



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Modelo murino de alimentación
hipercalórica y su efecto en la
progresión de la tuberculosis
pulmonar**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ISRAEL HERNÁNDEZ BUSTAMANTE



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. BRENDA NOEMÍ MARQUINA CASTILLO
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



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.

Índice

1. Abreviaturas

2. Introducción

- Prevalencia de la tuberculosis a nivel mundial
- *Mycobacterium tuberculosis*
- Formación del granuloma y mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad activa
- Dietas hipercalóricas, malnutrición y su efecto en el sistema inmunológico

3. Justificación

4. Hipótesis

5. Objetivos

6. Materiales y Método

- Medidas de seguridad
- Alojamiento
- Dieta hipercalórica
- Grupos, pesaje y sobrevida
- Determinación de las concentraciones de colesterol total, triglicéridos y glucosa en sangre y albumina en suero
- Infección
- Sacrificio
- Unidades formadoras de colonia (UFC) en pulmón, hígado y bazo
- Extracción de RNA, análisis de expresión de citocinas en pulmón por RT-PCR y qPCR

- Análisis histológico

7. Resultados

- Peso y sobrevida
- Triglicéridos, colesterol y glucosa, albumina sérica
- Carga bacilar (UFC) en pulmón, neumonía y porcentaje de granulomas
- Peso del timo
- Carga bacilar (UFC) en hígado y bazo, formación de granulomas en hígado
- Análisis histológico
- Expresión de citocinas (TNF- α , iNOS, GADPH y INF- γ)

8. Discusión de resultados

9. Conclusión

10. Perspectivas

11. Bibliografía

Abreviaturas

- **BCG** (Bacilo de Calmette-Guérin)
- **Bcl** (Célula B linfoma 2)
- **CCL** (Quimiocina con ligando c-c)
- **CD** (Grupo de diferenciación)
- **CMTB** (Complejo *Mycobacterium tuberculosis*)
- **CTRL** (Animales control)
- **DNA** (Ácido desoxirribonucleico)
- **DAP** (Ácido diaminopimélico)
- **DH** (Dieta hipercalórica)
- **G3PDH** (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa)
- **INCMNSZ** (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”)
- **INOS** (Óxido nítrico sintetasa inducible)
- **IL-1 β** (Interleucina 1 beta)
- **IL-2** (Interleucina 2)
- **IL-3** (Interleucina 3)
- **IL-4** (Interleucina 4)
- **IL-5** (Interleucina 5)
- **IL-6** (Interleucina 6)
- **IL-10** (Interleucina 10)
- **IFN γ** (Interferon gamma)
- **Mtb** (*Mycobacterium tuberculosis*)
- **MD2** (Proteína asociada a los TLR)
- **NO** (Óxido nítrico)
- **NK** (Natural Killer)
- **OMS** (Organización Mundial de la Salud)
- **PCR-RT** (Reacción en cadena de la polimerasa, retro-transcripción)
- **qPCR** (Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa o tiempo real)
- **PKC** (Proteína cinasa)

- **Rab7** (Proteína relacionada a Ras)
- **RNA** (Ácido ribonucleico)
- **LAM** (Lipoarabinomanano)
- **LAMP** (Glicoproteínas de membrana asociadas a lisosímas)
- **TACE** (Enzima encargada de convertir a TNF)
- **TB** (Tuberculosis)
- **Th** (Linfocito T cooperador)
- **TLR** (Receptor tipo toll)
- **TNF- α** (Factor de necrosis tumoral alfa)
- **TNFR1** (Receptor tipo 1 de TNF)
- **TGF- β** (Factor de crecimiento tumoral o factor de crecimiento transformante tipo beta)
- **UFC** (Unidades formadoras de colonia)
- **VDR** (Receptor de vitamina D)
- **VIH** (Virus de Inmunodeficiencia Humano)
- **Zip2** (Transportador de membrana de Zinc)

Introducción

Aunque se han hecho grandes avances en la lucha por la erradicación de enfermedades infecciosas, la tuberculosis (TB) sigue siendo un problema de salud a nivel mundial. La TB es una enfermedad respiratoria infecto-contagiosa causada por bacterias del género *Mycobacterium*, capaces de infectar un amplio rango de organismos; para el humano los principales patógenos son *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. En el 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en su informe anual sobre Tuberculosis que al 2015 hubo aproximadamente 1.5 millones de personas que fallecieron a causa de esta enfermedad y 10.4 millones que adquirieron la infección. Esto coloca al bacilo tuberculoso como el agente infeccioso con la tasa más alta de mortalidad a nivel mundial incluso por encima del virus de inmunodeficiencia humano (VIH). Actualmente existe una vacuna llamada BCG o Bacilo de Calmette-Guérin, en honor a sus desarrolladores, que previene el desarrollo de la enfermedad activa. Esta vacuna se aplica al nacer en muchos países, sin embargo, la alta incidencia y la alta tasa de mortalidad demuestran que la vacuna no ha tenido la protección deseada debido a una baja efectividad y a la existencia de otros factores que aumentan la susceptibilidad a padecer la enfermedad activa [1].

En años recientes se ha demostrado que el proceso inflamatorio no sólo es parte esencial de la respuesta del sistema inmunológico hacia agentes patógenos o laceraciones sino que también, participa en enfermedades no infecciosas de trasfondo metabólico como: la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión, la hipercolesteremia, el síndrome metabólico y algunas enfermedades cardiovasculares [4].

Durante las últimas décadas, en el mundo han ocurrido grandes cambios en la forma de vivir, uno de los principales ha sido la modernización en la producción de comestibles, que ha ocasionado que algunos de los alimentos que se consumen hoy en día contengan más cantidad de grasas y azúcares en proporción a otros nutrientes que los que se consumían en épocas pasadas, a este tipo de alimentos se les conocen como comida rápida o comida chatarra y regularmente su ingesta está acompañada de malos hábitos de vida como: comer en exceso y sedentarismo lo que ha fomentado el desarrollo de una pandemia de obesidad y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y azúcares [2].

La creciente pandemia de obesidad y las alteraciones metabólicas derivadas de esta condición, son de suma importancia para el estudio del funcionamiento del sistema inmunológico ya que, existe evidencia que asocia a estas alteraciones con el desarrollo de un estado inflamatorio crónico de bajo grado que parece tener repercusiones en la protección en contra de agentes patógenos, pues se ha encontrado que los individuos que padecen de estas alteraciones tienen una mayor propensión a padecer tuberculosis activa, de tal forma que hoy en día se estima que las personas con diabetes son 3 veces más susceptibles a padecer esta enfermedad [3, 5, 6, 7, 8].

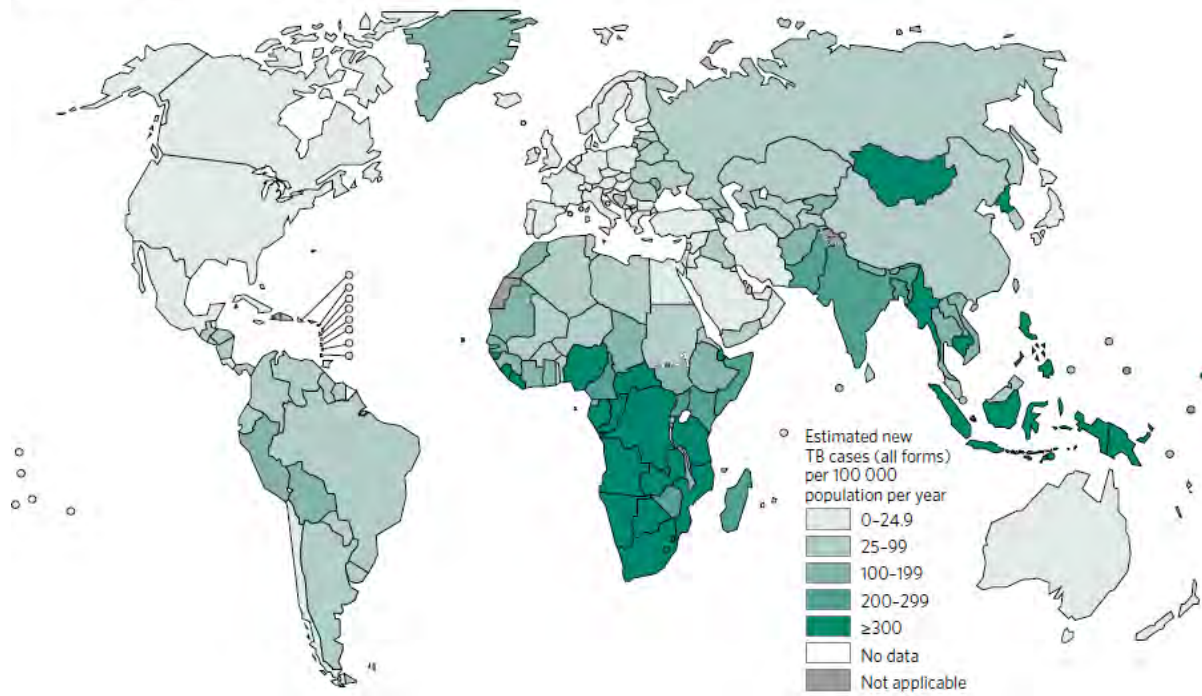
Prevalencia de la tuberculosis a nivel mundial

La tuberculosis sigue siendo uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial, tan solo en el 2015 se reportaron 10.4 millones de nuevos casos de los cuales 5.9 millones eran hombres, 3.5 millones mujeres y un millón niños.

En promedio, anualmente se reportan 1.5 millones de muertes a causa de la tuberculosis, esto a pesar de que entre el 2000 y el 2015 presentó una reducción del 22% en la incidencia de esta enfermedad a nivel mundial. La TB permanece en el número uno de las 10 enfermedades con mayor número de muertes a nivel mundial y es a la que se le invierte más en investigación y servicios de salud. Tan solo en el 2016 se invirtieron cerca de 6,600 millones de dólares para combatirla, con la mayoría de los apoyos dirigidos hacia países en vías de desarrollo.

Las regiones con el mayor número de casos reportados de TB son las que pertenecen al África subsahariana y Asia, mientras que en el continente Americano solo está Brasil dentro de los 20 países con el mayor número de infectados a nivel mundial.

Los criterios para clasificar y medir la progresión de la enfermedad son: la incidencia, la prevalencia y la mortalidad. La incidencia es definida como el número de casos nuevos y recaídas en un año. La prevalencia es el número de casos por año y la mortalidad es el número de muertes confinadas causadas por la tuberculosis en un año [1].

Estimated TB incidence rates, 2015**Fig1.** Grafica de incidencia a nivel mundial de TB (OMS, 2016).

Mycobacterium tuberculosis

El género *Mycobacterium* pertenece al orden de los Corynebacteriales [9], donde también, se agrupan otros géneros de importancia médica como: *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* y *Legionella* con quienes comparte la característica de poseer ácidos micólicos en la envoltura celular.

Dentro del género *Mycobacterium* están clasificadas una variedad de bacterias patógenas intracelulares que afectan al ser humano y a otras especies animales. Todas ellas tienen forma de bacilo alargado y miden aproximadamente 0.5 x 0.3 micrómetros, no presentan movilidad y son aerobias obligadas [10].

Las bacterias del género *Mycobacterium* están agrupadas en dos grandes conjuntos, el complejo *Mycobacterium tuberculosis* o CMTB donde están *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum* y las denominadas micobacterias no tuberculosas o NTB.

Las bacterias que pertenecen al CTMB son los principales agentes etiológicos de la TB humana y de otras especies, mientras que los miembros del NTB pueden provocar algún otro tipo de patología. En las NTB están clasificadas las especies: *M. avium*, *M. bovis* y *M. arupense*, entre otras.

Las especies que conforman el CMTB pueden clasificarse a su vez como de rápido o lento crecimiento, siendo las de lento crecimiento identificadas como las principales causantes de la TB humana (*M. tuberculosis* y *M. africanum*), *M. bovis* agente causal de la TB bovina y oportunista de humanos, *M. leprae* agente etiológico de la lepra. Mientras que las de rápido crecimiento como *M. smegmatis* y *M. canettis* no suelen ser patógenas obligadas, pero si son oportunistas de individuos con inmunodeficiencia. Existen otras especies dentro del CMTB (*M. microti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*) todas ellas con hospederos definidos no humanos. Sin embargo, suelen ocasionar zoonosis en individuos con un sistema inmunológico deficiente [10].

Normalmente se les considera a las micobacterias como bacterias Gram positivas; la membrana celular suele ser muy similar a la de las demás especies bacterianas, sin embargo, poseen fosfolípidos derivados del ácido fosfatídico que son exclusivos del grupo de los actinomicetos como el manósido fosfatidilinositol (PIM).

La pared celular de peptidoglucano es similar a la de las bacterias Gram positivas, con la excepción de la N-acetilglucosamina que está enlazada a N-glucolilmurámico en lugar de N-acetilmurámico. La envoltura celular posee una capa de mureína entrecruzada por puentes tetrapeptídicos que contienen residuos de L-alanina, D-glutamato y ácido diaminopimérico (DAP). Algunos de los residuos de ácido N-glucolilmurámico están unidos por enlaces fosfodiéster en una capa superpuesta de polisacáridos de cadena ramificada llamados arabinogalactanos (compuesta por arabinosa y galactosa en partes iguales) que a su vez están unidos a ácidos micólicos. Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos están intercaladas con otros lípidos y glucolípidos asociados a la pared celular, los cuales incluyen los grupos acil-grasos cortos y medianos y los sulfolípidos trehalosa. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena ramificada compuestos por una cadena α -alkil y una cadena más larga β -hidroxi, y suelen estar unidos a una molécula de glicerol o a un residuo de trehalosa formando los TMM o trehalosa monomicólato o cuando están unidos a dos ácidos micólicos forman los TDM trehalosa dimicólato. Tal vez uno de los más importantes TDM sea el ácido micólico 6,6-dimecoliltrehalosa también conocido como "el factor cuerda". Es una molécula asociada con un amplio espectro de actividades biológicas y a la cual se le atribuye principalmente la citotoxicidad de la membrana celular de las micobacterias [11,12, 13, 14, 16,17].

La complejidad de su envoltura celular provee a la micobacteria de un escudo resistente a sustancias nocivas del ambiente extracelular e intracelular, característica que también la hace resistente contra fármacos. La gran cantidad de lípidos hace que la permeabilidad de la envoltura sea

baja dificultando su tinción con el colorante de Gram, por lo que, para poder ser visualizadas en el microscopio óptico se utiliza la tinción de “Ziehl-Neelsen” que emplea una fuente de calor para volver más permeable la envoltura y que pueda difundir el colorante. También se utiliza la tinción en frío “Kinyun” que en lugar de calor utiliza un detergente para volver más permeable la membrana [10].

Dentro del CMTB la bacteria más estudiada ha sido *M. tuberculosis* y dentro del gran número de cepas de esta especie, la cepa H37Rv se ha utilizado con mayor frecuencia como cepa de referencia en los experimentos en laboratorio. El genoma de *M. tuberculosis* comprende 4,411,529 pares de bases y contiene alrededor de 4000 genes. [15] El contenido de guanina-citocina es alto y su distribución constante a través del genoma indica que la transferencia horizontal de islas de patogenicidad es escasa o que incluso pueden estar ausentes. La mayoría de sus genes en proporción al genoma completo están especializados en la producción de enzimas involucradas en la lipogénesis y lipólisis requeridos principalmente para la función óptima de su envoltura. [15]

Formación del granuloma y mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad activa

Un granuloma puede ser definido como una colección compacta de células mononucleares maduras que contienen un agente potencialmente peligroso. Conceptualmente, la evolución del granulomas puede ser descrita en tres etapas: el desarrollo de un infiltrado celular de fagocitos mononucleares jóvenes, la maduración y agregación de estas células en un granuloma maduro y la potencial maduración de estas células en un granuloma epitelial. La maduración de los monocitos a macrófagos involucra el cambio radical de su metabolismo con el subsecuente cambio en su capacidad fagocitaria.

