch y Schwartz, 2013; Baruch *et al.*, 2013). El hecho de que en el hipotálamo se produzca mucho menos cantidad de  $IFN\gamma$  podría también estar originando un daño a nivel cognitivo, principalmente al aumentar la producción de citocinas proinflamatorias en otras regiones del SNC como el hipocampo.

Por otro lado, se ha reportado que el  $IFN\gamma$  participa en la respuesta antioxidante ante estrés inducido por glutamato, principalmente al aumentar la producción de tioles como el glutatión (Garg *et al.*, 2009). De esta manera la disminución que se presentó en la expresión de  $IFN\gamma$  en hipotálamo quizá induce muerte neuronal mediada por glutamato, sin embargo, hace falta realizar más estudios para comprobar estos resultados.

La producción sostenida de  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  se ha relacionado con el aumento de la actividad de IDO, que degrada el triptófano a través de la vía metabólica kinurenina/ácido quinolínico lo que resulta en la disminución del triptófano disponible y un aumento de kinurenina (Dantzer, 2009). Esta disminución de triptófano lleva a un decremento de la neurotransmisión serotoninérgica que genera depresión, ya que bajo condiciones de inflamación crónica aumenta la expresión del receptor de serotonina SERT, el cual media el ingreso de serotonina, la elevación prolongada de citocinas proinflamatorias modifica la serotonina extracelular por lo que disminuye la serotonina total del cerebro (Malynn *et al.*, 2013). En el

presente trabajo se evaluó la expresión de IDO, encontrándose un aumento significativo a partir del día 21 post infección en el hipotálamo y desde el día 1 post infección en el hipocampo y cerebelo, esto coincide con el aumento de  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , por lo que el aumento de estas dos citocinas podría ser la causa del incremento de IDO provocando un estado similar a la depresión en los ratones infectados.

También se evaluó la expresión de IL12 en el modelo de TB pulmonar, donde se observó un aumento de ésta citocina a partir del día 28 post infección en el hipotálamo de los animales infectados, es decir una vez que se establece la etapa progresiva de la enfermedad, sin embargo, en el hipocampo y el cerebelo el aumento de IL12 se dio desde 1 día después de que fueron infectados los animales. El aumento de ésta citocina en el Sistema Nervioso se ha relacionado de manera directa con la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En un trabajo realizado en un modelo de infección con *Plasmodium chabaudi* se observó que la inducción de IL12 e  $IFN\gamma$  aumenta la susceptibilidad de la letalidad inducida por LPS (Franklin *et al.*, 2009). En otro estudio, en un modelo de malaria cerebral, se encontró un efecto perjudicial de IL12 e  $IFN\gamma$  sobre la barrera hematoencefálica, ya que aumenta la permeabilidad de esta estructura, puesto que aumenta la extravasación del colorante azul de Evans al cerebro cuando hay infección con el *Plasmodium berghei*, por lo que aumenta la mortalidad, la cual se revierte cuando se utilizan animales deficientes en IL12 e  $IFN\gamma$ , y aumenta al introducir en los animales infectados un adenovirus recombinante que sobreexpresa IL12 (Schmidt *et al.*, 2011). Una de las principales funciones de la IL12 es la inducción de la producción de  $IFN\gamma$  y representa un fuerte mecanismo efector al activar la inmunidad innata antimicrobiana, por siguiente está relacionado con la inducción de la respuesta Th1. En el caso de la TB, este tipo de respuesta es benéfica de manera sistémica debido a que participa en el control de la micobacteria por el huésped, sin embargo, parece ser que la alta respuesta inflamatoria en el Sistema Nervioso tiene un papel perjudicial en este sistema, y en el caso de la respuesta a través del aumento de IL12 podría estar provocando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los animales infectados con *M. tuberculosis*. La manera en la que IL12 es capaz de inducir el rompimiento de la barrera hematoencefálica se ha asociado con el aumento de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS). En un modelo animal de encefalitis viral se evaluó la capacidad de la IL12 de provocar la ruptura de la barrera hematoencefálica en conjunto con la NOS, principalmente la iNOS, que produce ON en las células que conforman a la barrera, ya que inhibe los componentes de la cadena respiratoria

