



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

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

T E S I S

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

Mario Alberto Zetter Salmón

Director de Tesis:

Rogelio Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Comité tutor

Raúl Mancilla Jiménez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Andrés Quintanar Stephano

Instituto de Neurobiología

Diciembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en la *Sección de Patología Experimental* del *Departamento de Anatomía Patológica* del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) bajo la tutoría del **Dr. Rogelio Hernández Pando** y el comité tutorial integrado por el **Dr. Raúl Mancilla Jiménez** y el **Dr. Andrés Quintanar Stephano**. El desarrollo de todos los experimentos fue llevado a cabo en instalaciones de Bioseguridad Nivel III (BSLIII) pertenecientes al laboratorio de Patología Experimental con el apoyo de los doctores Brenda Marquina, Dulce Mata Espinosa y Jorge Barrios Payán. Durante los estudios de doctorado, el autor de la tesis recibió generosos apoyos del programa de **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, de la UNAM. El autor contó con una beca de CONACyT para estudios de posgrado.

«La santé et la maladie ne sont pas deux différences fondamentalement différentes, comme le croyaient d'anciens médecins et certains praticiens. Ne les considérez pas comme des principes différents, des entités qui sont contestées auprès de l'organisme vivant et qui en font le théâtre de ses luttes. Ce sont des antiquités médicales. En réalité, il n'y a que des différences de degré entre ces deux manières d'être: exagération, disproportion, discordances des phénomènes normaux constituent l'état malade. Il n'existe aucun cas dans lequel la maladie a provoqué l'apparition de nouvelles conditions, un dépaysement complet, des produits nouveaux et spéciaux.»

“La salud y la enfermedad no son dos modos que difieren esencialmente, como pudieron creerlo los médicos antiguos y como todavía lo creen algunos prácticos. No hay que considerarlas como principios distintos, entidades que se disputan al organismo vivo y que lo convierten en el teatro de sus luchas. Esas son antiguallas médicas. En la realidad, sólo existen diferencias de grado entre esas dos maneras de ser: la exageración, la desproporción, las desarmonías de los fenómenos normales constituyen el estado enfermizo. No existe ningún caso en el cual la enfermedad haya hecho que aparezcan condiciones nuevas, un cambio completo de escena, productos nuevos y especiales.”

Leçons sur Le Chaleur Animale,
Claude Bernard, 1876

Índice

1. Resumen	6
Abstract	7
2. Introducción	8
3. Marco teórico	11
3.1 Tuberculosis.....	12
3.1.1 Transmisión y patogénesis.....	15
3.1.2 TB pulmonar activa.....	18
3.1.3 Granuloma: estructura de contención.....	22
3.2 Interacciones neuroinmunoendocrinas <i>adversas</i> durante la TB.....	24
3.2.1 Trastornos en el metabolismo del agua durante la TB.....	27
3.3 Sistema vasopresinérgico.....	29
3.3.1 Vasopresina.....	31
3.3.2 Receptores de Vasopresina.....	33
3.3.3 Inmunomodulación por Vp.....	35
4. Planteamiento del problema	38
5. Hipótesis	40
6. Objetivos	42
7. Métodos	44
Experimentos <i>in vivo</i>	45
Experimentos <i>in vitro</i>	53
8. Resultados	59
Respuesta vasopresinérgica en el pulmón infectado.....	66
Expresión de los receptores de Vp en el pulmón infectado.....	68
Efecto de la manipulación farmacológica del sistema vasopresinérgico en el curso y la progresión de la TB pulmonar.....	69
Tratamiento con el agonista Desmopresina (DdAVP).....	70
El tono vasopresinérgico aumentado incrementa la fibrosis pulmonar..	71
El antagonismo VpR reduce la carga bacilar y mejora los parámetros histopatológicos de la TB.....	73