Los macrófagos son las células encargadas de fagocitar y degradar muchos de los desechos producidos por las células y también representan una defensa importante contra material externo que pueda producir daño. La interacción que tienen los macrófagos con sustancias como: moléculas con carga eléctrica, ciertos nucleótidos o anticuerpos estimula su maduración y su activación. La maduración de los macrófagos favorece su capacidad microbicida y fagocitaria y representa otro nivel de respuesta en contra de agentes extraños. La estimulación continua producida por algún microorganismo o alguna sustancia incapaz de ser degradada por los macrófagos provoca un cambio conformacional en la ultra estructura de los mismos, modificando su apariencia y metabolismo. Las formas resultado de esta estimulación son conocidas como células epiteloideas y células gigantes o células de Langhans. Las células epiteloideas reciben este nombre debido a su apariencia semejante a una célula epitelial; acompañado de este cambio morfológico existen cambios bioquímicos que marcan otro nivel en la maduración de las células mononucleares, pues aumentan su capacidad microbicida, fagocitaria y degradadora. Por su parte, las células gigantes se forman a partir de la fusión de varios macrófagos que entremezclan aleatoriamente su citoplasma seguido de un reacomodo en la localización de sus orgánulos. Al igual que las células epiteloideas, las células gigantes representan otro nivel de maduración de los macrófagos con el subsecuente aumento en sus capacidades bactericidas [18].

La agregación de las células para formar el granuloma dependerá en mayor medida del tipo de estímulo recibido. Algunas sustancias provocan la formación de granulomas transitorios, mientras que otras como el bacilo tuberculoso inducen la formación de un granuloma maduro que puede permanecer durante tiempo indefinido.

La cinética de formación del granuloma comienza con un evento inicial de inflamación aguda, esto provoca el reclutamiento de células mononucleares que durante la primera etapa de formación del

granuloma madurarán a macrófagos y fagocitarán el material extraño. En la segunda etapa, los macrófagos activados comenzaran a agregarse y fusionarse para formar células de Langhans y formar al granuloma maduro. Sin embargo, si el estímulo persiste, células epiteloides comenzarán a rodear a núcleo compuesto por las células gigantes y dará paso al granuloma epitelial [18].

Aunque el granuloma no es una estructura única resultado de la infección con *M. tuberculosis* [21,23], es en esta enfermedad que se ha descrito muchos de los mecanismos asociados a la formación del mismo. La estructura del granuloma tuberculoso está caracterizada por poseer macrófagos infectados en el centro rodeados por macrófagos espumosos y epiteloides, seguido de monocitos y células multinucleadas gigantes. La periferia del granuloma está delimitada por fibroblastos que forman una capsula fibrosa al rededor del centro de macrófagos. A su vez, la capsula está rodeada por linfocitos acomodados en la periferia. En este estado el granuloma representa una estructura estable que mantiene por tiempo indefinido a la bacteria y no causa ningún síntoma de enfermedad [22].

La estabilidad del granuloma está mediada por la interacción célula a célula. La liberación de citocinas, quimiocinas y demás moléculas que participan en la inflamación forman gradientes de concentración dentro del granuloma y mantienen la rigidez y forma de éste.

Una citocina de especial relevancia para la formación y el mantenimiento del granuloma es el TNF α . Esta citocina es sintetizada como una proteína de membrana de 26KDa (mTNF) que puede ser escindida por una metaloproteinasa de TNF (enzima convertidora de TNF alfa TACE o ADAM) que libera un producto de 17 KDa conocido como TNF soluble o sTNF. Ambos tipos de TNF (mTNF y sTNF) son triméricos en su forma bioactiva y pueden inducir su función al unirse a uno de los dos receptores para TNF coexpresados en la membrana de muchos tipos celulares (unión reversible). El

receptor para TNF tipo 1 y tipo 2 o TNFR1 y 2 o CD120a y b respectivamente; a pesar de que ambos receptores son co-expresados, se le atribuye al TNFR1 la actividad en la respuesta inflamatoria.

En modelos animales donde se ha bloqueado la actividad del TNF α con fármacos (infliximab y etanercept) se ha observado que la formación del granuloma es deficiente, aberrante o retrasada. Se ha reportado que cuando existe neutralización del TNF α en etapas maduras del granuloma, conduce a una desorganización de la estructura con la subsecuente liberación de su contenido [22].

La presentación de antígenos de la micobacteria por el sistema inmunológico depende de la internalización, transporte celular y procesamiento proteolítico por parte de los macrófagos y células dendríticas. La internalización de la micobacteria ocurre a través de la fagocitosis y está mediada por diferentes receptores de membranas. Sin embargo, esta bacteria suele permanecer dentro de los fagosomas con capacidad de replicarse. La proteína cinasa G serina/treonina (PknG) similar a la de los eucariotas es un importante factor de virulencia para la micobacteria ya que es responsable de bloquear la fusión del fagosoma micobacterial con el lisosoma, permitiendo la sobrevivencia intracelular de la bacteria [22].

Los macrófagos alveolares fagocitan a la bacteria y la mantienen dentro de los fagosomas para posteriormente unirlos a los lisosomas y formar el fagolisosoma. En la fagocitosis están involucradas muchas moléculas que reconocen la compleja pared de la micobacteria, incluyendo receptores del complemento, receptores de manosa y receptores de inmunoglobulinas. En términos generales la fagocitosis se ve altamente favorecida por la activación del complemento y el subsecuente reconocimiento de la pared de la bacteria [22].

En los fagolisosomas la bacteria es eliminada al ser expuesta a radicales libres del oxígeno y nitrógeno así como también a enzimas proteolíticas. La formación de los radicales libres o especies

reactivas, principalmente el óxido nítrico, ocurre cuando el macrófago es estimulado por citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e INF- γ producidas por los linfocitos con fenotipo Th1. Estas citocinas al ser censadas por el macrófago, promueven la transcripción de la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) la cual está presente en macrófagos y células epiteliales siendo una isoforma de la enzima óxido nítrico sintetasa, que está presente constitutivamente en la mayoría de los tejidos. La iNOS utiliza al aminoácido L-arginina como sustrato para la creación de óxido nítrico y citrulina. Una vez formado el óxido nítrico este reacciona con los radicales del oxígeno y produce intermediarios reactivos de nitrógeno como el peroxinitrito. Sin embargo, el bacilo tuberculoso puede permanecer por un tiempo indefinido dentro de los macrófagos alveolares debido a que ha desarrollado mecanismos que impiden la formación del fagolisosoma.

La pared de la micobacteria está altamente relacionada con la inhibición de los mecanismos bactericidas, pues los glucolípidos de lipoarabinomanano (LAM) inhiben el incremento del Ca²⁺ intracelular, afectando la vía de Ca²⁺/calmodulina la cual es esencial para la fusión del fagosoma-lisosoma [16,17, 25]. Se sabe que estos fagosomas que contiene a la micobacteria presentan marcadores tempranos de endosomas pero no muestran la adquisición de marcadores tardíos de lisosomas/endosomas como rab 7 y de proteínas asociadas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP). También se sabe que dentro de estos endosomas no participa la bomba de protones dependiente de ATP (vH⁺-ATPasa) lo que explica porque hay una acidificación limitada en el interior [22].

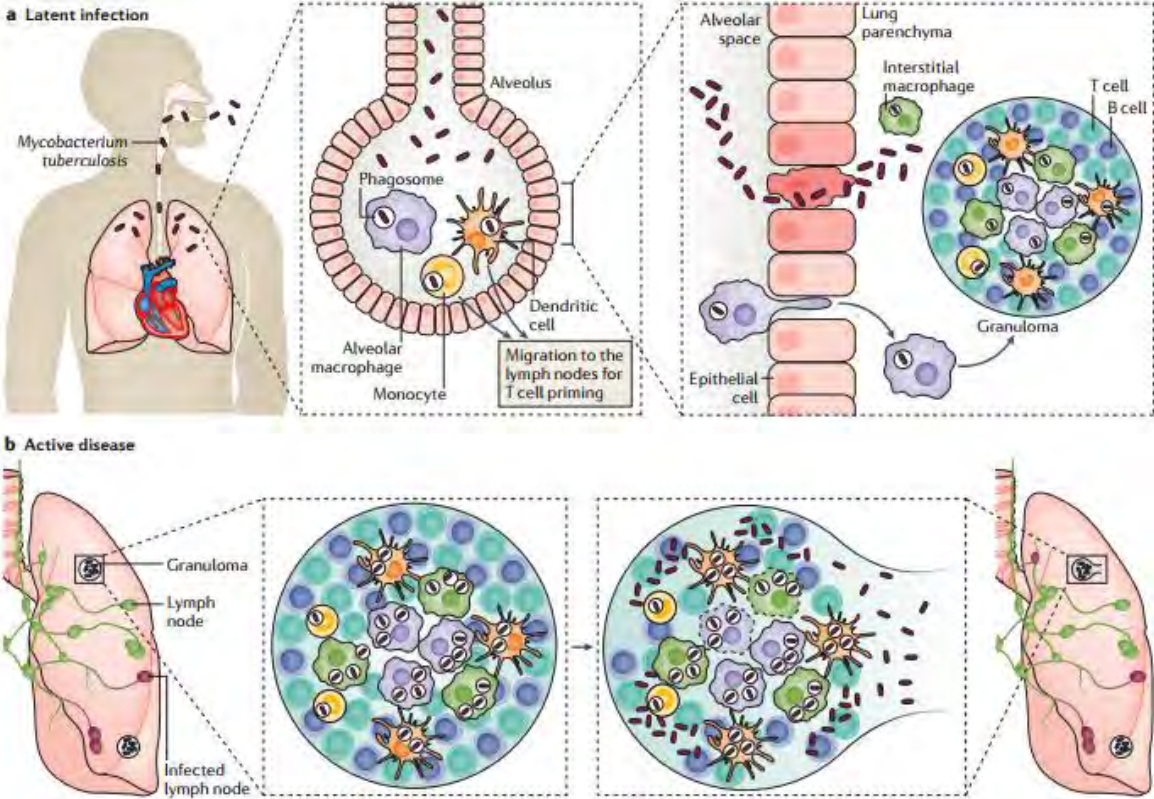


Fig. 2. Esquema que representa las dos variantes de la enfermedad activa y en estado latente. Nature Reviews (2016). Tuberculosis.

Dietas hipercalóricas, malnutrición y su efecto en el sistema inmunológico

Actualmente existen diversas formas de estudiar los desórdenes metabólicos basados en modelos animales. Están los modelos desarrollados a partir de deplecciones en genes específicos, los cuales se conocen como monogénicos o “knockout”. Los más usados son las ratas Zucker (*fa/fa*) y los ratones knockout de leptina (*ob/ob*) o de su receptor (*db/db*) [26, 27, 33, 37]. Este tipo de modelos se emplea cuando se quiere estudiar un factor específico relacionado con las alteraciones en el metabolismo, como la neuropatía o la nefropatía diabética [28, 29, 30].

Existen otros modelos en los que en vez de utilizar a animales modificados genéticamente se utilizan sustancias tóxicas o fármacos, como la estreptozotocina (Stz) que destruye las células beta del páncreas aumentando los niveles de glucosa en sangre, permitiendo que los animales desarrollen diabetes mellitus tipo 1 o 2, dependiendo de la dosis administrada.

Otro modelo consiste en la administración de “gold- thioglucose”, un análogo de la glucosa que produce necrosis en la porción ventromedial del hipotálamo ocasionando hiperfagia en ratones y, como consecuencia, obesidad [30, 31, 32, 33, 8, 38]. Sin embargo, este tipo de modelos no abarcan el amplio rango de factores involucrados en los desórdenes metabólicos y la etiología por la cual se generan no es la misma que presumiblemente ocasiona los desórdenes en el humano.

Se cree que el consumo excesivo de grasas y carbohidratos y la falta de ejercicio provocan la mayoría de las alteraciones metabólicas a nivel poblacional [50]. Debido a esto, se han desarrollado modelos basados principalmente en suministrar dietas con alto contenido calórico a los animales. Este aporte de calorías extra puede provenir de grasas o carbohidratos o de ambos, haciendo que el

modelo animal se asemeje más a la etiología de los desórdenes metabólicos que ocurre en los humanos [33].

A las dietas altas en grasas comúnmente se les conoce como “high-fat diet” por su nombre en inglés, y han sido un instrumento útil para estudiar las anormalidades nutricionales y su efecto sobre el organismo. Se sabe que la primera “high-fat diet” que se utilizó fue en 1940 y, a partir de esa fecha, han sido ampliamente utilizadas para estudiar desórdenes metabólicos como hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemias e incluso alteraciones más severas como daño hepático (esteatosis no alcohólica) [33, 47,49]. Sin embargo, aún hay controversia sobre la utilización de este tipo de dietas, pues no hay un consenso en el concepto de “high- fat diet” a pesar de que existen más de 650 publicaciones en las cuales se ha reportado su uso [33, 44].

Aun así, y a pesar de que no se tiene ningún consenso para su preparación, este tipo de dietas han resultado tener efectos positivos para provocar desórdenes metabólicos. Se ha reportado que las dietas que contienen aceites vegetales son las más adecuadas para provocar obesidad y las dietas hechas a partir de aceites de animales marinos tienen poco efecto sobre el peso de los animales [33].

Existen dos tipos de dietas “high-fat”, las primeras están hechas con ingredientes definidos, es decir, se generan agregando la cantidad de carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y grasas que el investigador requiera y tienen la ventaja de poder ser reformuladas cada que se requiera la validación del efecto de algún ingrediente. Las segundas son dietas que se generan a partir de dietas ya establecidas, es decir, croquetas tipo Chow cuya composición es conocida y a la que se le adiciona algún ingrediente en mayor cantidad como aceites vegetales o manteca de cerdo. Este tipo

de dietas supondría una ventaja, pues al conocer la composición basal de la dieta, teóricamente solo se tendría que calcular la cantidad de calorías que aporta el ingrediente en exceso.

Por ejemplo, puede elaborarse una dieta hipercalórica agregando a la croqueta tipo Chow las grasas o carbohidratos deseados. Sin embargo, al agregar componentes al alimento, varía la proporción total de nutrientes por lo que es necesario recalcular las proporciones finales. Más aún, la mezcla puede no ser totalmente homogénea lo que presenta dificultades al momento en que el animal la consume de tal forma que no es posible conocer con total exactitud la cantidad y tipo de nutrientes que toma el animal cuando se alimenta [50]. Existe poca literatura sobre la utilización de dietas hipercalóricas (DH) realizadas a partir de la croqueta tipo Chow, sin embargo, la utilización de este tipo de dietas supone una ventaja adicional ya que son relativamente fáciles de elaborar y los costos suelen ser más bajos a los de las dietas elaboradas ingrediente a ingrediente

A pesar de que las dietas hipercalóricas pueden emular los efectos de la mala alimentación y los desórdenes metabólicos en humanos, regularmente se utilizan en combinación con las otras dos técnicas previamente descritas (animales monogénicos o tratamiento farmacológicos) con el fin de potenciar las alteraciones al metabolismo.

Aunque el principal uso de las dietas hipercalóricas es el estudio de los desórdenes metabólicos generados a partir de la obesidad, también se han estudiado en el desarrollo de anomalías en el sistema inmunológico [36,42].

Uno de los principales efectos de la alimentación con DH es la generación de obesidad. En la década de 1950 se asoció a la obesidad visceral con la resistencia a la insulina y con el desarrollo de un estado inflamatorio de bajo grado a nivel sistémico del cual se conocía muy poco [53]. Sin embargo, actualmente se propone que uno de los mecanismos por los cuales la obesidad visceral está

asociada con el desarrollo de la inflamación, es debido a la hipertrofia e hiperplasia que se genera en los adipocitos a causa de la acumulación excesiva de reservas energéticas [39, 41].

La expansión del tejido adiposo aumenta la demanda de oxígeno, el cual no puede ser suplido, en consecuencia los adipocitos exhiben un estado de apoptosis y aumentan la liberación de adipocinas (Leptina, Resistina, Adiponectina), las cuales tiene efectos en la regulación del metabolismo y sobre las células del sistema inmunológico [43, 52, 53].

Dentro del tejido adiposo se genera un estado de inflamación local que secreta quimio atrayentes reclutando macrófagos al tejido adiposo, donde promueven el aclaramiento del tejido eliminando a los adipocitos en estado apoptótico, esto genera que se sigan liberando citocinas pro-inflamatorias que afectan a los adipocitos vecinos reforzando el estado de inflamación y la infiltración celular.

Se ha observado que el fenotipo predominante en los macrófagos que se infiltran en el tejido adiposo es del tipo M1 o “fenotipo activado”, el cual tiene actividad pro-inflamatoria, mientras que el fenotipo de los macrófagos residentes es de tipo M2 o “alterno” con actividad antiinflamatoria [52, 53].

La infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo se ha postulado como la causa de que en los animales obesos se observen elevadas las citocinas pro inflamatorias TNF- α e IL-6, además de que los niveles elevados de TNF- α están relacionados con la resistencia a la insulina y la generación de diabetes [44, 46, 48].