mitocondrial, por lo que limita la síntesis de ATP, esto causa que se pierda la integridad de las uniones estrechas de esta unidad anatómica (Komatsu *et al.*, 1999). En este trabajo, al evaluar la expresión génica de la iNOS en los ratones infectados, se encontró que en el hipotálamo había un aumento significativo del mensajero de esta enzima a partir del día 21 post infección y en el hipocampo y el cerebelo desde el día uno post infección, exactamente igual que las citocinas mencionadas anteriormente, de tal manera que en sinergia con la IL12, la producción de ON por medio de iNOS podría participar en el proceso que causa la permeabilidad en la barrera hematoencefálica de estos animales, sin embargo hace falta realizar más estudios que nos permitan establecer el efecto de la infección con TB sobre la barrera hematoencefálica. Otro proceso biológico que podría causar la producción de ON es muerte celular derivada del impacto a largo plazo del aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que producen daño oxidativo y nitrosativo en los elementos neuronales. La inflamación en el Sistema Nervioso se ha relacionado con la activación de la microglia, mientras que el aumento de ON secundario a la activación de la NOS neural (nNOS) se ha asociado con el proceso de excitotoxicidad inducida por la acumulación de glutamato lo que activa los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y facilita la muerte neuronal (Yuste *et al.*, 2015). La regulación de la iNOS está altamente relacionada con el proceso neuroinflamatorio asociado con las células gliales. A nivel transcripcional, el factor nuclear  $\kappa$ -potenciador-de cadena ligera de células B activadas (NF- $\kappa$ B) se trasloca al núcleo y se une al promotor de la iNOS (Kanarek *et al.*, 2010). En las células gliales NF- $\kappa$ B regula la expresión de iNOS desencadenando diversas vías que producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, caspasas y mevalonato (Yuste *et al.*, 2015). Se ha observado que al administrar de manera crónica NMDA aumentan los niveles de las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) y la iNOS en el cerebro de ratas (Chang *et al.*, 2008). Todos estos datos muestran que el aumento de la expresión de iNOS en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de los animales infectados no solo podría participar en el mecanismo que altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, sino que podría participar en el proceso de neuroinflamación en conjunto con el aumento de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL12 y causar excitotoxicidad y daño oxidativo al liberarse ON y aumentar la producción de iNOS en el cerebro, por ende, causar muerte neuronal.

Finalmente, se midió la expresión de TGF $\beta$ , IL10 e IL4 en hipotálamo, hipocampo y cerebelo encontrándose un aumento significativo de IL10 solamente en el cerebelo. La IL10 es una molécula antiinflamatoria que mantiene en balance entre la pro y anti inflamación.

Las células Tregs son las principales productoras de IL10 (Wang *et al.*, 2015). En un estudio realizado, se observó que la supresión de células Tregs elimina la neurogenesis y provoca daño neurológico. Además cuando se administran células Tregs en el ventrículo izquierdo en el cerebro normal y con isquemia de ratones C57BL/6 aumenta el número de células madre neurales (*neural stem cells*) en la zona subventricular lo que promueve la neurogénesis y esto depende directamente de la producción de IL10 (Wang *et al.*, 2015). Estos datos sugieren que el aumento de esta citocina en el cerebelo de los animales infectados podría estar promoviendo la recuperación del sitio dañado por la neuroinflamación causada por *M. tuberculosis* y en conjunto con la expresión de TGF $\beta$  limitar el desarrollo de daño secundario al inhibir la inflamación en el cerebro y por ende reducir la muerte celular. En el caso de la IL4 se encontró que la expresión génica de esta citocina se comportó de manera similar a lo observado en la expresión de las citocinas proinflamatorias, ya que la IL4 aumentó su expresión génica en el hipotálamo a partir del día 21 pos infección, mientras que en el hipocampo y en el cerebelo ésta citocina se encuentra aumentada a partir del día 1 post infección. La IL4 es una citocina antiinflamatoria, sin embargo, se ha observado que esta citocina puede aumenatar la respuesta inflamatoria una vez que el estímulo inflamatorio se estableció, es decir, tiene un papel dual promoviendo la inflamación o la antiinflamación (Major *et al.*, 2002). En este trabajo la IL4 podría estar aumentando la expresión de las citocinas inflamatorias.

### **Cambios neuroquímicos**

Los neurotransmisores son moléculas solubles secretadas por neuronas, se encuentran presentes en las terminales presinápticas y pueden regular la actividad de neuronas postsinápticas y de diversos órganos efectoros, entre ellos los órganos linfoides primarios y secundarios, que se encuentran altamente inervados por fibras nerviosas que no sólo almacenan altos niveles de algunos neurotransmisores, sino que se encuentran también en contacto directo, tanto con células presentadoras de antígeno como con linfocitos T y linfocitos B (Levite, 2008). Además, muchos neurotransmisores pueden unirse no sólo a receptores específicos expresados en células del SNC y del sistema nerviosos periférico, sino que pueden también unirse a receptores presentes en la membrana de distintas poblaciones celulares inmunocompetentes y cuya expresión es regulada por citoquinas, los neurotransmisores mismos y otros factores (Levite, 2008; Reyes-García y García-Tamayo, 2009). En los linfocitos T, un neurotransmisor determinado podrá activar o inhibir la diferenciación y/o función linfocitaria, dependiendo del estado de activación celular, del

subtipo de receptor expresado por el linfocito, de los niveles del neurotransmisor, de la liberación simultánea de otros neurotransmisores, de la presencia de un particular patrón de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento y, finalmente, de la subpoblación TCD4 o TCD8 que está sufriendo los efectos del neurotransmisor (Levite, 2008).