En ratones diabéticos (DM2) se ha descrito que presentan anomalías significativas en el reclutamiento celular cuando existe infección con *M. tuberculosis*. Principalmente se ha visto afectada la migración de los de linfocitos T del nódulo linfático al pulmón, además de presentar una

baja producción de INF- γ y una reducida concentración de quimio atrayentes como CCL2 y CCL5 comparado con ratones no diabéticos [34,35].

Un hecho interesante es que los machos son más susceptibles a la liberación de citocinas pro inflamatorias en la obesidad, pues se ha visto en estudios realizados en hembras, que aunque desarrollen obesidad existe una liberación de citocinas antiinflamatorias que mantiene en equilibrio al organismo [39].

Se propone que la resistencia de las hembras a desarrollar problemas a causa de una alimentación con dieta hipercalórica es resultado de la diferencia hormonal, ya que en otros estudios realizados con hembras ovariectomizadas (extracción de los ovarios) existe un aumento en la producción de IL-6 y adiposidad central semejante a lo que se observa en los ratones machos [40].

Aunque no sea el tema de estudio de esta tesis es importante mencionar que dentro del universo de las alteraciones metabólicas que se pueden presentar cuando se suministra una DH, están las relacionadas con la desnutrición, pues el hecho de que un elemento de la dieta esté en mucho mayor proporción que los demás, podría causar que todos los demás elementos se encuentren de alguna forma “diluidos” y, si es el caso, la ingesta limitada de estos nutrientes podría generar desnutrición, ya sea del tipo severa, moderada o leve.

Hoy en día se han estudiado varias de las repercusiones que tienen los diferentes tipos de desnutrición sobre el sistema inmunológico y se ha encontrado que el tipo de afectación depende directamente del tipo de deficiencia nutricional que se presente en el organismo. Se sabe por ejemplo que la deficiencia en la vitamina A afecta de manera directa las uniones estrechas de la mucosa intestinal causando un debilitamiento en la barrera intestinal provocando que haya mayor

invasión de patógenos intestinales. Esta deficiencia también va acompañada de una reducción en la expresión de citocinas como: IL-10, IL-4, IL-6 y IFN- γ [57].

También se conoce que en la desnutrición severa existe una reducción en la función fagocitaria de los macrófagos, así como, una alteración en la actividad de los neutrófilos e incluso en los linfocitos NK (natural killer). También se ha encontrado una disminución en la capacidad del sistema de respuesta de estas células para producir citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α [56].

El principal elemento de la respuesta inmunológica que se ve afectado cuando existe algún tipo de desnutrición es el macrófago. Se sabe por ejemplo que en una desnutrición severa de tipo calórico-proteico, la capacidad fagocitaria del macrófago está disminuida al igual que la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , INF- γ e IL-6 [60]. También se conoce que en este tipo de desnutrición hay menor expresión de TLR4/MD2 y CD14 que son los receptores para lipopolisacáridos (LPS) lo que significa una disminución en la capacidad efectora de las células.

También se ha visto que los macrófagos al ser obtenidos de animales con desnutrición calórico proteico son propensos a apoptosis en presencia de TNF- α e INF- γ , ya que presentan menor expresión de Bcl-2 y PKC que son factores de la transcripción asociados a mecanismos antiapoptóticos [68, 59,61].

Un efecto similar al descrito anteriormente, se ha observado cuando existe deficiencia de zinc y cobre, pues ambos metales poseen actividad inmunomoduladora y son fundamentales para el desarrollo del timo [54,55].

Datos experimentales sugieren que el incremento en la expresión de Zip2 (Slc39A2) que es un transportador de Zinc de las células inmunológicas está estrechamente asociado con la respuesta

inmunológica de pacientes con tuberculosis pulmonar. Esto sugiere que el gen de Zip2 posiblemente tenga un papel crucial en el control de la infección con *M. tuberculosis* al promover la respuesta bactericida de los macrófagos [54,55].

Justificación

La creciente pandemia a nivel mundial de desórdenes metabólicos y su estrecha relación con el desarrollo de la tuberculosis hace evidente la necesidad de estudiar a ambas patologías en conjunto, abordando el problema desde la perspectiva del efecto que tiene la alimentación con dietas altas en calorías, ampliamente difundidas en los países industrializados y países en vías de desarrollo, sobre el sistema inmunológico y los mecanismos específicos que predisponen al padecimiento de la TB activa.

Hipótesis

En la infección con *M. tuberculosis* el progreso de la enfermedad activa depende en gran medida de que los mecanismos de la inmunidad innata estén en buenas condiciones para responder al reto de la infección. Si la alimentación con una dieta hipercalórica, cuya composición proviene principalmente de grasas de animales, tiene un efecto sobre el funcionamiento del sistema inmunológico entonces los patrones en el desarrollo de la enfermedad se verán alterados.

Hipótesis alternativa

Si la dieta hipercalórica no supone ningún efecto en el sistema inmunológico entonces el patrón de progresión de la enfermedad no tendrá diferencias en los animales que sean alimentados con la dieta de mantenimiento y la dieta hipercalórica.

Objetivo principal

- Evaluar el efecto que tiene la alimentación de una dieta hipercalórica en la progresión de la tuberculosis pulmonar en un modelo murino de la cepa BALB/c.

Objetivos secundarios

1. Evaluar el efecto de la dieta hipercalórica en el metabolismo
2. Evaluar si la dieta hipercalórica provoca obesidad
3. Evaluar si la dieta hipercalórica provoca cambios en la concentración de colesterol total, triglicéridos y glucosa en sangre periférica
4. Evaluar si la dieta hipercalórica provoca desnutrición severa de tipo calórico proteica
5. Evaluar el efecto de la dieta hipercalórica en el sistema inmunológico de los ratones infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* mediante:
 - Datos de sobrevida
 - Carga bacilar por UFCs en pulmón, bazo e hígado
 - Daño histopatológico en pulmón, hígado y timo
 - Expresión de citocinas por RT-PCR en tiempo real en pulmón

Materiales y Métodos

Medidas de seguridad

Todos los procedimientos para la generación y utilización de micobacterias se realizaron dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones de la sección de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (NCMNSZ). Antes y después de cada procedimiento, las superficies de trabajo, todo el material y los desechos que tuvieron contacto con micobacterias fueron inactivados con Clidox™, metodología ya estandarizada en el laboratorio, además de portar en todo momento, guantes, pijama quirúrgica, cofia, zapatones y máscara cubre bocas grado 100.

Para la realización del experimento se requirieron de 60 ratones machos de la cepa BALB/C con tres semanas de edad y de un peso aproximado de 17 g, los cuales fueron proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INNCMSZ.

Tabla 1. Distribución de los animales en los grupos de experimentación

| Grupo experimental | # de Ratones |
|---------------------------------|---------------------|
| CTRL “Dieta Chow” | n=23 |
| DH “Dieta Hipercalórica” | n=37 |

Alojamiento de los animales

Los animales fueron alojados en un sistema de microaisladores con flujo constante y filtración de aire que garantiza que no hay intercambio de aire entre cajas ni con el medio exterior. La cantidad de

animales por contenedor fue de 5 siguiendo el lineamiento para el alojamiento publicado en la NOM-062-ZOO-1999.

Preparación del alimento para la dieta hipercalórica

La dieta hipercalórica fue implementada a partir de la dieta de mantenimiento PicoLab® Rodent Diet 20 5053 que se utilizó como dieta control (CTRL).

El alimento para la dieta hipercalórica (DH) se preparó a partir de mezclar 1kg de PicoLab® Rodent Diet 20 5053 y 1kg de manteca de cerdo fundida, más 150g de Bacto Agar™ hidratado con 100 ml de agua.

Brevemente, se molió un kilogramo de croquetas tipo Chow (PicoLab® Rodent Diet 20 5053) hasta obtener un pulverizado fino con pedazos que no fuesen mayores a 0.5 mm de diámetro. El pulverizado fue vertido junto con un kilogramo de manteca de cerdo previamente fundido a una temperatura aproximada de 60°C. Se utilizó una mezcladora de 5L de movimiento planetario Hobart modelo H-3841 para mezclar el pulverizado con la manteca hasta obtener una consistencia semilíquida y homogénea. Después se agregaron 150 gr de Bacto Agar™ hidratado con 100 ml de agua destilada. Una vez que la mezcla adquirió una consistencia homogénea se prepararon bolas de alimento de aproximadamente 10 cm de diámetro las cuales se dejaron reposar a temperatura ambiente durante un día completo; después se refrigeraron durante 2 días a 6°C antes de ser suministrados a los animales. Con este método de preparación, la concentración de los nutrientes del alimento comercial quedó a un 50% de la concentración original, incluyendo la cantidad de proteína. Por su parte, la cantidad de grasa en este alimento fue equivalente al doble.

***Este procedimiento se realizó cada semana para evitar la rancidez de la dieta**

El experimento consistió en alimentar a un grupo de animales con dieta hipercalórica durante cuatro semanas y después retarlos con *M. tuberculosis* para generar tuberculosis pulmonar y observar la progresión de la enfermedad.

Esquema general de distribución de los grupos y sacrificios

Esquema general

| Primer Mes | Segundo Mes | Tercer mes |
|---|---|------------------------------------|
| Inducción a alteraciones metabólicas con el suministro de dieta hipercalórica y dieta Chow * Medición de los parámetros bioquímicos <ul style="list-style-type: none"> • Colesterol • Triglicéridos • Glucosa | Reto con H37Rv y cinética de sacrificios y Obtención de muestras. Cinética días 1, 3, 7, 14, 21, 28 CTRL "Chow" = 3/por sacrificio DH "D. Hipercalórica" = 5/ por sacrificio | Último día de sacrificio Día 60 |

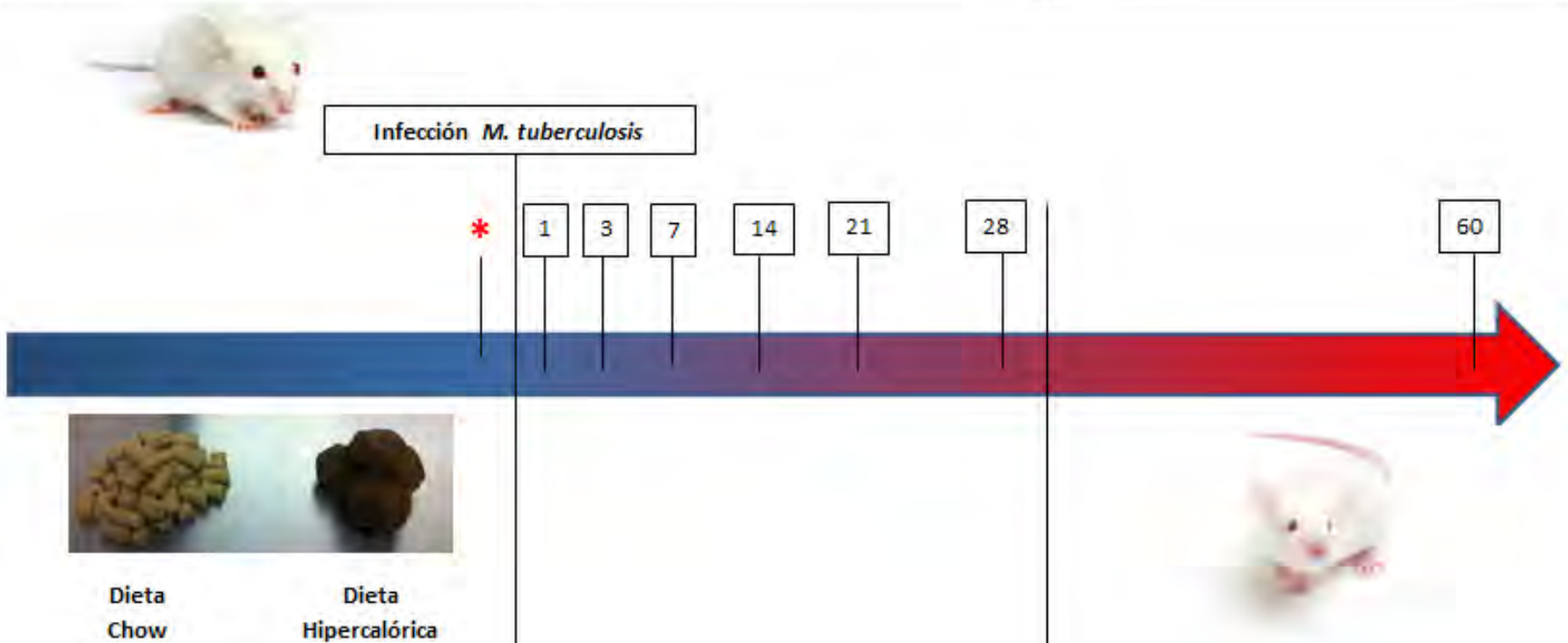


Figura 3. Descripción gráfica del procedimiento general de trabajo

Determinación del peso y la sobrevida

El peso de los ratones fue medido semanalmente, comenzando el día en que fueron entregados y hasta finalizar con el experimento. Para esto fue necesaria la utilización de una balanza Ohaus®. Para el pesaje el ratón se colocó sobre la balanza, se esperó tres segundos y luego el peso correspondiente se anotó en los formatos designados.

La sobrevida, en ambos grupos, fue evaluada tomando el número de defunciones causadas por la infección a partir de inoculación con la cepa H37Rv.

Determinación de las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, glucosa en sangre y albumina en suero

Después de cuatro semanas de recibir el alimento control o experimental se midieron las concentraciones de colesterol total, triglicéridos y glucosa. Los animales fueron puestos en ayuno 6 horas antes de realizar las mediciones las cuales se llevaron a cabo a la mañana siguiente del ayuno. Se emplearon tiras reactivas y los equipos de medición Accutrend® Plus y Acchek® que actúan midiendo la intensidad del color producido en la capa de la tira reactiva a través de fotometría de reflectancia.

El primero equipo mide colesterol total y triglicéridos y el segundo glucosa. Para la medición se utilizó una gota de sangre de cada ratón y los resultados se presentan en unidades de mg/dL o mmol/L. La sangre se obtuvo mediante una punción en la punta de la cola sin anestesia.

La determinación de albúmina en suero se realizó por un método colorimétrico que utiliza verde de bromocresol.

Infección

Para la infección con *M. tuberculosis*, los animales fueron anestesiados con vapor de sevoflurano (100 uL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm. La inoculación fue vía intratraqueal (v.it.) para lo cual los animales se colocaron sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetaron los incisivos con una liga de caucho, posteriormente por la vía traqueal se les introdujo una cánula (de calibre 22G x1.0" w/ de punta roma de 1.25 mm) para infectarlos con 2.5×10^5 UFC de la cepa tipo H37Rv de *M. tuberculosis*, suspendida en un volumen de 100 μ l de buffer de fosfatos salino (PBS).

*Las bacterias utilizadas para la infección fueron extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. La pureza del aislado se corroboró mediante la tinción para bacterias ácido alcohol resistentes Ziehl-Neelsen.

Sacrificio de animales

Para estudiar la evolución de la enfermedad pulmonar y su relación con el suministro de una dieta hipercalórica los ratones se sacrificaron los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 post infección. Al momento del sacrificio los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 29 mg/kg y sacrificados por exanguinación. De cada individuo se obtuvo por disección ambos pulmones, bazo, hígado, músculo esquelético, timo, e intestino.

El pulmón derecho de los individuos fue perfundido intra-traquealmente con aproximadamente un mililitro de etanol absoluto para obtener una adecuada expansión alveolar y se conservaron en alcohol absoluto junto con los demás órganos para su posterior análisis histológico. El pulmón izquierdo, el bazo, el lóbulo de mayor tamaño del hígado, la mitad del timo y los sueros de los

ratones de cada grupo, se congelaron inmediatamente pos disección en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C en un ultra-congelador REVCO® hasta su procesamiento.

Unidades formadoras de colonia en pulmón, bazo e hígado.

Previo al procedimiento, las muestras fueron transferidas una hora antes del ultra-congelador REVCO® a -80° C a un congelador a -20°C.

El procedimiento en los tres tejidos fue similar y solo hubo pequeñas variaciones en el protocolo.

Pulmón

Las muestras de pulmón fueron homogenizadas en frío de forma mecánica con perlas de sílice y zirconio en el equipo MP Fast Prep24® con un ciclo de 20s y después suspendidas en 300 µl de buffer solución PBS-tween al 0.05%.

Para extraer el RNA total, de cada muestra se tomaron 150 µl llevados a un volumen final de 500 µl con buffer RLT (RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Mexico) y posteriormente refrigeradas a -70°C.

Los 150 µl restantes fueron llevados a un volumen final de 1 ml con solución PBS-tween al 0.05%.

Las muestras fueron nuevamente homogenizadas en el equipo MP Fast Prep24® en dos ciclos de 20s. Se tomaron 30 µl de cada muestra y se hicieron diluciones seriadas con factor de 10 en una placa de 96 pozos (los días 1,3 y 7 se llevaron hasta -3 diluciones mientras que los días 14, 21, 28 y 60 fueron llevados hasta -4 diluciones). Por último, se tomaron 10 ul de cada dilución para sembrar en placas Petri con medio midelbrock 7H10 (Difco) enriquecido con OADC (ácido oleico, albumina,

dextrosa y catalasa, Becton Dickinson). Las cajas permanecieron en la incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ y el conteo de las UFC se realizó a los días 14 y 21 después de la siembra.

UFC de hígado

El procedimiento para procesar las UFC en hígado fue muy similar al realizado en las muestras del pulmón, sin embargo en este caso no se tomaron muestras para realizar RT-PCR además de que previo a la homogenización los lóbulos fueron pesados en una balanza analítica.

Los lóbulos se llevaron a un volumen final de 1 ml con solución PBS-tween 0.05 y a partir de este punto, las muestras siguieron el mismo procedimiento que el realizado para los pulmones, la única diferencia fue que todas las muestras fueron llevadas hasta la dilución -4.

UFC de bazo

El mismo procedimiento que se aplicó en las UFC de hígado se realizó en las muestras de bazo.

Extracción de RNA, RT y PCRq en las muestras de pulmón

A las muestras previamente homogenizadas y mantenidas en congelación se les extrajo RNA con ayuda del RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Mexico). La calidad y cantidad de RNA se evaluó mediante espectrofotometría (260/280) por Nanodrop (Thermo Scientific) y mediante un gel de agarosa.

La retrotranscripción del RNAm se realizó utilizando 100ng de RNA, oligo -dT y Omniscript Kit (Qiagen, México).

Tabla 2. Relación de la cantidad de elementos para cada reacción de transcripción inversa.

| Componentes | Volumen/reacción 25µl de volumen final para cada muestra. |
|---|--|
| Master Mix | |
| 10X Buffer RT | 2.5 µl |
| dNTP Mix (5mM de cada dNTP) | 2.5 µl |
| Oligo dT Primer | 2.5 µl |
| RNase inhibitor | 1 µl |
| Omniscript Reverse Transcriptase | 1 µl |
| RNase-Free wáter | *Variable por muestra |
| Template RNA | *Variable por muestra |

*La cantidad de muestra template y la cantidad de agua libre de RNAasas depende de la concentración original de RNA en la extracción y el ajuste subsecuente para llevar a todas las muestras a 100ng/ μ l volumen de reacción.

PCRq o tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó empleando el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) y se cuantificó utilizando Quantitech Sybr Green Master Mix (Qiagen). Para cuantificar el número de copias se utilizó una curva estándar y los primers específicos para las citocinas (GAPDH, TNF- α , iNOS e INF- γ) se diseñaron utilizando el programa Primers Express (Applied Biosystem).

Tabla 3. Relación de los componentes y cantidad de cada uno de los elementos empleados en la PCRq.

| Componentes | Volumen/reacción 25μl de volumen final para cada muestra. |
|-------------------------|---|
| Master Mix | |
| SYBER Green® | 12.5 μl |
| Primer (forward) | 0.5 μl |
| Primer (revers) | 0.5 μl |
| Template DNA | 1 μl |

Se realizó la RT-PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos con una Tm específica para cada primer. El número de copias de cada citocina se normalizó a un millón de copias de RNAm del gene constitutivo GADPH.

Tabla 4. Secuencia de Primers utilizados.

| Primers | Forwar | Reverse |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| TNFα | 5'-TCGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3' | 5'-TTGAGATCCATGCCGTTGG-3' |
| INFγ | 5'-GCTGACATGAAAATCATGCAG-3' | 5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3' |
| iNOS | 5'-CGC TGG CTA CCA GAT GCC CG-3' | 5'-GCC ATA GCG GGG CTT CCA GC-3' |

Análisis histológico

Los tejidos destinados para histología (pulmón, lóbulo mayor del hígado, timo y músculo) fueron fijados en etanol absoluto durante veinticuatro horas y embebidos en parafina. Los pulmones se dividieron con un corte longitudinal a través del hilio pulmonar. El análisis histo-morfológico del pulmón e hígado se realizó por medio de una tinción de hematoxilina-eosina en cortes de 4 μ m de grosor. El porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía y el número de granulomas en pulmón e hígado, fue determinado con un analizador de imágenes automatizado.

Resultados

El primer parámetro a evaluar durante el experimento fue la variación en el peso de los animales. Los animales que fueron alimentados con la dieta hipercalórica (DH) mantuvieron un peso similar a los ratones alimentados con la dieta de mantenimiento (CTRL) hasta la cuarta semana, momento en el cual ambos grupos fueron infectados con *M. tuberculosis*.

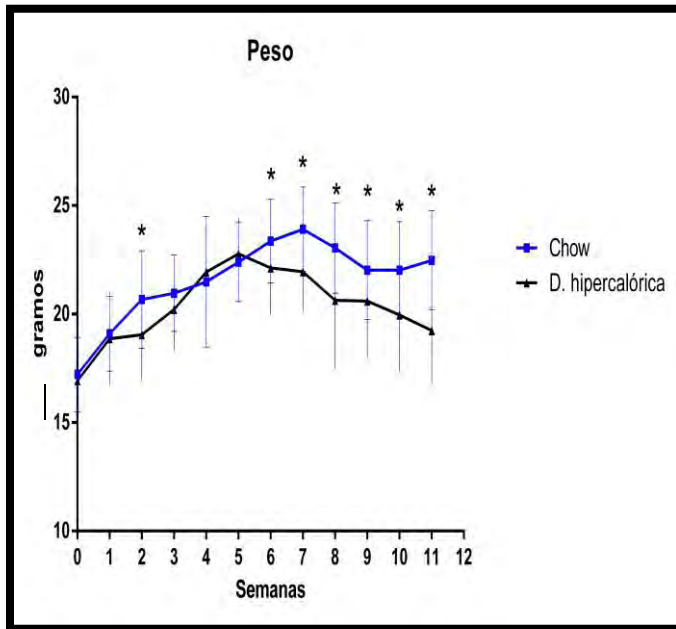
Tras la infección, los animales con DH siguieron aumentando de peso a la par de los animales CTRL hasta llegar a la sexta semana donde se observó un descenso progresivo en el peso de los animales con DH que se mantuvo hasta finalizar el experimento.

El peso de los animales CTRL mostró un aumento constante durante las siguientes tres semanas después de la infección hasta llegar a la séptima semana en donde se observa un descenso en peso que no llega a ser tan drástico como el observado en los animales con DH.

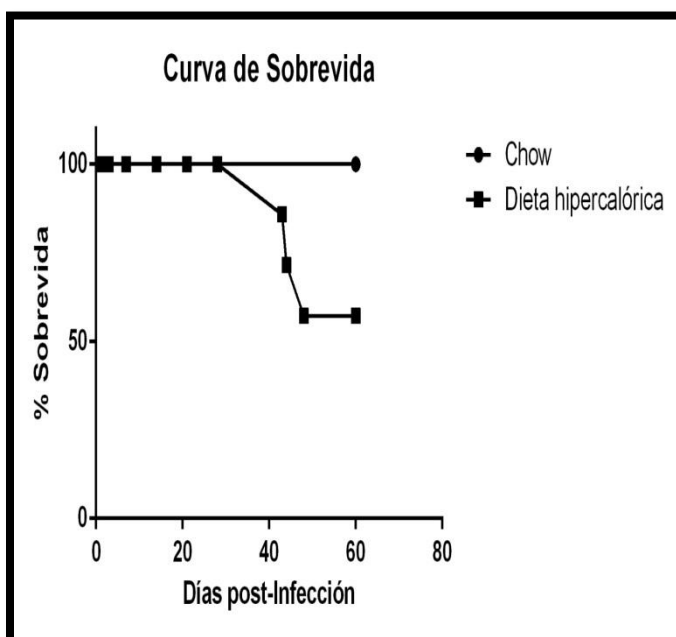
Al finalizar el experimento (día 60) los animales con DH pesaban 15% menos que los animales CTRL, una diferencia significativa (**Gráfica 1**).

En los días de sacrificio, se observó si los animales presentaban tejido adiposo subcutáneo y epididimal. En ambos grupos se observó acumulación de estos tejidos sin diferencias aparentes. Sin embargo, a las 12 semanas (día 60) en los animales con DH no se observó tejido adiposo de ningún tipo, mientras que en los animales CTRL sí, lo que sugiere que las reservas energéticas fueron consumidas totalmente en los animales con DH. La supervivencia de los animales fue evaluada mediante el estimador no paramétrico Kaplan-Meier [85] el cual permite realizar gráficas de supervivencia (**Gráfica 2**). En la gráfica se observa que los animales alimentados con DH comienzan a morir a partir de los 40 días post infección y, al finalizar el experimento, tienen un 62.7% de probabilidades

de sobrevivir, mientras que los animales CTRL mantuvieron el 100% de sobrevivencia hasta finalizar el experimento.



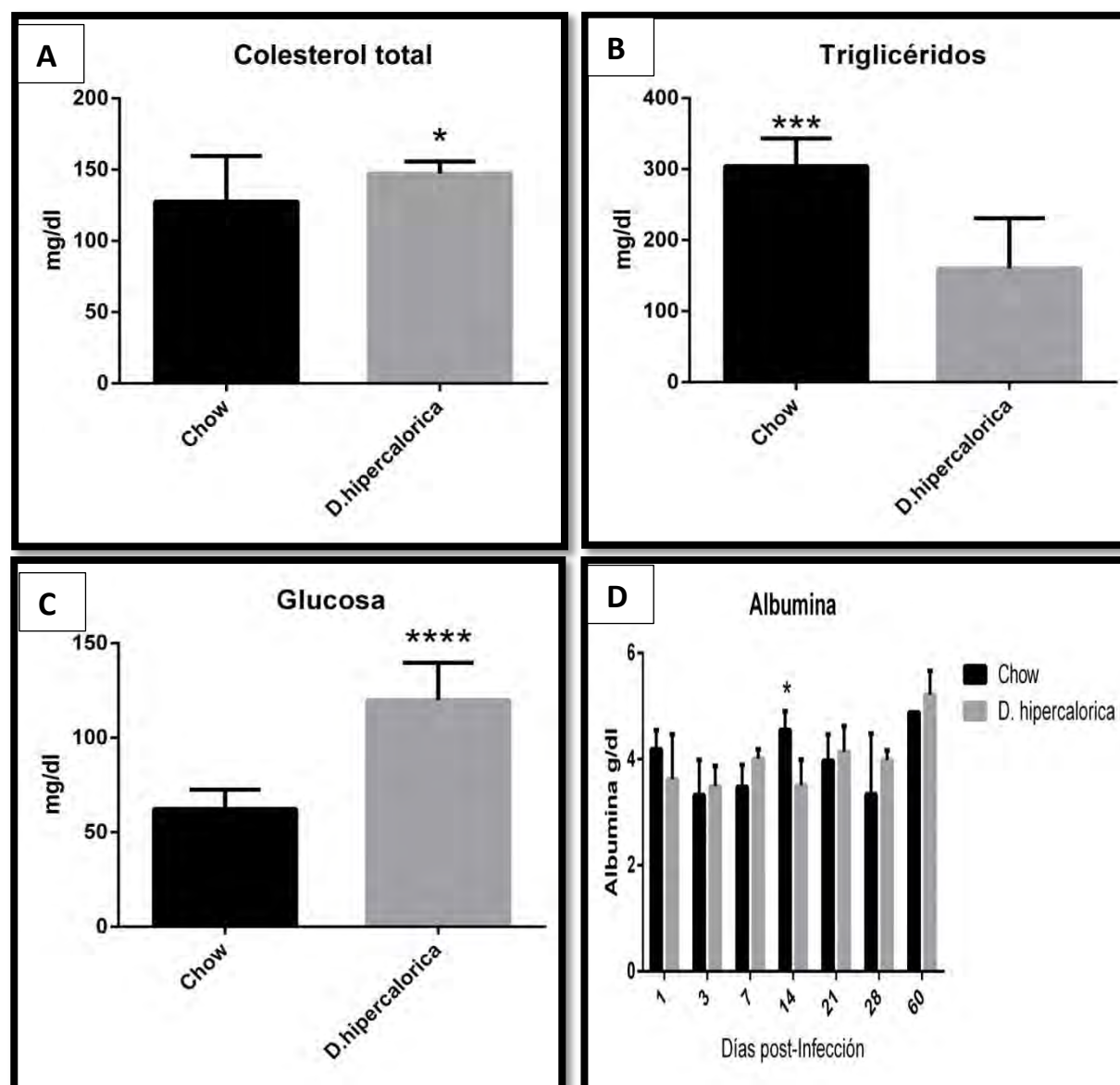
Gráfica 1. Media \pm DS. Peso semanal. Los animales fueron infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* a la cuarta semana. Animales controles con dieta tipo Chow "CTRL" (cuadro) y animales alimentados con dieta hipercalórica "DH" (flecha). (*) Análisis por $-t$ student para muestras no pareadas con nivel de significancia de ($P < 0.05$).



Gráfica 2. Sobrevivencia. Animales controles alimentados con dieta tipo Chow "CTRL" $n=23$ y ratones alimentados con dieta hipercalórica "DH" $n=37$. La sobrevivencia fue evaluada mediante el estimador no paramétrico Kaplan-Meier. Análisis test Log-rank Mantel-Cox ($P < 0.05$). $P=0.0082$, diferencia significativa**.

La concentración de triglicéridos, colesterol total y glucosa en sangre fue medida al concluir las primeras cuatro semanas con dieta y previo a la infección. La concentración de colesterol total en los animales con DH fue mayor en comparación con los animales CTRL (**Gráfica 3A**). De igual manera la concentración de glucosa en sangre fue mucho mayor en los animales con DH que en los animales CTRL (**Gráfica 3C**). Sin embargo, la concentración de triglicéridos en los animales CTRL es mayor que en los de DH (**Gráfica 3B**).