En los últimos años se ha hecho evidente que la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune puede ser también regulada por neurotransmisores como dopamina, glutamato, acetilcolina, ácido gamabutírico, norepinefrina/epinefrina y serotonina, liberados por el SNC (Pacheco *et al.*, 2009). Los hallazgos indican, además, que las células del sistema inmune pueden expresar receptores para diversos neurotransmisores, entre los cuales se encuentran: glutamato, dopamina, serotonina, acetilcolina, norepinefrina/epinefrina y ácido gamabutírico, proporcionando de esta manera, importante evidencia del papel inmunomodulador de los neurotransmisores (Arreola *et al.*, 2015; Arreola *et al.*, 2016). Así, las catecolaminas, han sido implicadas en la regulación, tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida, al modular la eficiencia de la presentación antigénica por células dendríticas, la expansión y diferenciación de linfocitos, la migración y tráfico de las células inmunocompetentes, la supresión de la respuesta inmune celular y la estimulación de la respuesta inmune humoral. Se ha descrito, además, que células del sistema inmune pueden sintetizar y liberar neurotransmisores como acetilcolina, serotonina, norepinefrina/epinefrina y dopamina (Arreola *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se analizó la cantidad de los neurotransmisores norepinefrina, epinefrina, dopamina y serotonina totales en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de los animales infectados con TB y de controles sin infectar. En el hipotálamo se presentó una disminución de norepinefrina del día 1 al 7 post infección; sin embargo, regresa a niveles basales en el día 14 post infección disminuyendo significativamente en la fase progresiva de la enfermedad. La norepinefrina es una catecolamina primaria producida por el Sistema Nervioso Simpático y tiene efecto sobre las distintas células inmunes como los linfocitos T, B y células NKs donde tiene un efecto inhibitorio o estimulante dependiendo del tipo de célula inmune, el estado de activación de la célula, el tiempo de exposición y la dosis (Samuels y Szabadi, 2008). Este neurotransmisor por otro lado, también participa en diversas funciones cognitivas, afectivas y conductuales (Benarroch, 2009). Además de su papel como neurotransmisor, la norepinefrina también tiene funciones anti inflamatorias y antioxidativas, se ha observado que regula negativamente la transcripción de genes inflamatorios en los astrocitos y la microglia (Feinstein *et al.*, 2002). El aumento que

encontramos en el día 14 de infección podría deberse a que la norepinefrina regula negativamente el incremento de las citocinas proinflamatorias en el hipotálamo, por lo que la producción de estas citocinas tienen su mayor auge a partir del día 21 post infección en esta región del cerebro, cuando hay una disminución en los niveles de norepinefrina y este decremento del neurotransmisor estaría causando cambios en los procesos cognitivos, afectivos, conductuales y en el establecimiento de la memoria y el aprendizaje de los animales infectados al permitir el establecimiento del estado neuroinflamatorio observado (Jardanhazi-Kurutz *et al.*, 2011), lo cual es más evidente en el hipocampo, donde se presentó una disminución completa de la norepinefrina desde el día 1 post infección, lo cual coincide con el aumento de citocinas inflamatorias en esta región del cerebro, esta disminución en la norepinefrina podría deberse a la pérdida de células en el Locus Ceruleus, donde se produce la mayoría de esta catecolamina en el cerebro y es una de las principales áreas del SNC dañadas durante fenómenos de inflamación (Anisman y Merali, 2003). Al dañarse el Locus Ceruleus disminuye la norepinefrina que llega al hipocampo. Debido a lo anterior, sería importante realizar posteriormente estudios histológicos en el Locus Ceruleus durante la infección con TB. Por otro lado, se ha observado que la disregulación del sistema noradrenérgico media algunos de los síntomas de la depresión, como déficit atencional, dificultades de concentración y de memoria, aislamiento social y estados de excitación (Ressler y Nemeroff, 1999). Los cambios que se presentaron en los niveles de norepinefrina podrían ser un factor importante para el establecimiento de la conducta similar a la depresión en los animales infectados con TB.

En el caso de la epinefrina en el hipotálamo se encontró una disminución significativa los días 3,7, 21, 28, 60 y 120 post infección con un pico de aumento significativo el día 14 post infección quizá debido al aumento de las citocinas inflamatorias, ya que tanto la norepinefrina como la epinefrina regulan una respuesta antiinflamatoria que se produce en el cerebro inducida por las citocinas periféricas (Pavón-Romero y Garcés-Álvarez, 2016). En el hipocampo de los animales infectados se presentó una tendencia a aumentar en todos los días de infección. La liberación de adrenalina se da principalmente en la corteza adrenal, la producción de catecolaminas, principalmente adrenalina se ha relacionado con la adquisición inicial de la memoria y en estados de estrés excesivos la liberación de adrenalina daña el proceso de adquisición de la memoria (Tank y Lee-Wong, 2015). El aumento que observamos de epinefrina en el hipocampo e hipotálamo podría deberse a la cantidad liberada en la periferia en respuesta al estado inflamatorio causado por la infección

de *M. tuberculosis*, lo que genera daño cognitivo principalmente en el hipocampo afectando el establecimiento de la memoria en los animales infectados.