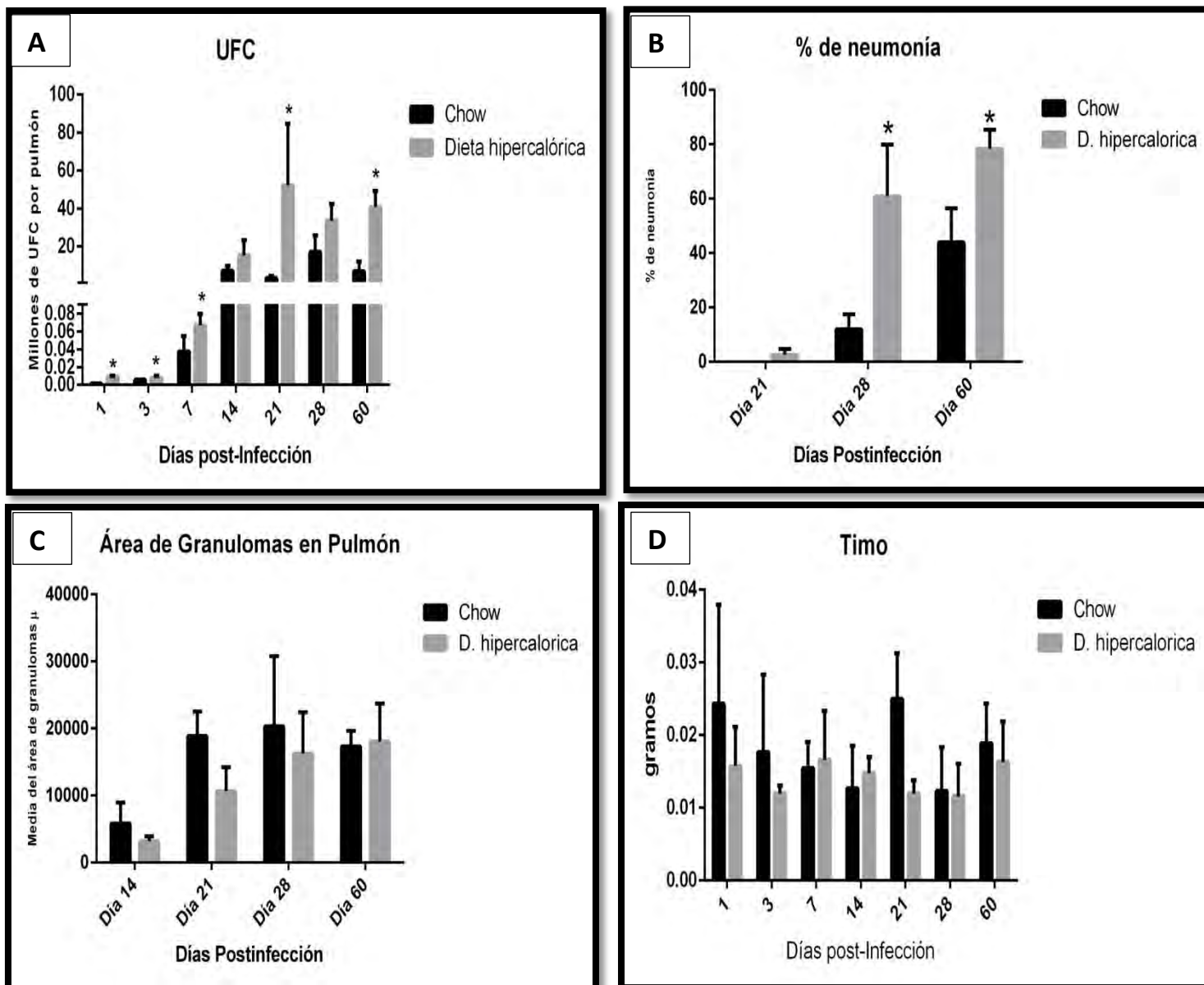
Debido a que la determinación de la concentración de albumina utiliza 20µl de suero, esta solo fue posible medirla en los días de sacrificio, donde se recolecto la sangre suficiente para obtener este volumen de suero necesario. La concentración de la proteína en suero parece no variar a lo largo del experimento, de igual manera, los animales alimentados con DH no exhiben una menor concentración de esta proteína si se comparan con los animales CTRL. (**Gráfica 3D**)



Gráficas 3. Concentración de colesterol total (A), triglicéridos (B) y glucosa (C) en sangre tomados después de un mes con dieta hipercalórica (DH) o dieta control (CTRL) y previo a la infección. Concentración de albumina en suero colectado en los días de sacrificio indicados (D). Media \pm DS. Ratones sin infectar y con un mes de dieta hipercalórica. Las barras negras pertenecen a los animales que recibieron dieta control tipo Chow y las barras grises a los ratones con dieta hipercalórica. De tres a cinco animales por grupo. (*) Análisis por t student para muestras no pareadas con nivel de significancia de ($P < 0.05$).

Para evaluar la progresión de la TB se tomaron en cuenta tres parámetros: (1) unidades formadoras de colonias (UFC), (2) la formación de granulomas en pulmón y (3) el porcentaje de áreas neumónicas.

En el caso de los animales con DH observamos que poseen una mayor carga bacilar en pulmón en comparación con los animales CTRL (**Gráfica 4A**). Esta relación se mantiene a lo largo del experimento, siendo el día 21 pos-infección en donde se obtiene la carga bacilar más elevada en ambos grupos. Los animales CTRL mantienen una carga bacilar constante a partir del día 21 hasta llegar al día 60, correlacionando con la carga bacilar del pulmón el porcentaje de neumonía es mayor en los animales con DH. En el día 28 se observa un aumento constante de áreas neumónicas que se mantiene hasta el final del experimento en ambos grupos con diferencias significativas y áreas mayores en los ratones con dieta DH. La neumonía es propuesta como la causa principal de muerte en la TB. De manera inversa la formación de granulomas en los animales con DH parece ser menor que en los animales CTRL aunque no fue posible mostrar significancia. Como se mencionó en los antecedentes, el granuloma es la estructura principal de protección en contra de *M. tuberculosis*. En estas estructuras se reclutan grandes cantidades de células del sistema inmunológico que participan en la eliminación y contención de la bacteria y se postula que al no existir una correcta formación del granuloma, la diseminación y progresión de la enfermedad se ve favorecida. El timo es un órgano inmunológico primario necesario para el buen funcionamiento para la formación de linfocitos T el cual se ha reportado que puede estar dañado en situaciones donde hay una mala nutrición, en este caso podría haberse atrofiado debido a la ingesta hipercalórica, sin embargo, aunque se observan variaciones en el peso de este órgano en los animales en ambos grupos, no se puede establecer ninguna tendencia.



Gráficas 4. Media \pm DS. Animales infectados por vía intratraqueal con trecientas veintimil bacterias de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv. De tres a cinco animales por grupo. Las barras negras pertenecen a los animales que recibieron dieta control tipo Chow. Las barras grises pertenecen a los animales alimentados con la dieta hipercalórica. Unidades formadoras de colonia por pulmón (UFC) (A). Media del área de granulomas por pulmón. Porcentaje de neumonía por pulmón (B). (C) Peso del timo a los diferentes tiempos de sacrificio (D). (*) Análisis por t student para muestras no pareadas con nivel de significancia de ($P < 0.05$).

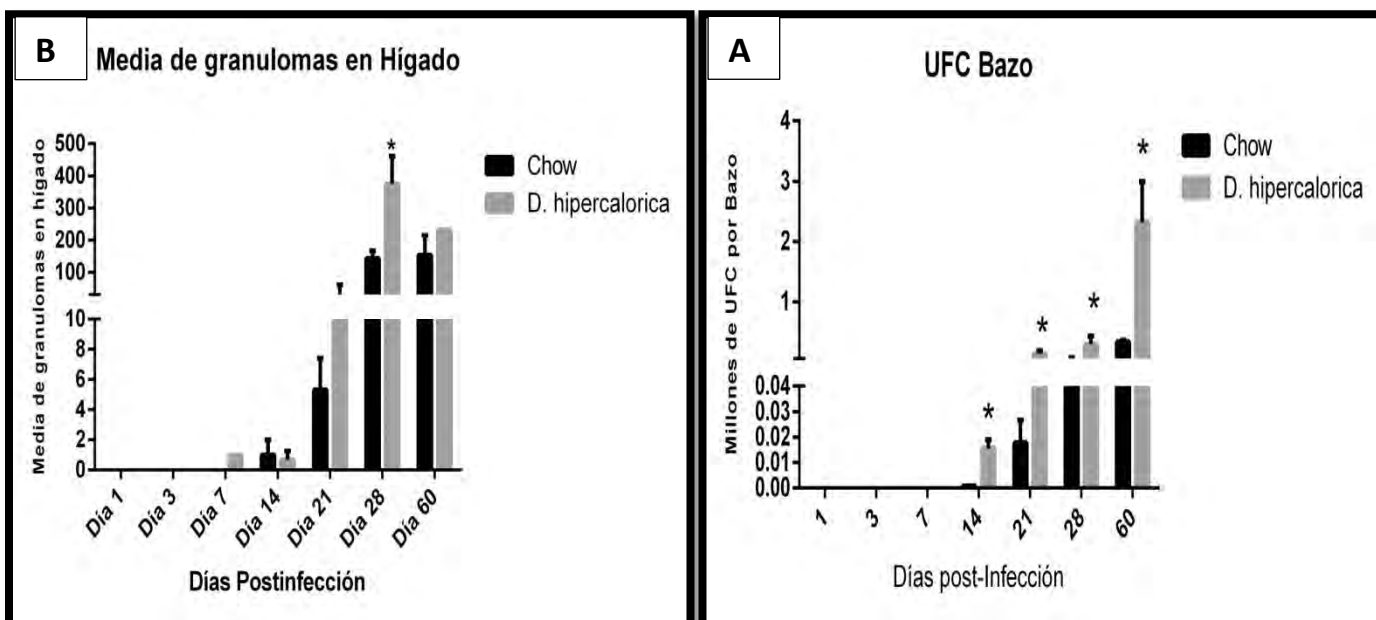
Para conocer el grado de diseminación del bacilo en el organismo, se realizaron UFC de bazo e hígado y se contabilizaron los granulomas en el lóbulo mayor de este último. Los resultados de las UFC en hígado son presentados en forma de tabla (**Tabla 4**).

En los animales con DH hay aparición de bacilos al día 7 y mantienen una carga bacilar elevada en este órgano, de hecho, la carga bacilar en el hígado de los animales con DH es tan grande que a partir del día 21 ya no se pueden contabilizar las UFCs, esto no ocurre con la carga bacilar de los animales CTRL, en donde existe presencia de bacilos al día 14 pos infección, es decir, una semana después que en los animales con DH. De igual manera la carga bacilar aumenta conforme las semanas avanzan, sin embargo, nunca llegan a ser incontables como en el caso de los animales con DH. La media de los granulomas en el hígado es mayor en los animales con DH, aunque solo en el día 28 existen diferencias significativas (**Gráfica 5 B**).

Las UFC en el bazo demostraron que hay una diseminación exitosa al día 14 para ambos grupos con un marcado aumento en la carga bacilar de los animales con DH hasta el día 60 pos-infección donde se observa un aumento drástico en la cantidad de UFCs en los animales con DH, mientras que los animales CTRL mantiene una carga bacilar constantes del día 28 al 60 (**Gráfica 5 A**).

Tabla 4. Media de la carga bacilar por gramo de Hígado. Grupos de 3 a 5 animales. Diluciones 1 en 10

| <i>Tipo de dieta</i> | <i>Día 1</i> | <i>Día 3</i> | <i>Día 7</i> | <i>Día 14</i> | <i>Día 21</i> | <i>Día 28</i> | <i>Día 60</i> |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Dieta Chow | 0 | 0 | 0 | 438 | 563 | 7703 | 15907 |
| Dieta Hipercalórica | 0 | 0 | 17 | 2030 | Incontable | Incontable | Incontable |



Gráfica 5. Media \pm DS. Media de granulomas en hígado (**A**). Unidades formadoras de colonia en Bazo (**B**). Animales infectados por vía intratraqueal con trecientas veinte mil bacterias de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv. De tres a cinco animales por grupo. Las barras negras pertenecen a los animales que recibieron dieta control tipo Chow. Las barras grises pertenecen a los animales alimentados con la dieta hipercalórica. En los días uno, tres y siete no hubo crecimiento de UFC en Bazo (*) Análisis por t student para muestras no pareadas con nivel de significancia de (P < 0.05).

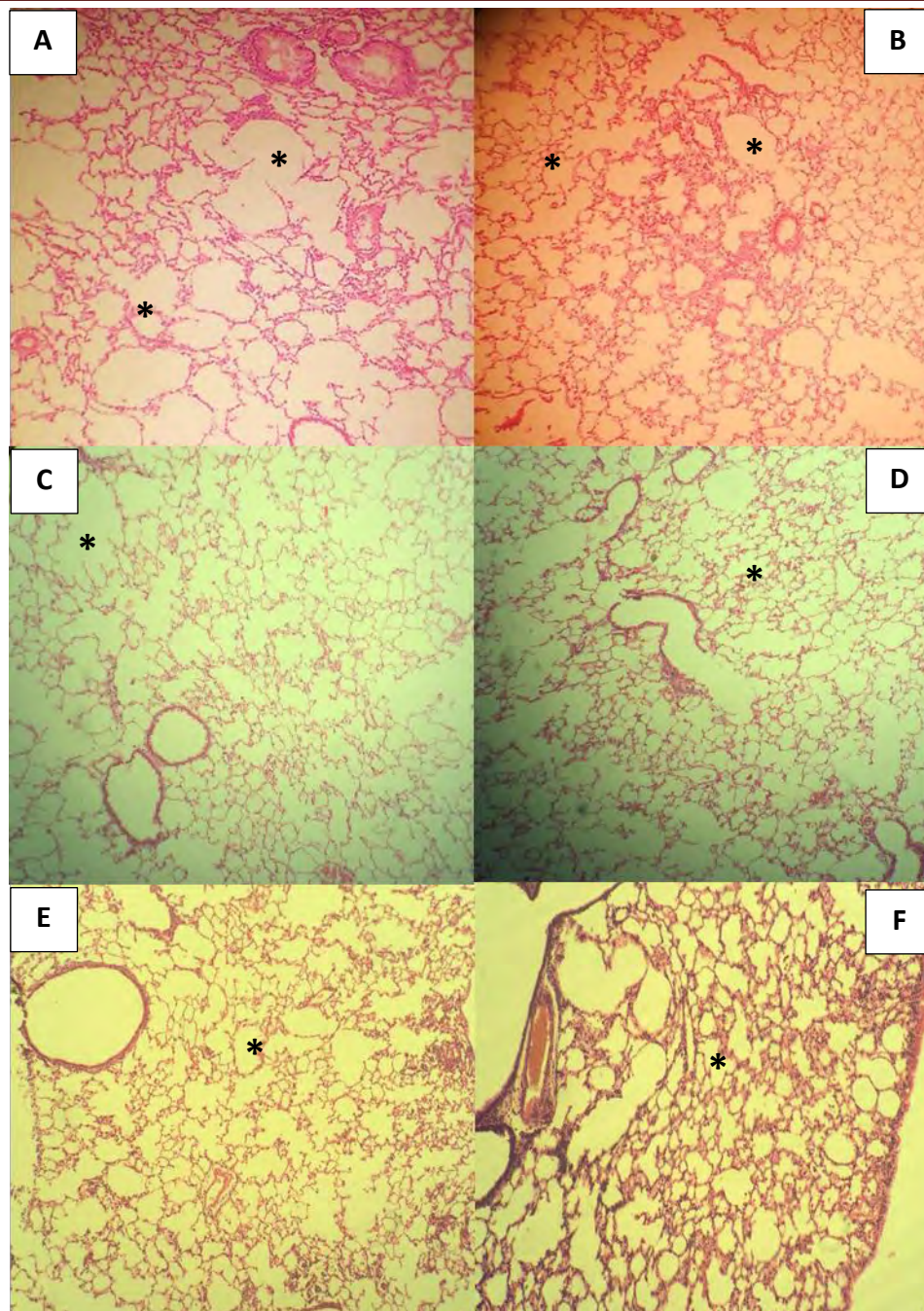


Figura 4. Corte histológico parénquima pulmonar ratones infectados con *M. tuberculosis H37Rv*. Tinción Hematoxilina- Eosina microscopio óptico 40X. **A)** Pulmón CTRL primer día pos infección. **B)** Pulmón DH Primer día pos infección. **C)** día 7 pos infección CTRL. **D)** Día 7 pos infección DH. **E)** Día 14 pos infección CTRL. **F)** Día 14 pos infección DH. (*) Espacio alveolar. (+) Área neumónica. (†) Granuloma.