En el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de los animales infectados se presentó una disminución significativa de dopamina en comparación con los animales sanos. En el SNC la neurotransmisión dopaminérgica ha sido asociada a funciones motoras, percepción del dolor, secreción hormonal, motivación y placer (Wise, 2008) y su desregulación ha sido relacionada a desórdenes neurológicos como la enfermedad de Parkinson (Hirsh y Hunot, 2009). Evidencia experimental muestra que las citocinas influyen en la síntesis, recaptura y secreción de la dopamina. Según se observó en ratones que reciben  $IFN\alpha$  se presenta una disminución de dopamina en el SNC, asociada con el estímulo de ON (Shuto *et al.*, 1997). Como se mencionó anteriormente, la activación de la microglia se asocia con un incremento de la producción de ON, lo que sugiere que la influencia de las citocinas inflamatorias podría ser la responsable de la disminución en disponibilidad de la dopamina en las tres regiones estudiadas de los animales infectados (Pavón-Romero y Garcés-Álvarez, 2016).

La serotonina disminuyó significativamente en el hipotálamo de los animales infectados los días 1,3,7,14,60 y 120 y aumentó significativamente los días 21 y 28. En el hipocampo la serotonina disminuyó significativamente los días 1,3, 7 y 14 de infección y regresó a niveles basales los días 21, 28, 60 y 120; mientras que en el cerebelo solo disminuyó significativamente los días 1,3 y 7 de infección regresando a niveles basales los demás días de infección. La disminución que se da en los días 1 al 14 y 60 y 120 podría ser causada por el aumento de citocinas proinflamatorias que provocan el aumento de la actividad de IDO lo que disminuye el triptófano disponible como ya se citó anteriormente y por ende puede causar una conducta similar a la depresión y a la conducta de enfermedad en los animales infectados con *M. tuberculosis*. Por otro lado, se ha observado que la respuesta inmune a virus, hongos, parásitos y bacterias necesita de la serotonina. Se tiene evidencia que al administrar inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina se presenta un efecto antibacterial, principalmente en bacterias Gram negativas, y más específicamente en *M. tuberculosis* se ha observado que hay un aumento de  $TNF\alpha$  y de la autofagia de macrófagos infectados (Stanley *et al.*, 2014); por lo que el aumento que se da de serotonina en los días 21 y 28 podría participar en la respuesta inmune periférica inflamatoria contra la micobacteria.

### Cambios conductuales

Las alteraciones inmunológicas, histológicas y en la producción de neurotransmisores observadas en los ratones con TB pulmonar correlacionaron significativamente con anormalidades conductuales. En efecto, los ratones BALB/c con infección pulmonar pero no cerebral con *M. tuberculosis* mostraron conducta de enfermedad (“sickness behavior”) o anodinia que se caracterizó por disminución en el peso corporal y reducción en la conducta locomotora, como se ha reportado en ratones infectados con la cepa vacunal no virulenta del Bacillus Calmette-Guerin (BCG) en ratones CD1 (Moreau *et al.*, 2008), ratones C57BL/6J (O’Connor *et al.*, 2009; Rodríguez-Zas *et al.*, 2015) y ratones BALB/c (Kelley *et al.*, 2013) que solo presentaron estas anormalidades así como de comportamiento similar a la depresión ( Nestler y Hyman, 2010) durante la primera semana de infección, como consecuencia de administrarles micobacterias no patogénicas y que, por lo tanto, no reproducen a la verdadera TB pulmonar. En comparación, nuestros animales infectados con la cepa viva y virulenta de *M. tuberculosis* H37RV mostraron pérdida de peso y durante la etapa temprana de la enfermedad (primer mes) conducta de enfermedad, disminución significativa y progresiva de la actividad locomotora, los cuales se pueden relacionar con el decremento de la dopamina en el cerebro de los animales infectados y con el aumento de la expresión génica de las citocinas proinflamatorias y la muerte neuronal en el cerebelo, cuya principal función es integrar las vías sensitivas y las vías motoras. El daño en el cerebelo se ha asociado en reportes de casos clínicos en humanos con lesión del cerebelo a cambios en el estado de ánimo y la personalidad de los pacientes, que incluyen una combinación de pasividad y brusquedad en la respuesta emocional, así como humor inapropiado e impertinente. Autopsias de personas cuya causa de muerte fue el suicidio y que muestran cuadros depresivos severos, presentan un cerebelo significadamente más pequeño que el de personas fallecidas por accidentes en automóvil. Esto sugiere que la integridad de las estructuras relacionadas con el control motor como el cerebelo es importante para una adecuada función cognitiva y emocional (Schmahmann, 2002), debido a lo cual los cambios observados en el déficit cognitivo de los animales infectados, el cual fue progresivo respecto a la enfermedad, podrían relacionarse con el daño causado por el aumento de la inflamación en el cerebelo y por la muerte neuronal en esta región del cerebro. Este aumento en el daño neurológico durante la TB pulmonar experimental también podría estar relacionado con el aumento de la inflamación causada por la sobre activación de la microglia en la parte caudal del hipocampo (Mckim *et al.*, 2016).