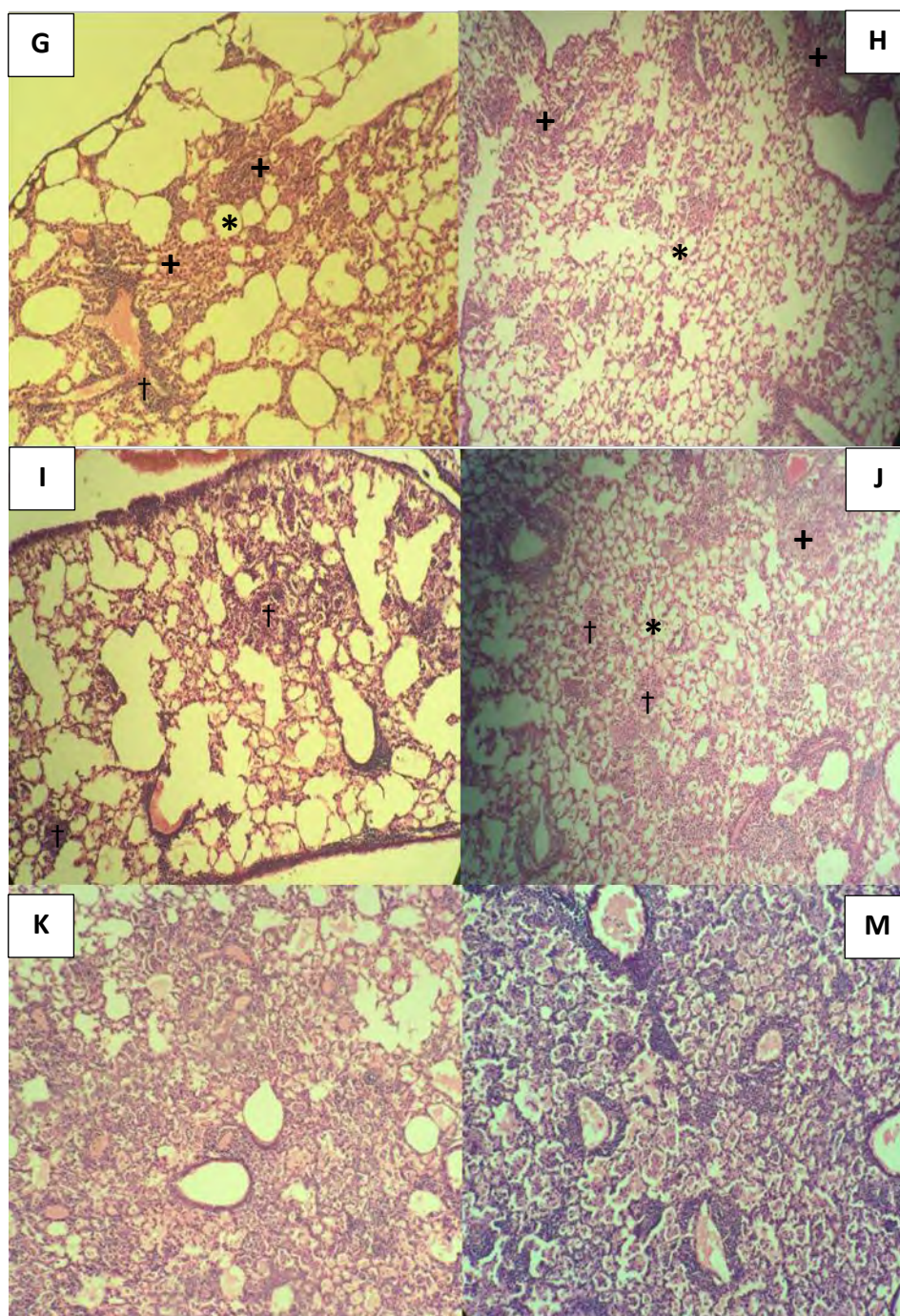
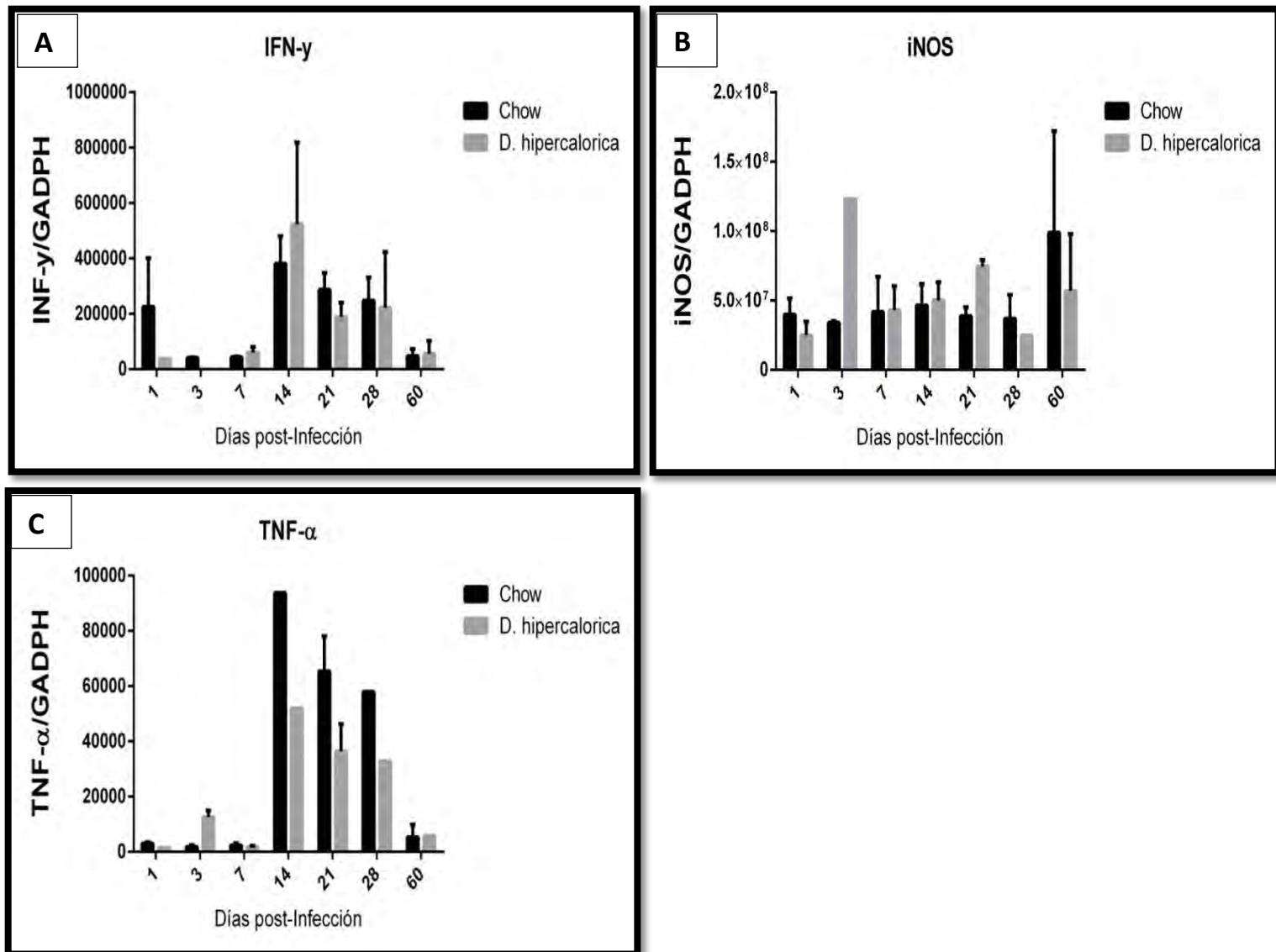


Figura 5. Corte histológico parénquima pulmonar ratones infectados con *M. tuberculosis H37Rv*. Tinción Hematoxilina- Eosina microscopio óptico 40X. **G)** día 21 pos infección CTRL. **H)** Día 21 pos infección DH. **I)** día 28 pos infección CTRL. **J)** Día 28 pos infección DH. **K)** Día 60 pos infección CTRL. **M)** Día 60 pos infección DH. (*) Espacio alveolar. (+) Área neumónica. (†) Granuloma.

La expresión de citocinas en pulmón fue evaluada mediante RT-PCR usando el gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehido deshidrogenasa) para comparar el número de copias de INF- γ , TNF- α e iNOS. La expresión de INF- γ se ve aumentada a partir del día 14 para ambos grupos y se observa que los animales con DH tienen mayor expresión de este gen, sin embargo, no existen diferencias significativas. A partir del día 14 se observa una disminución en la expresión de INF- γ en ambos grupos y de manera inversa al día 14, la expresión de INF- γ es menor en los animales con DH en los días posteriores (**Gráfica 6 A**). En la expresión de iNOS no se observa ninguna diferencia significativa para ninguno de los grupos a lo largo del experimento (excepto la muestra del día 3 de los animales DH) (**Grafica 6 B**). La expresión TNF- α en ambos grupos aumenta de manera significativa al día 14 pos infección, sin embargo, se observa que los animales CTRL tienen mayor expresión de este gen en comparación con los animales con DH. Se observa que la expresión va disminuyendo conforme avanzan las semanas, sin embargo, la expresión de TNF- α en los animales con DH es siempre menor que en los animales CTRL (**Grafica 6 C**).



Gráfica 6. Media \pm DS. Número de copias/# GADPH. IFN- γ (A). iNOS (B). TNF- α (C). Animales infectados por vía intratraqueal con trecientas veinte mil bacterias de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv. De dos a cinco animales por grupo. Las barras negras pertenecen a los animales que recibieron dieta control tipo Chow. Las barras grises pertenecen a los animales alimentados con la dieta hipercalórica.

Discusión de resultados

El propósito principal de este estudio fue evaluar el efecto de la alimentación con una dieta hipercalórica en los mecanismos de protección ante la infección con TB.

Actualmente se sabe que el principal mecanismo de protección en contra de la infección con *M. tuberculosis* es la inmunidad mediada por células o respuesta inmunológica innata. Sin embargo, también se sabe que la inmunidad innata se ve deteriorada cuando existe un estado de malnutrición, ya sea desnutrición (falta de alimento) o sobre-nutrición (el consumo excesivo de energía proveniente de los alimentos) disminuyendo su capacidad protectora. Los elementos más afectados son los mecanismos bactericidas como la fagocitosis y la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. [2, 6, 13, 14, 15, 16]

En un principio esperábamos que el peso de los animales con DH aumentara de manera significativa en comparación con los animales CTRL, sin embargo, el peso de ambos grupos aumentó de manera similar hasta llegar al momento de la infección. Esto puede explicarse por trabajos realizados por varios grupos de investigación, los cuales plantean que en algunas situaciones las dietas hipercalóricas utilizadas para generar problemas metabólicos no afectan de manera drástica el peso corporal de los animales durante las primeras semanas de alimentación, pero que a largo plazo tienen consecuencias en el metabolismo de los lípidos [80]. Los autores de estos trabajos establecen que los periodos que son considerados como “cortos” son periodos que van de 4 a 6 semanas, mientras que los tiempos que son considerados “largos” van de 16 a 22 semanas. Los periodos de tiempo más prolongados se aceptan como los más eficientes para generar dislipidemias o problemas en el metabolismo de los lípidos.

Sin embargo, la dieta probada en estos artículos es distinta a la que se probó en esta tesis donde el único nutrimento modificado son las grasas.

La variación en la composición de las dietas es uno de los problemas que se tiene a la hora de analizar los resultados, ya que al no existir una dieta hipercalórica consenso no se puede establecer cuál es la mejor para generar cambios a nivel metabólico. Se ha reportado que las dietas que están compuestas en su mayoría con grasas vegetales son las mejores para aumentar la concentración de triglicéridos y colesterol en la sangre y que las dietas basadas en grasas de animales marinos, no producen los efectos deseados. [33] Sin embargo, existen pocos trabajos en los cuales se evalúe el efecto que tiene una dieta hipercalórica en la cual se utilicen grasas animales (cerdo o rumiantes) y el efecto que puede tener en el sistema inmunológico. Las grasas comerciales provenientes de animales (manteca) contiene una variedad de ácidos grasos de 14 a 18 carbonos, en las cuales se pueden encontrar principalmente: mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. [64]

Como se mencionó anteriormente, la alimentación con una DH durante un periodo de 4 semanas generalmente no es suficiente para generar alteraciones metabólicas y tampoco para causar un aumento significativo en el peso. Sin embargo, como se observa en los resultados obtenidos de las mediciones en sangre, la concentración de colesterol es mayor en los animales con DH al igual que la concentración de glucosa. Las concentraciones altas de estos dos elementos podrían sugerir que existe un desbalance en el metabolismo de los animales con DH.

Estas alteraciones podrían sugerir el establecimiento del llamado “síndrome metabólico” un complejo cuadro de anormalidades metabólicas que incluye: intolerancia a la glucosa, glicemia anormal al comer, resistencia a la insulina, obesidad central, dislipidemias e hipertensión [26]. Sin embargo,

durante el experimento ésta fue la única vez que se midieron estos parámetros por lo que no podemos asegurar que esta condición se haya mantenido hasta el término del mismo y, por lo tanto no es posible asegurar que los animales hubiesen desarrollado este síndrome.

A pesar de que en un inicio el peso de los animales de ambos grupos se mantuvo en crecimiento constante, el descenso progresivo del peso de los animales con DH después de ser retados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* sugiere que la infección tiene un efecto importante en el consumo de energía en los animales. Las células del sistema inmunológico son elementos que están en constante división y proliferación, por ende, necesitan grandes cantidades de energía. El metabolismo de los linfocitos y los macrófagos (los principales efectores de la inmunidad innata) así como el de otras células del sistema inmunológico, está basado principalmente en la glucólisis y la glutaminólisis [65,66,67], ambas son oxidaciones parciales de glucosa y glutamina respectivamente. Al ingerir una dieta hipercalórica con un aporte energético que proviene esencialmente de ácidos grasos como el ácido palmítico y el ácido esteárico, pero que carece de azúcares y proteínas, probablemente el organismo tenga que recurrir a la utilización de las proteínas del músculo para solventar las necesidades energéticas de los linfocitos contribuyendo a la pérdida de peso por emaciación del músculo. Los ácidos grasos se almacenan en los adipocitos como reservas de energía, condicionando a los linfocitos a prescindir de las reservas de glucosa en el hígado y de la glutamina proveniente del músculo. Es probable que la pérdida de peso y la emaciación de los animales con dieta hipercalórica se deban a esto. Prueba de ello son los animales CTRL que llevaban una dieta balanceada que evita la pérdida de músculo y de la reserva de grasa subcutánea durante la infección.

La pérdida de peso está documentada como una característica en pacientes con tuberculosis. Ésta se debe principalmente a la acción generalizada de TNF- α cuya expresión está aumentada y

promueve la lipólisis y la pérdida de apetito. El estado de inanición sostenido y pérdida de peso se conoce como caquexia y es característico de una enfermedad avanzada de TB. En la caquexia existe una emaciación severa de las reservas energéticas; principalmente del tejido adiposo subcutáneo y de los ases musculares. También hay alteraciones psicológicas que generalmente se manifiestan con un estado de ánimo decaído y pérdida de apetito (anorexia) [84].

En los resultados del presente estudio al día 14 pos infección observamos que hay un aumento en la producción de copias del gen de TNF- α , lo que sugiere una alta producción de esta citocina. Esto correlaciona de manera directa con la pérdida de peso observada en los animales CTRL que comienzan a perder peso a partir de la tercera semana de infección. Aunque la producción de copias de TNF- α solo se haya medido en el pulmón, es probable que la producción sostenida de esta citocina y la subsecuente difusión por el torrente sanguíneo provocase en los animales CTRL el estado de decaimiento que se observa en la personas con estadios avanzados de la enfermedad. Sin embargo, los animales con DH comienzan a perder peso antes de los picos elevados de expresión de TNF- α , lo que sugiere que la pérdida de peso no está totalmente ligada a la expresión del TNF- α y su liberación por el organismo. Otra explicación para la precaria pérdida de peso en los animales con DH puede ser la liberación de hormonas esteroideas de las glándulas suprarrenales como los glucocorticoides. Aunque en este experimento no se propuso la evaluación de los niveles de glucocorticoides, se ha demostrado que la alimentación con dietas ricas en grasas produce la liberación de estas hormonas [25]. La acción de los glucocorticoides podría explicar la pérdida de peso y las alteraciones en el metabolismo de los lípidos y glucosa que se obtuvieron en los resultados. Se sabe que en estados de estrés metabólico (falta de nutrientes o exceso de energía proveniente de los alimentos) uno de los mecanismos compensatorios para asegurar el balance metabólico en el organismo es la liberación de glucocorticoides a partir de las glándulas

suprarrenales. [67] Los glucocorticoides son hormonas que tienen efectos importantes sobre el metabolismo de los lípidos y los azúcares y estos efectos pueden explicar los resultados que obtuvimos al analizar la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en la sangre de los animales.

En el hígado, los glucocorticoides aumentan la gluconeogénesis al estimular las enzimas gluconeogénicas lo que se traduce en una liberación mayor de glucosa al torrente sanguíneo, mientras que en tejidos periféricos, principalmente en músculo y tejido adiposo disminuye la capacidad de captación de la glucosa. Esto podría explicar porque los animales con DH tienen una mayor concentración de glucosa en sangre que los animales CTRL. En músculo, los glucocorticoides también aumentan la liberación de otros sustratos como aminoácidos, que provoca una disminución en el grosor de los haces musculares. Esta función de liberación de aminoácidos en el músculo al ser estimulados por los glucocorticoides podría tratarse de un esfuerzo por mantener el flujo de nutrientes hacia las células del sistema inmunológico [65]. En el tejido adiposo, aumentan la liberación de glicerol y ácidos grasos libres por el aumento en la actividad de las enzimas lipolíticas aumentando la concentración de ácidos grasos libres y glicerol en el torrente sanguíneo, sin embargo, no se observó que los animales con DH tuvieran un aumento en los niveles de triglicéridos en sangre, pero si observamos que mantenían tejido adiposo en las primeras semanas de infección algo que también ha sido reportado como un efecto paradójico de los glucocorticoides, aunque se desconocen los mecanismos subyacentes [63].