Drante la etapa avanzada o progresiva de la enfermedad (día 28-120 post-infección) los animales infectados con TB presentaron conducta similar a la depresión lo cual tuvo una clara relación con la disminución de la concentración de la epinefrina, de la serotonina y de la dopamina cerebral durante el curso de la enfermedad, ya que alteraciones en los sistemas de neurotransmisión de estos neurotransmisores se han asociado con el desarrollo de depresión, debido a modificaciones en la regulación del eje HHA (Zandio *et al.*, 2002). Los cambios depresivos observados también se asociaron con la posible acumulación de metabolitos del triptófano, como la kinurenina, debido a la actividad de la IDO en el hipocampo y cerebelo, sin embargo, hace falta realizar más estudios para comprobar esto último.

En la prueba de SAP se observó un aumento en la ansiedad en los animales infectados. Existe evidencia de que el aumento de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en el cerebelo, hipocampo e hipotálamo de animales infectados con *Plasmodium falciparum* causa conducta de ansiedad (De Miranda *et al.*, 2011), así como la administración vía intraperitoneal de LPS (Yang *et al.*, 2016), algo similar podría estar sucediendo durante la infección con TB. El aumento de citocinas proinflamatorias en el hipocampo, la corteza frontal y el núcleo estriado ha sido asociado con el establecimiento de ansiedad en ratas (Pawlak *et al.*, 2005), nuestros resultados, donde se observa un aumento de citocinas proinflamatorias en el hipocampo durante la infección con TB podrían relacionarse con el desarrollo de conducta de ansiedad en los animales infectados.

Por otro lado, la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo se vieron afectadas durante la infección con TB. Existe evidencia científica que muestra que la sepsis causa daño en la memoria a corto plazo y a largo plazo (Semmler *et al.*, 2007; Barichello *et al.*, 2007) debido a la activación de la microglia y al aumento de citocinas proinflamatorias en el hipocampo (Michels *et al.*, 2015). Otros estudios muestran que animales coinfectados con *Toxocara canis* y con *Toxoplasma gondii* presentan daño en la memoria a corto plazo (Queiroz *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2014). Todos estos datos sugieren que el aumento de citocinas proinflamatorias en el hipocampo podrían participar en el daño que se observa en la memoria tan a corto como a largo plazo, al inducir muerte neuronal, como la que se presentó en la región C3 del hipocampo. En estudios posteriores, sería interesante determinar si la activación de la microglia participa en el establecimiento del estado inflamatorio en el hipocampo durante el curso de TB pulmonar y si esto se relaciona con muerte neuronal.

## 9) CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros resultados muestran que ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal con micobacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv desarrollan TB pulmonar sin infección cerebral y presentan en la etapa temprana conducta de enfermedad (*sickness behavior*) la cual se caracterizó por pérdida de peso corporal y disminución en la actividad locomotora, también tuvieron cambios conductuales caracterizados por conducta similar a la depresión, daño cognitivo, pérdida de la memoria a corto y largo plazo, así como conducta de ansiedad lo cual fue progresivo y se asoció con incremento significativo en la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo así como de las enzimas iNOS e IDO, la muerte neuronal particularmente en el hipocampo, hipotálamo y cerebelo y las modificaciones en los neurotransmisores. Por lo tanto, la TB pulmonar induce neuroinflamación crónica que podría ser la causa de las alteraciones significativas en funciones cerebrales como la memoria y conductuales como depresión y ansiedad, sin que exista infección cerebral.

## 10) LITERATURA CITADA

- Aghanwa HS, Erhabor GE.** Demographic / socioeconomic factors in mental disorders associated with tuberculosis in southwest Nigeria. *J Psychosom Res.* 1998 Oct;45(4):353-60.
- Anisman H, Merali Z.** Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions. *Ann Med.* 2003;35(1):2-11.
- Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Flores-Gutierrez EO, Garcés-Alvarez ME, de la Cruz-Aguilera DL, Medina-Rivero E, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabián S, Pavón L.** Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res.* 2016;2016:3160486.
- Arreola R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez MA, Garcés-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabian S, Pavón L.** Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J Immunol Res.* 2015;2015:354957.
- Aydin IO, Uluşahin A.** Depression, anxiety comorbidity, and disability in tuberculosis and chronic obstructive pulmonary disease patients: applicability of GHQ-12. *Gen Hosp Psychiatry.* 2001 Mar-Apr;23(2):77-83.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F.** Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jun;40(6):831-7.

- Baruch K, Ron-Harel N, Gal H, Deczkowska A, Shifrut E, Ndifon W, Mirlas-Neisberg N, Cardon M, Vaknin I, Cahalon L, Berkutzi T, Mattson MP, Gomez-Pinilla F, Friedman N, Schwartz M.** CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 5;110(6):2264-9.
- Baruch K, Schwartz M.** CNS-specific T cells shape brain function via the choroid plexus. *Brain Behav Immun.* 2013 Nov;34:11-6.
- Becerril LE, Hernández ME, Granados I, Álvarez L, Pérez SM, Pávón L.** Los efectos conductuales modulados por las citocinas. *Salud Mental.* 2012 Oct-Nov ;35:411-8.
- Benarroch EE.** The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology.* 2009 Nov 17;73(20):1699-704.
- Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrachi-Kol R, Grigoriadis N.** Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Nov;24(3):623-31.
- Besedovsky HO, del Rey A.** Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res.* 2011 Jan;36(1):1-6
- Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, Comim CM, Quevedo J, Kapczinski F, Dal-Pizzol F.** Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock.* 2013 Jul;40(1):45-8.
- Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rico MA, Vaquero-Crespo J.** Influencia del grado de lesión neurológica sobre la eficacia de la terapia celular en un modelo de traumatismo craneoencefálico grave. *Trauma.* 2012;23 (2): 97-105.
- Cárdenas J, Navarro JF.** Modelos animales de ansiedad incondicionada. *Psiqu Biol* 2002;9(1):18-31
- Chang YC, Kim HW, Rapoport SI, Rao JS.** Chronic NMDA administration increases neuroinflammatory markers in rat frontal cortex: cross-talk between excitotoxicity and neuroinflammation. *Neurochem Res.* 2008 Nov;33(11):2318-23.
- Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F.** Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res.* 2010 Apr;17(3):279-86.
- Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A.** Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol.* 2011 May;4(3):252-60.
- Corrêa FM, Chieffi PP, Lescano SA, Santos SV.** Behavioral and memory changes in *Mus musculus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014 Jul-Aug;56(4):353-6.

- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW.** From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jan;9(1):46-56.
- Dantzer R.** Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009 May;29(2):247-64.
- Dantzer R.** Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun.* 2001 Mar;15(1):7-24.
- De Miranda AS, Lacerda-Queiroz N, de Carvalho Vilela M, Rodrigues DH, Rachid MA, Quevedo J, Teixeira AL.** Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). *Neurosci Lett.* 2011 Mar 24;491(3):202-6.
- Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y.** The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology.* 2010 Apr;15(3):433-50.
- Dilger RN, Johnson RW.** Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):932-9.
- Feinstein DL, Heneka MT, Gavrilyuk V, Dello Russo C, Weinberg G, Galea E.** Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochem Int.* 2002 Nov;41(5):357-65.
- Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG.** Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Nov;39(11):1387-97.
- Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, Lauw F, Ropert C, de Oliveira RB, Pereira D, Tada MS, Nogueira P, da Silva LH, Bjorkbacka H, Golenbock DT, Gazzinelli RT.** Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 7;106(14):5789-94.
- Freidin M, Bennett MV, Kessler JA.** Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 1;89(21):10440-3.
- Garg SK, Kipnis J, Banerjee R.** IFN-gamma and IL-4 differentially shape metabolic responses and neuroprotective phenotype of astrocytes. *J Neurochem.* 2009 Mar;108(5):1155-66.
- Hernandez Pando R, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C.** Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb).* 2010 Jul;90(4):268-77.

- Hernández-Pando R, Arriaga AK, Panduro CA, Orozco EH, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V.** The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Mol Pathol.* 1998;65(1):25-36.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Honour J, Silva P, Leyva R, Rook GA.** Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995 Sep;12(1):63-72.
- Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV.** Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996 Sep;89(1):26-33.
- Hirsch EC, Hunot S.** Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009 Apr;8(4):382-97.
- Jardanhazi-Kurutz D, Kummer MP, Terwel D, Vogel K, Thiele A, Heneka MT.** Distinct adrenergic system changes and neuroinflammation in response to induced locus ceruleus degeneration in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience.* 2011 Mar 10;176:396-407.
- Kaesermann HP.** Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drugaction. *Psychopharmacology (Berl).* 1986;89(1):31-7.
- Kanarek N, London N, Schueler-Furman O, Ben-Neriah Y.** Ubiquitination and degradation of the inhibitors of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Feb;2(2):a000166
- Kelley KW, O'Connor JC, Lawson MA, Dantzer R, Rodriguez-Zas SL, McCusker RH.** Aging leads to prolonged duration of inflammation-induced depression-like behavior caused by *Bacillus Calmette-Guérin*. *Brain Behav Immun.* 2013 Aug;32:63-9.
- Komatsu T, Ireland DD, Chung N, Doré A, Yoder M, Reiss CS.** Regulation of the BBB during viral encephalitis: roles of IL-12 and NOS. *Nitric Oxide.* 1999 Aug;3(4):327-39.
- Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T.** Object recognition test in mice. *Nat Protoc.* 2013 Dec;8(12):2531-7.
- Levite M.** Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Aug;8(4):460-71.
- Long NH, Johansson E, Diwan VK, Winkvist A.** Fear and social isolation as consequences of tuberculosis in VietNam: a gender analysis. *Health Policy.* 2001 Oct;58(1):69-81.
- Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Galecki P, Leonard B.** Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med.* 2012 Jun 29;10:66. doi: 10.1186/1741-7015-10-66.