La concentración de albumina sérica mantiene niveles estables para ambos grupos a lo largo del experimento, lo que sugiere que la dieta hipercalórica que administramos no genera una desnutrición de tipo calórico proteica, en la cual los niveles de albumina estarían disminuidos. [22] En este tipo de desnutrición, que afecta principalmente niños, se ha visto que los individuos que la padecen son

más propensos a las infecciones crónicas; principalmente del intestino por la pérdida de la barrera epitelial. [25, 58, 75 76] En este caso, no encontramos una disminución en la concentración de albumina, que sugiere que la ingesta de una DH que contiene solo la mitad de proteínas por gramo de la dieta control, no es suficiente para causar desnutrición de severa. En los cortes histológicos tampoco hay evidencia de esteatosis hepática en los animales con DH que a pesar de llevar una dieta con un gran aporte de grasas, no desarrollan hígado graso. [56,61, 68, 69] El tamaño y peso del timo también son una característica de las desnutriciones severas, los niños que padecen desnutrición tiene el timo atrofiado, lo que influye de manera decisiva en la capacidad de la inmunidad innata. [56,61] Sin embargo, se obtuvieron resultados concluyentes al respecto, aunque se observa una disminución en el peso de este órgano en ambos grupos, no es una prueba suficiente para establecer si la alimentación con una DH tiene efectos nocivos en este órgano.

Durante el experimento observamos cómo la producción de TNF- α se mantiene en niveles bajos durante las primeras dos semanas de infección y como tiene un aumento considerable a partir del día 14 y se mantiene durante el resto del primer mes. Observamos también cómo disminuye progresivamente al finalizar el segundo mes de infección. Se sabe gracias al modelo de tuberculosis progresiva desarrollado en la cepa de ratones Balb/c, por el Dr. Hernández-Pando y colaboradores [83] que la producción de TNF- α aumenta progresivamente durante el primer mes de infección crucial para la activación de los macrófagos alveolares como una típica función de la respuesta Th-1 y para la formación y mantenimiento formación de los granulomas y-, que a partir del segundo mes cuando la enfermedad comienza un estado de cronicidad los niveles de TNF- α descienden. Se observó que en los animales CTRL existe una mayor expresión de este gen y también un mayor número de granulomas formados que sugiere que los mecanismos de protección están actuando de manera efectiva en contra de la mycobacteria.

La carga bacilar en pulmón es nuestra principal referencia para conocer la progresión de la enfermedad de tb. En los animales que fueron alimentados con DH se observó que las UFC están significativamente aumentadas en la mayoría de los días en comparación con los animales CTRL. También se observó que desde el primer día, la colonización de los bacilos en el pulmón fue mayor en los animales con DH, sugiriendo que los mecanismos de la inmunidad innata probablemente presenten alguna atrofia debido a la DH. Los macrófagos alveolares son las primeras células del sistema inmunológico que tiene interacción con la bacteria y se ha observado en estudios que macrófagos derivados de animales con desnutrición, son propensos a apoptosis en presencia de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e INF- γ , que en situaciones normales son citocinas que estimulan la activación del macrófago aumentando su capacidad microbicida. [62]

Aunque los resultados de las mediciones de albumina no sugieren que exista una desnutrición severa de tipo calórico proteica es muy probable que la alimentación con DH pudiera haber generado algún tipo de desnutrición leve o moderada, [57.58.74] y que probablemente haya afectado algún mecanismo de la inmunidad innata de manera más específica. Existen varios trabajos, en donde suprimen nutrientes específicos como la vitamina D, vitamina A o el zinc de la dieta, generando diversos efectos en el funcionamiento del sistema inmunológico, en especial un decremento en la habilidad bactericida de los macrófagos [31, 71].

Los glucocorticoides además de tener actividad en el metabolismo también tienen actividad antiinflamatoria que suprime a los elementos de la inflamación. En un estudio realizado en Japón a un hombre de 66 años se le suministró prednisolona (glucocorticoide) por cuatro meses, al cabo del cual murió por falla respiratoria, al analizar los pulmones dio positivo a tuberculosis la cual no había sido

previamente diagnosticada, además se comprobó que había diseminación a otros órganos (tuberculosis miliar) lo que probablemente fue resultado de la terapia con glucocorticoides [78]. El estrés generado por la DH con la subsecuente liberación de glucocorticoides podría disminuir la efectividad de los macrófagos alveolares para combatir a *M. tuberculosis* explicando por qué en los primeros días de la enfermedad, el establecimiento de bacterias en el sistema respiratorio es mayor en los animales con dieta hipercalórica que en los animales con la dieta control [58].

La formación del granuloma es muy importante para contener y eliminar a la micobacteria [72, 21], se sabe que el TNF- α es esencial para la formación de esta estructura [69]. Como ya se mencionó, en nuestro resultados se observó que la expresión de esta citocina está disminuida en los animales con DH. De igual manera, la formación de granulomas en el pulmón de estos animales fue menor en comparación con los animales CTRL. La expresión disminuida de TNF- α y la incapacidad para formar el granuloma puede ser explicada por la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides principalmente de la corticosterona.

La corticosterona es el glucocorticoide más abundante en ratones y otros mamíferos y su acción es análoga a la del cortisol en humanos [77]. La activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal estimula la liberación de glucocorticoides de las glándulas suprarrenales que viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar al sitio de lesión [81,82]. La actividad antiinflamatoria de los glucocorticoides es ampliamente conocida y a la fecha se utilizan análogos sintéticos de los glucocorticoides como la dexametasona o fosfato sódico de dexametasona para reducir los procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes o incluso como un elemento más en la terapia en infecciones en pulmón [71, 72].

La liberación de glucocorticoides en respuesta al estrés nutricional producido por la alimentación con DH pudo afectar de manera secundaria la efectividad de la respuesta inmunológica, manteniendo un estado antiinflamatorio constante que evitó que los macrófagos y los demás elementos del sistema inmunológico respondieran de manera eficaz para la eliminación de la micobacteria. Aunque no es tan evidente como en el caso del TNF- α , la expresión de INF- γ también es menor en los animales con DH en comparación con los CTRL. El INF- γ es una citocina liberada por los linfocitos T principalmente la subpoblación Th1 (pro-inflamatorios) y cuya función (entre otras muchas) es la activación de los macrófagos y el reclutamiento de células para la formación del granuloma [81,82]. La estimulación con INF- γ aumenta la producción ON que es el principal mecanismo de eliminación para la micobacteria [82]. El efecto de esta citocina, también pudo haber sido afectada por la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides. Se sabe que en ratones tratados con Stz para producir diabetes mellitus tipo 2, existe un retraso en el reclutamiento de leucocitos con el subsecuente retraso en la liberación de esta citocina y otros elementos del sistema inmunológico como CCL2 y CCL5. [82]

Los macrófagos activados producen grandes cantidades de especies reactivas gracias a la actividad de la enzima inducible de óxido nítrico sintetasa o iNOS. La cual aumenta su expresión en presencia de infecciones [73]. Sin embargo, como se observa en los resultados (**Gráfica 6 B**), la expresión del gen de esta enzima no aumenta o disminuye de manera significativa durante el curso de la enfermedad en ninguno de los grupos. Se ha reportado que en situaciones de hiperglicemia existe un daño en la producción de óxido nítrico [77]. En este estudio no se realizaron mediciones directas de las especies reactivas o ensayo de "ROS", este tipo de ensayos habría ayudado a discernir si la expresión de este gen tiene un efecto en la producción de especies reactivas, pues, al contrario de las citocinas que son moléculas que tiene su efecto cuando se unen al receptor en la célula, las

enzimas pueden catalizar muchas reacciones sin necesidad de aumentar la concentración de la enzima. Esto explicaría que aunque los niveles de expresión de iNOS se mantengan constantes durante el curso de la enfermedad, la calidad de la enzima en los animales con DH pudiese haber sido menor, lo que involucraría que se generaran menos especies reactivas.

Como ya se mencionó anteriormente la formación del granuloma como estructura de contención es fundamental para evitar la diseminación del bacilo hacia todo el organismo. La pobre formación de granulomas en los animales con DH pudo haber facilitado la diseminación de la micobacteria hacia otros órganos, como lo demuestran los resultados obtenidos. La diseminación al hígado se hace evidente durante la primera semana de infección en los animales con DH, esto correlaciona de manera directa con lo ya mencionado de las alteraciones en los mecanismos bactericidas y el ambiente antiinflamatorio de los glucocorticoides, pues de manera similar a lo que ocurre en el pulmón, en el hígado la carga bacilar aumenta de manera significativa a partir del día 21. Un hecho interesante es que la formación de granulomas en el hígado es más efectiva en los animales con DH lo que sugiere que en este órgano existe un factor que fomenta la formación de los mismos, aunque la carga bacilar siga aumentando y que es independiente de los mecanismos que ocurren en el pulmón. La colonización hepática por parte de *M. tuberculosis* no siempre genera granulomas, a veces genera lesiones hepáticas no específicas como: células de Kupffer hiperplásicas, inflamación sinusoidal, necrosis focal y fibrosis peri portal. Lo que podría generar un sesgo al hablar de daño hepático causado por la micobacteria [54].

De forma similar a lo que ocurre en hígado y pulmón, la diseminación al bazo es evidente al día 14 e inclusive en este día ya existen diferencias significativas entre la carga bacilar de ambos grupos. En los resultados podemos observar como la carga bacilar en los animales CTRL se estabiliza en el día 28 y se mantiene hasta el día 60, sin embargo, la carga bacilar de los animales con DH aumenta de

manera sustancial al día 60, este aumento sugiere que una vez más los mecanismos de contención y eliminación han sido insuficientes para controlar el crecimiento del bacilo.

Es interesante que cuando se evaluaron las cargas bacilares de los ratones en pulmón, hígado y bazo los resultados se asemejan con el trabajo realizado por *Yamashiro et al.*, en donde la carga bacilar de ratones diabéticos infectados con *M. tuberculosis* al día 14 y 35, se observa que los animales diabéticos tienen mayor carga bacilar en ambos tiempos en comparación con los ratones que no tienen diabetes, sin embargo, sus resultados demuestran que hay una menor producción de INF- γ al día 14 en los ratones diabéticos aunque no se hayan encontrado diferencias significativas. La expresión de iNOS en los animales diabéticos es menor que en los animales control al día 7 pos infección, sin embargo, en los resultados que se obtuvieron en este estudio, no se observa esa diferencia al mismo día [76].

La dieta hipercalórica no provoca obesidad y tampoco una desnutrición, pero el efecto que tiene en la disminución del peso de los animales infectados puede sugerir que existe un desbalance en las reservas energéticas del organismo. que probablemente hubiese pasado inadvertido de no haber sido retados los animales, esto presupone que, aunque no existan signos evidentes de problemas metabólicos como obesidad o desnutrición, las alteraciones en el metabolismo pueden estar presentes y hacerse evidentes en respuesta de un estímulo como lo es la infección con *M. tuberculosis*. Por otra parte, estas alteraciones en el metabolismo y el estado energético del organismo tendrán un efecto negativo en los mecanismos protectores del sistema inmunológico que permitirá una rápida y más notoria progresión de la enfermedad. A pesar de que en este trabajo se propuso estudiar el efecto de la alimentación con una dieta hipercalórica, estas afectaciones en el sistema inmunológico que se observaron, se han visto en otros modelos con diferentes dietas e incluso en modelos en donde se les provoca a los animales desnutrición, lo que nos hace pensar que

probablemente el efecto de la dieta no sea específico, sino que obedece a mecanismos intrínsecos del organismo como una respuesta a situaciones adversas, mecanismos de estrés.

Conclusiones y Perspectivas

La alimentación con la dieta hipercalórica a base de grasas animales tiene efecto sobre el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos un mes de ser suministrada, este efecto es representado por una desregulación en el nivel de glucosa y colesterol en sangre pero no en la concentración de triglicéridos. El consumo de esta dieta no provocó obesidad y tampoco muestra signos de provocar una desnutrición severa, pero el efecto que tiene en la disminución del peso de los animales infectados puede sugerir que existe un desbalance en las reservas energéticas del organismo debido a otro mecanismo como la acción de los glucocorticoides.

Se observa que con la alimentación hipercalórica hay una mayor y más rápida progresión de la TB, con un aumento en la carga bacilar del pulmón y una diseminación más rápida hacia otros órganos en donde de igual manera presenta más carga bacilar. La DH aparentemente impide una correcta formación de los granulomas y favorece la generación de áreas neumónicas que limitan la capacidad de asimilación del oxígeno disminuyendo la sobrevida. El perfil de expresión de las citocinas se ve alterado a causa de la DH disminuyendo la expresión de citocinas del fenotipo protector como TNF- α e INF- γ lo que limita la activación de los macrófagos e impide la eliminación de la bacteria.

El modelo probado en esta tesis tiene ciertas limitantes...

1. La dificultad para controlar la concentración de nutrimentos en el alimento modificado
2. Hay dos variables presentes en el alimento modificado: mayor cantidad de grasa pero también la mitad de los otros nutrientes, siendo las proteínas un nutrimento importante cuyo déficit puede producir desnutrición
3. El tiempo empleado para realizar la infección. Datos en la literatura sugieren que para lograr un modelo de obesidad se requieren más semanas de exposición a la dieta alterada. Sin embargo, como se mencionó en la introducción no existe un modelo estándar de dieta experimental y el modelo de la literatura es distinto al probado en este estudio.

En qué nos ayuda este modelo:

1. Permite ver diferencias entre ratones experimentales y control en su respuesta a la infección
2. El alimento modificado es fácil de preparar
3. Este modelo permite conocer un poco más sobre la respuesta fisiológica a la dieta hipercalórica en las primeras semanas.
4. El modelo permitió ver diferencias antes una infección con TB

A futuro:

1. Retomar el modelo para caracterizar con mayor detalle parámetros que nos sirven para medir obesidad y desnutrición

Referencias

1. WHO. (2016). Global Tuberculosis Report. WHO Press.
2. Bray G, A. (2011). *A GUIDE TO OBESITY AND THE METABOLIC SYNDROME, ORIGINS AND TREATMENT*. CRC Press. Luisiana State.
3. Jeon, C.Y. & Murray M.B. (2008). *Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies*. Plos Medicine. Volume 5 (7). 1091-1101.
4. Maysami, S. Haley, M, J. Gorenkova, N. Krishnman, S. McColl, W, B. & Lawrence, B, C. (2015). *Prologed diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke*. Journal of Neuroinflammation 12:140
5. Vallerskog, T. Martens G, W. & Kornfeld H. (2010). *Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to Mycobacterium tuberculosis*. National Institutes Of Health. J Immunol 184 (11): 6275-6282
6. Hernández, Y, G. Díaz, S, E. Gutiérrez, E, A. Torrico, M, M. & Rojas T, M. (2009). *Asociación de tuberculosis y diabetes mellitus: Mecanismos inmunológicos involucrados en la susceptibilidad*. Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Vol. 22 No. 1. pp 48-55.
7. Pickuo, J, C. & Real F, M. (2007). *Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes*. TRENDS in endocrinology and Metabolism Vol. 19 No.1.
8. Martens, G, W. Arian, C, M. Lee J. Ren, F. Greiner, D. & Kornfeld H. (2007). *Tuberculosis Susceptibility of Diabetic Mice*. Am J Respir Cell Mol Biol Vol. 37 pp 518-524.
9. NCBI. Taxonomy. Mycobacterium tuberculosis H37Rv. [en línea]. [Fecha de consulta: 7 diciembre 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=Mycobacterium+tuberculosis+H37Rv>.
10. Berrueta, Teresa Uribarren .Tuberculosis. Recursos en bacteriología digital [en línea]. 7 de octubre de 2016. [Fecha de consulta: 7 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>.
11. Gagneux S. (2012). *Host-pathogen coevolution in human tuberculosis*. Phil. Trans. R. Soc. Vol. 367. pp. 850-859.
12. Daniel M., T. (2006). *The history of tuberculosis*. Respiratory Medicine. vol. 100 pp. 1862-1870.
13. Gutierrez, C, M. Brisse, S. Brosch, R. Fabre, M. Omaïs, B. Marmiesse, M. Sypply, P. & Vincent V. (2005). *Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog Vol.1 pp. 55- 61.