- Maier SF, Watkins LR.** Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev.* 1998 Jan;105(1):83-107.
- Major J, Fletcher JE, Hamilton TA.** IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2002 Mar 1;168(5):2456-63.
- Malynn S, Campos-Torres A, Moynagh P, Haase J.** The pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  regulates the activity and expression of the serotonin transporter (SERT) in astrocytes. *Neurochem Res.* 2013 Apr;38(4):694-704.
- Marin I, Kipnis J.** Learning and memory ... and the immune system. *Learn Mem.* 2013 Sep 19;20(10):601-6.
- Martens WH.** A review of physical and mental health in homeless persons. *Public Health Rev.* 2001;29(1):13-33.
- Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T.** Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med.* 2016 Jun;37(2):333-45.
- McKim DB, Niraula A, Tarr AJ, Wohleb ES, Sheridan JF, Godbout JP.** Neuroinflammatory Dynamics Underlie Memory Impairments after Repeated Social Defeat. *J Neurosci.* 2016 Mar 2;36(9):2590-604.
- McQuiston HL, Colson P, Yankowitz R, Susser E.** Tuberculosis infection among people with severe mental illness. *Psychiatr Serv.* 1997 Jun;48(6):833-5.
- Michels M, Danielski LG, Dal-Pizzol F, Petronilho F.** Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. *Curr Neurovasc Res.* 2014;11(3):262-70.
- Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, Dominguni D, Steckert A, Schuck PF, Quevedo J, Petronilho F, Dal-Pizzol F.** The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* 2015 Jan;43:54-9.
- Minnikin DE, Lee OY, Pitts M, Baird MS, Besra GS.** Essentials in the use of mycolic acid biomarkers for tuberculosis detection: response to "High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection" by Mark et al., 2010. *J Archaeol Sci.* 2010 Oct; 37:2407-12.
- Morales-Montor J, Picazo O, Besedovsky H, Hernández-Bello R, López-Griego L, Becerril-Villanueva E, Moreno J, Pavón L, Nava-Castro K, Camacho-Arroyo I.** Helminth infection alters mood and short-term memory as well as levels of neurotransmitters and cytokines in the mouse hippocampus. *Neuroimmunomodulation.* 2014;21(4):195-205.
- Moreau M, André C, O'Connor JC, Dumich SA, Woods JA, Kelley KW, Dantzer R, Lestage J, Castanon N.** Inoculation of *Bacillus Calmette-Guerin* to mice induces an

acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain Behav Immun*. 2008 Oct;22(7):1087-95.

**Morse D.** Prehistoric tuberculosis in America. *Am Rev Respir Dis*. 1961 Apr;83:489-504.

**Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Femenía T, García-Gutiérrez MS, García-Payá ME, Leiva-Santana C, Manzanares J.** Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol*. 2008; 47 (3): 137-145.

**Nestler EJ, Hyman SE.** Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010 Oct;13(10):1161-9.

**Nicod LP.** Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly*. 2007 Jun 30;137(25-26):357-62.

**O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R.** Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4200-9.

**Pacheco R, Prado CE, Barrientos MJ, Bernales S.** Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J Neuroimmunol*. 2009 Nov 30;216(1-2):8-19.

**Pavón-Romero L., Garcés-Álvarez M.** 2016. Regulación neuroinmunoendocrina. En: *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Wolters Kluwer. 1ra Edición. España. Pp: 314-333.

**Pawlak CR, Schwarting RK, Bauhofer A.** Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Jun 13;137(1-2):159-65.

**Paxinos G, Franklin K.** The mouse brain in stereotaxic coordinates. Gulf Professional Publishing. 2012. 4ta edición. Pp: 360.

**Pérez AR, Bottasso O, Savino W.** The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):96-105.

**Platt B, Schulenberg J, Klee N, Nizami M, Clark JA.** A depressive phenotype induced by Bacille Calmette Guérin in 'susceptible' animals: sensitivity to antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Apr;226(3):501-13.

**Queiroz ML, Viel TA, Papa CH, Lescano SA, Chieffi PP.** Behavioral changes in *Rattus norvegicus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013 Jan-Feb;55(1):51-3.

**Rajeswari R, Muniyandi M, Balasubramanian R, Narayanan PR.** Perceptions of tuberculosis patients about their physical, mental and social well-being: a field report from south India. *Soc Sci Med*. 2005 Apr;60(8):1845-53.

**Ressler KJ, Nemeroff CB.** Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry*. 1999 Nov 1;46(9):1219-33.

Caracterización de la respuesta inmunológica local en el Sistema Nervioso Central y su relación con anomalías morfológicas, bioquímicas y conductuales durante tuberculosis pulmonar progresiva

- Reyes-García MG, García-Tamayo F.** A neurotransmitter system that regulates macrophage pro-inflammatory functions. *J Neuroimmunol.* 2009 Nov 30;216(1-2):20-31.
- Rodríguez-Cunts G.** 2012. Género *Mycobacterium*. En: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf>. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2014.
- Rodriguez-Zas SL, Nixon SE, Lawson MA, Mccusker RH, Southey BR, O'Connor JC, Dantzer R, Kelley KW.** Advancing the understanding of behaviors associated with Bacille Calmette Guérin infection using multivariate analysis. *Brain Behav Immun.* 2015 Feb;44:176-86.
- Rodriguez-Zas SL, Nixon SE, Lawson MA, Mccusker RH, Southey BR, O'Connor JC, Dantzer R, Kelley KW.** Advancing the understanding of behaviors associated with Bacille Calmette Guérin infection using multivariate analysis. *Brain Behav Immun.* 2015 Feb;44:176-86.
- Rojas W., Anaya J., Aristizábal B., Cano L., Gómez L., Lopera D.** 2015. *Inmunología de Rojas*. 17va Edición. Fondo editorial. pp: 605.
- Rook G, Baker R, Walker B, Honour J, Jessop D, Hernandez-Pando R, Arriaga K, Shaw R, Zumla A, Lightman S.** Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:913-22.
- Rook G, Hernández Pando R. Baker R, Orozco EH, Arriaga K, Pavón L, Streber ML.** Human and murine tuberculosis as models for immuno-endocrine interactions. En *Steroid hormones and the T-cell cytokine profile*. Londres Springer, 1997: 193-220.
- Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S.** Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther.* 1996;69(2):85-95.
- Russell DG.** *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):569-77.
- Samuels ER, Szabadi E.** Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol.* 2008 Sep;6(3):235-53.
- Schmahmann J.** 2002. The role of the cerebellum in the affect and psychosis. En Manto M. y Pandolfo M. (eds.). *The cerebellum and its disorders*. London, Cambridge University Press. Pp: 136-157
- Schmidt KE, Schumak B, Specht S, Dubben B, Limmer A, Hoerauf A.** Induction of pro-inflammatory mediators in Plasmodium berghei infected BALB/c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. *Microbes Infect.* 2011 Sep;13(10):828-36.

- Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT.** Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol.* 2007 Apr;204(2):733-40.
- Sharman MJ, Volek JS.** Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men. *Clin Sci (Lond).* 2004 Oct;107(4):365-9.
- Shuto H, Kataoka Y, Horikawa T, Fujihara N, Oishi R.** Repeated interferon-alpha administration inhibits dopaminergic neural activity in the mouse brain. *Brain Res.* 1997 Feb 7;747(2):348-51.
- Stanley SA, Barczak AK, Silvis MR, Luo SS, Sogi K, Vokes M, Bray MA, Carpenter AE, Moore CB, Siddiqi N, Rubin EJ, Hung DT.** Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular Mycobacterium tuberculosis growth. *PLoS Pathog.* 2014 Feb 20;10(2):e1003946.
- Sukhova EV, Sukhov VM, Kornev AV.** The specific features of an attitude of patients with pulmonary tuberculosis towards disease. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2006;(5):20-3.
- Sukhova EV.** Behavioral aggression in patients with pulmonary tuberculosis and a way of its correction. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2003;(12):13-7.
- Sukhova EV.** Need for psychological correction in patients with pulmonary tuberculosis. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2004;(10):34-6.
- Tank AW, Lee Wong D.** Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol.* 2015 Jan;5(1):1-15.
- Wang B, Jin K.** Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis. *Metab Brain Dis.* 2015 Apr;30(2):355-65.
- Wang J, Xie L, Yang C, Ren C, Zhou K, Wang B, Zhang Z, Wang Y, Jin K, Yang GY.** Activated regulatory T cell regulates neural stem cell proliferation in the subventricular zone of normal and ischemic mouse brain through interleukin 10. *Front Cell Neurosci.* 2015 Sep 14;9:361.
- Wells KB, Golding JM, Burnam MA.** Psychiatric disorder in a sample of the general population with and without chronic medical conditions. *Am J Psychiatry.* 1988 Aug;145(8):976-81.
- Westaway MS, Wolmarans L.** Depression and self-esteem: rapid screening for depression in black, low literacy, hospitalized tuberculosis patients. *Soc Sci Med.* 1992 Nov;35(10):1311-5.
- Wise RA.** Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res.* 2008 Oct;14(2-3):169-83.

- Xarchas KC, Bourandas J.** Injuries and diseases of the spine in the ancient times. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003 Jul 1;28(13):1481-4.
- Yang L, Wang M, Guo YY, Sun T, Li YJ, Yang Q, Zhang K, Liu SB, Zhao MG, Wu YM.** Systemic inflammation induces anxiety disorder through CXCL12/CXCR4 pathway. *Brain Behav Immun*. 2016 Aug;56:352-62.
- Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F.** Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2015 Aug 17;9:322.
- Zambrano M., Hernández-Neuta G., Hernández-Neuta I., Sandoval A.** 2012. Genomic Variability of *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Understanding Tuberculosis – Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. InTech. Croacia. Pp: 37-33.
- Zandío M, Ferrín M, Cuesta MJ.** Neurobiology of depression. *An Sist Sanit Navar*. 2002; 25 Suppl 3:43-62.