-
14. Cook, M, G. Berney M. Gebhard, S. Heinemann, M. Cox, A., R. Danilchanka, O. & Niederweis M. **(2009)**. *Physiology of Mycobacterium*. Adv Microb Physiol. Vol 55. pp. 81-319.
 15. Cole, T. s. Brosch, R. Parkhill, J. Garnier, T. Churcher, C. Harris, D. Gordon, V, S. **(1998)**. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature. Vol. 393. pp.538-544
 16. Forrelad M, A. Klepp I, L. Gioffré A. García J, S. Morbidoni H, R. Santangelo M. Cataldi A, A. Bigi F. **(2013)** Virulence factor of the Mycobacterium tuberculosis complex. Virulence 4:1, 3-66.
 17. Koneman, W. E. et al. **(2008)**. *Diagnostico microbiológico*. 6ed. Buenos Aires. Medica panamericana
 18. Adams, D. O. **(1976)**. *Granulomatous Inflammation*. American Journal of Pathology. Vol. 84 No. 1
 19. Majlessi, L. Combaluzier, B. Albrecht, I. Garcia, E, J. Nouze, C. Pieters, J. & Leclerc, C. **(2007)**. *Inhibition of Phagosome Maturation by Mycobacterium Does Not Interfere with Presentation of Mycobacterial Antigen by MHC Molecules*. J. Immunol. Vol. 179. pp. 1825-1833.
 20. Kim, M, Wainwright, H, C. Locketz, M. Bekker, L. Walther, G, B. Dittrich, C. Visser, A. Wang, A. Hsu, f. Wiehart, U. Tsenova, L. Kaplan, G. & Rusell, D, G. **(2010)**. *Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism*. EMBO Mol Vol. 2 pp. 258-274
 21. Faugaret, D. Amara, B, A. Alingrin, J. Daumas, A. Delaby, A. Lépolard, C. Raoult, D. Textoris, J. & Mege, J. **(2014)**. *Granulomatous response to Coxiella burnetii, the agent of Q fever : the lessons from gene expression analysis*. Frontiers in celular and inction microbiology. Vol. 4. Art. 172 pp 1-8.
 22. Fallahi-Sichani, M. Schaller, M, A. Kirschener, D, E. Kunkel, S, & L. Linderman, J, J. **(2010)**. *Identifiication of the Key Processes that Control Tumor Necrosis Factor Availability in a Tuberculosis Granuloma*. PLoS comput Biol. Vol 6. Num.5 pp.1-6.
 23. Correa-Duque, M, A. Kuhl, A, A. Rodriguez, P, C. Zedler, U. Schommer-Leitner, S. Rao, M. Weiner, J. Hurwitz, R. Qualls, J, E. Kosmiadi, G, A. Murray, P, J. Kaufmann, S, H, E. & Recce, A, T. **(2014)**. *Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hipoxic tuberculosis granulomas*. PNAS. pp 4024-4032.
 24. Loscalzo J. **(2010)**. *Harrison. Neumología y cuidados intensivos*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana editors, S.A de C.V. pp 115-136.
 25. Kwon J, O. (1997). *The Role of Nitric Oxide in the Immune Response of Tuberculosis*. JKMS. Vol.12 pp.481-488
 26. Gallou-Kabani, C. Vigé, A. Gross, M. Rabés, J, P. Boileau, C. Larue-Achagiotis, C. Tomé, D. Jais, J, P. & Junien, C. **(2007)**. *C57BL/6J and A/J Mice Fed a Hign-Fat Diet Delineate Components of Metabolic Syndrome*. OBESITY Vol.15 Nom. 8 pp.1996-2006

-
27. Oh, W. Abu-Elheiga, L. Kordari, P. Gu, Z., Shaikenov, T. Chirala, S, S. & Wakil, J. (2004). *Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice*. PNAS Vol.102. Num.5 PP. 1384-1389.
 28. Grote, C, W. Groover, A, L. Ryals, J, M. Geiger, P, C. Feldman, E, L. & Wright, D. (2013). *Peripheral nervous sistem insulin resistance in ob/ob mice*. Acta Neuropathologica Communication. pp. 1 -15.
 29. Albrecht T.et al. (2016). *Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice*. Scientific Reports.
 30. Liljedahl, L. Pedersen, M, H. Norlin, J. McGuire, J, N. & James P. (2016). *N-glycosylation proteome enrichment analysis in kidney reveals diferences between diabetic mouse models*. Clin Proteom. Pp. 13-22.
 31. Gonzáles, H, I, R. Aguilar, M, R. Soto, V, G. Garcia, J, G, R. López, J, E, T. Cruz, J, C, H. & Navarrete, A. (2014). *Antineuropathic effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin in streptozotocin-induced diabetic rodents*. BMC Complementary and Alternative Medicine. VOL. 14 num.129 pp 1-12.
 32. Johansen, N, J. Frugier, T. Hunne, B. & Broock J. A. (2014). *Increased peripherin in sympatheic axons innervatin plantar metatarsal arteries in STX-induced type I diabetic rats*. Frontiers in Neuroscience. Vol. 8 Art. 99. pp.1-11.
 33. Buettner, R. Scholmerich & Bollheimer, C. (2007). *High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disirders of Human Obesity in Rodents*. OBESITY Vol.15 Nom.4 pp. 798-808.
 34. Vallerskog, T. Maetens, G, W. & Kornfeld, H. (2010). *Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 184(11) pp. 6275-6282.
 35. Levant, B, Ozias, M, K. Guilford, B, L. & Wright, D, E. (2013). *Strepsotocin-induced diabetes partially attenuates the effects of hign-fat diet on liver and brain fatty acid composition in mice*. Lipids 48(9).
 36. Chatterjee T. K. et al. (2009). *Pro-inflammatory phenootype of perivacular adipocytes influence of hih fat feeding*. Circ Res. 104(4) pp. 541-549.
 37. Antvorskov, J, C. Fundova, P. Buschard, K. & Funda, D, P. (2017). *Impact of Dietary Gluten on Regulatory T Cellas and Th17 Cells in BALB/c Mice*. PLoS ONE 7(3).
 38. Debons, A, F. Krimsky, I. Maayan, M, L. Fani, K. & Jmenez, F, A. (1997). *Gold thioglucose obesity síndrome*. Fed Proc. 36 (2) pp.143-147.
 39. Pettersson, U, S. Waldén, T, B. Carlsson, P. Jansson, L. & Philipson, M. (2012). *Female Mice are Proteted against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue*. PLoS One. 7(9).

-
40. Correia, A, L. Aguilar, M, B. Mandarin, C, A. & Faria, T, S. (2012). *Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice*. *Nutrition*. pp. 316-323.
 41. Huang, Y, H. Chen, C, J. Tang, K, S. Sheen, J, M. Tia M, M. Tain, Y, L. Chen, C, C. Chu, E, W. Li, S, W. Yu, H, R. & Huang, L, T. (2016). *Postnatal High-Fat Diet Increases Liver Steatosis and Apoptosis Threatened by Prenatal Dexamethasone through the Oxidative Effect*. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 369.
 42. Jakobsdottir, G. Xu, J. Molin, G. Ahrné, S. & Nyman, M. (2013). *High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, While Dietary Fibre Counteracts These Effects*. *PLoS ONE*. Vol. 8
 43. Fantuzzi, G. (2013). *Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases*. *Cytokine* 64(1).
 44. Götze, A, A. Rozman, J. Rödels, H, G. Fuchs, H. Durner, V, G. Angelis, M, G. Klingspor, M. & Stoeger, T. (2011). *Comparison of particle-exposure triggered pulmonary and systemic inflammation in mice fed three different diets*. *Particle and fibre toxicology*. 8:30
 45. Carrillo, E, M. Luna, R, A, J. Rodríguez, R, C. Ramos, V. & Aquilar, V, R. (2015). *Effect of Diet and Exercise on Peripheral Immune System in Young Balb/c Mice*. *BioMed Research International*. 2-13
 46. Muñoz, M. Mazure, R, A. & Culebras, J, M. (2004). *Obesidad y sistema inmune*. *Nutr. Hosp.* (6) 329-324.
 47. Horai, Y. Utsumi, H. Ono, Y. Kishimoto, T. Ono, Y. & Fukumari, A. (2016). *Pathological characterization and morphometric analysis of hepatic lesions in SHRS5/Dmcr, an experimental non-alcoholic steatohepatitis model, induced by high-fat and high-cholesterol diet*. *Int. J. Exp. Path.* 1-11
 48. Ricci, R. & Bevilacqua, F. (2011). *The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review*. *The veterinary journal*.
 49. Fan, S. Zhang, Y. Hu, N. Sun, Q. Ding, X. Et al. (2012). *Extraction of Kudung Tea Prevents High-Fat Diet-Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice via Liver X Receptor (LXR) B Antagonism*. *PLoS One* 7(12).
 50. Angela, M. Pellizon, M, A. Ricci, M, R. & Ulman, E, A. (2007). *Diet-Induced Metabolic Syndrome in rodent Models*. *Animal Lab News*.
 51. Benoit, B. Plaisancié, P. Awada, M. et al. (2013). *High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet*. *Nutritional Research* pp. 952-960
 52. Muñoz, F, S. Macedo, R, G. Aguilar, F, A. & Cruz, M. (2005). *Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune*. *Gac Méd Méx.* Vol.14 No.6 pp.505-513.
 53. Luca, C. & Olefsky, J, M. (2008). *Inflammation and insulin resistance*. *FEBS Letters* 582. pp 97-105.

-
54. Tao, Y, T. Huang, Q. Jiang, Y, L. Wang, X, L. Sun, P. & Tian, Y. (2013). *Up-regulation of Slc39A2 (Zip2) mRNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with pulmonary tuberculosis*. Mol. Biol. Rep. 40 (8), 4979–4984.
55. Olusi, O, S. Thurman, G, B. & Goldstein, A, L. (1980). *Effect of thymosin on T-Lymphocyte Rosette formation in children with Kwashiorkor*. Clinical immunology and immunopathology Vol. 15 pp. 687-691.
56. Muñoz, A, M. (2013). *Desnutrición Severa tipo Kwashiorkor*. Revista Gastrohnutp. Vol. 15 No. 1 pp.20-26.
57. Deitch, E, A. (1994) *Bacterial translocation: the influence of dietary variables*. Gut; Vol. 35 (1 Suppl):S23–7.
58. Sakamoto, M. Fujisawa, Y. & Nishioka, K. (1998) *Physiologic role of the complement system in host defense, disease, and malnutrition*. Nutrition Vol. 14 pp 391–398.
59. Schaffer, M, R. Tantry, U. Ahrendt, G, M. Wasserkrug, H, L. & Barbul, A. (1997). *Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis*. J Am Coll Surg Vol. 184 pp.37–43.
60. Redmond, H, P. Leon, P. Lieberman, M. D. Hofmann, K. Shou, J. Reynolds, J, V. Goldfine, J. Johnston, R, B. Jr. & Daly, J, M. (1991). *Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition*. Arch Surg Vol 126 pp192–196.
61. Fock, R, A. Vinolo, M, A. Moura, S, A. Rocha, V. Rocha, L, C. & Borelli, P. (2007) *Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice*. Cytokine Vol. 40 pp105-114.
62. Stapleton, P, P. Barry, L, K. Freeman, T, A. Mestre, J, R. Daly, J, M. (2004). *Decreased peritoneal macrophage NF-kappaB translocation to the nucleus in protein energy malnutrition—a role for the glucocorticoid response?* Clin Nutr Vol.23 pp177-182.
63. Greebspan, F, S. & Strewler, G, J. (1998). *Endocrinología básica y clínica*. 4ª ed. Manual moderno PP. 631-651

-
64. pagina de internet , visto el 6/03/ 2017 disponible actualmente http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/grasas-de-origen-animal-actualizado-nov-2015
65. Takeda, N. O'Dea, L. Doeden & Andrew Et al. (2010). *Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis*. Genes & Development. Vo. 24. pp. 491-501
66. Newsholme, E, A. Crabtree, B. & Ardaw, S, M. (1985). *Glutamine Metabolism in Lymphocytes : its Biochemical, Physiological and Clinical Importance*. Quartely Jurnal of Experimenta
67. Wise, D, R. Deberadinis, R, J. Mancuso, A. Sayed, N. & Thompson, C B. (2008). *Myc regulates a transcriptional program tha stimulates mitochondrial gluaminolysis an leads to glutamine addiction*. PNAS. Vol.105 Nom. 48.
68. Herzog, R. & Cunningham-Rundles, S. (2015). *Malnutrition Immunodeficiency and Mucosal Infection*. Mucosal Inmmunology vol. 74. pp. 1461-1473.
69. Bandsma, R, H. Mendel, M. Spoelstra, N, M. Reijngoud, D. Boer, T. Stellaard, F. Brabin, B. Schellekens, R. Senga, E. & Heikens T., G. (2010). *Mechanisms Behind Decreased Endogenous Glucose Production in Malnourished Children*. Pediatric Research Vol. 68 No. 5 pp.423-428
70. Consultado 7/03/2017
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Dexametasona%20Iny.htm
71. Burnley, B. & Jones, H, P. (2016). *Corticotropin-releasing hormone improves survival in pneumococcal pneumonia by reducing pulmonary inflammation*. Physiol Rep. Vol. 5
72. Scholossberg, D. (1999). *Tuberculosis and non-tuberculosis mycobacterial infections*. 4 Edition. W.B. Saunders Company.
73. Hashimoto, T. Perlot, T. Rehman, A. Trichereau, J. Ishiguro, H. Paolino, M Sigl, V. Hanada, T. Hanada, R. Lipinski, S. Et al. (2012). *ACE2 links aminoacid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation*. Nature. Vol.81. pp.487:477
74. Katayama, M. Xu, D. Specian, R, D. & Deitch, E, A. (1997). *Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats*. Ann Surg Vol.225 pp317-326.
75. Cassano, A, E. White, J, R. Penraat, K, A. Wilson, C, D. Rasmussen, S. & Karatsoreos, I, N. (2005). *Anatomic, Hematologic, and Biochemical Features of C57BL/6NCrl Maintained on Chronic Oral Corticosterone*. Comparative Medicine. Vol. 62. Num. 3.

-
76. Yamashiro, S. Kawakami, K. Uezu, K. Kinjo, T. Miyagi, K. Nakamura, K. & Saito, A. (2004). *Lower expression of Th-1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Experimental Immunology. 139. pp. 57-64
77. Nakao, A. Ishii, H. Igata, F. Kushima, H. Fujika, M. Hisano, S. & Watanabe, K. (2016). *Disseminated tuberculosis with acute respiratory distress syndrome lacking granuloma formation in the lung*. J Infect Chemother. 1-4
78. Liu, M, J. et al. (2013). *Zinc Deficiency Augments Leptin Production And Exacerbates Macrophage Infiltration Into Adipose Tissue in Mice Fed a High-Fat Diet*. The journal of Nutrition. pp.1036-1046.
79. Pando, R, H. León, D, A. Orozco, H. Serrano, A. Ahlem, C. Trauger, R. Schramm, B. Reading, C. Frincke, J. & Rook, G, A, W. (2005). *16 alpha -Bromoepiandrosterone Restores T Helper Cell Type 1 Activity and Accelerates Chemotherapy- Induced Bacterial Clearance in a Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis*. The journal of Infectious Diseases. 191: pp.299-306.
80. Júnior O, A, S. Okoshi, K. Cicogna, A, C. et al. (2009). *Perfil Nutricional y Cardiovascular de Ratas Normotensas e Hipertensas bajo dieta Hiperlipídica*. Arq Bras Cardiol. 93(5) pp.516-523.
81. Pando, H, R. Orozco, H. Aguilar, D. López, F, C. & Rook G. (2004). *Immunopatología de la tuberculosis experimental*. Mensaje Bioquímico Vol. XXVII
82. Pando, H, R. Mata, D. Aguilar, D. Orozco, H. (2011). *Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar*. Mensaje Bioquímico Vol. XXXV pp. 1-66
83. Pai, M. Behr, M, A. Dowdy, D. Dheda, K. Divangahi, M. Boehme, C, C. Ginsberg, a. Swaminathan, S. Spigelman, M. Getahun, H. Menzies D. Raviglione, M. (2016). *Tuberculosis*. Nature Reviews. Vol. 2
84. Pastore, A & Orlandi, P, S (2013). *Association between an inflammatory-nutritional index and nutritional status in cancer patients*. Nutr Hosp. 28(1) pp. 188-193.
85. Disponible 07/09/ 2017 https://es.wikipedia.org/wiki/Estimador_de_Kaplan-Meier