Efectos de Vp en la eliminación de micobacterias por macrófagos alveolares en ensayos de killing.....	77
Efecto directo de Vp sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	83
9. Discusión y conclusiones	86
10. Abreviaturas.....	92
11. Bibliografía	95
12. Apéndices.....	111

1. Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica cuyo agente causal, el bacilo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, se aloja y replica dentro de las células del hospedero. La infección puede mantenerse por largos períodos de tiempo en estado de latencia sin causar síntomas; sin embargo, si los mecanismos de la inmunidad innata y celular, dirigidos a contener la infección son inadecuados, la respuesta inflamatoria crónica se torna patogénica, ocasionando como consecuencia daño al parénquima pulmonar por inmunopatología, situación conocida como tuberculosis pulmonar activa, en la que se generan granulomas caseificantes, alveolitis, neumonía y fibrosis. Por otra parte, durante la TB activa, la pérdida del control homeostático de diversos sistemas metabólicos, neuroendocrinos y hormonales del hospedero, interfieren a su vez en el desarrollo de una respuesta inmune eficiente y pueden determinar el curso de la infección. Existe evidencia previa de que durante el curso de la TB pulmonar activa, el metabolismo del agua y electrolitos se encuentra alterado, como consecuencia de la producción inapropiada de hormona antidiurética (arginina – vasopresina).

La asociación causal de este hallazgo y sus consecuencias funcionales permanecen desconocidas, sin embargo, dados los efectos inmunomoduladores de la vasopresina, resulta de interés estudiar su posible contribución en la patogénesis de la TB. En esta tesis, se describen los resultados obtenidos a partir de la investigación realizada en un modelo murino de TB progresiva y en un modelo de infección en cultivos celulares de macrófagos para demostrar la participación del sistema vasopresinérgico en la inflamación crónica patológica (no resolutive) que ocurre durante la tuberculosis pulmonar experimental. Además, se evaluó la posible contribución de la modulación farmacológica del sistema vasopresinérgico como parte del tratamiento de esta enfermedad. Finalmente, se realizan observaciones acerca del posible efecto de Vp sobre el metabolismo de Mtb.

Abstract

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease whose causative agent, the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), is lodged and replicates within the host cells. The infection can be maintained for long periods of latency without causing symptoms; However, if the mechanisms of innate and cellular immunity, aimed to containing the infection are inadequate, the chronic inflammatory response becomes pathogenic, resulting in damage to the lung parenchyma due to immunopathology, known as active pulmonary tuberculosis. In the later caseifying granulomas, alveolitis, pneumonia and fibrosis are generated. On the other hand, during active TB, the loss of homeostatic control of various host metabolic, neuroendocrine and hormonal systems, in turn interferes with the development of an efficient immune response and can determine the course of infection. There is previous evidence that, during active pulmonary TB, the metabolism of water and electrolytes is altered, presumably, as a result of the inappropriate secretion of antidiuretic hormone (arginine – vasopressin, Vp).

The causal association of this finding and its functional consequences remain unknown, however, given the immunomodulatory effects of vasopressin, it is of interest to study its possible contribution in the pathogenesis of TB. The results obtained here from the research carried out in a murine model of progressive TB and in a model of infection in macrophage cell cultures are described to demonstrate the involvement of the vasopressinergic system in chronic pathological (non-resolutive) inflammation during experimental pulmonary tuberculosis. In addition, the possible contribution of the pharmacological modulation of the vasopressinergic system as part of the treatment of this disease was evaluated. Finally, observations were made about the possible effect of Vp on the metabolism and biology of *Mtb*.

2. Introducción

“Every stress leaves an indelible scar, and the organism pays for its survival after a stressful situation by becoming a little older”.

Hans H. Selye

2.1 El Supersistema Neuroinmunoendocrino

En mamíferos y otros organismos superiores, los sistemas nervioso e inmune han *coevolucionado* para percibir el mundo exterior a través de diversas adaptaciones específicas en sus células (i.e. fotorreceptores en la retina, mecanorreceptores en la dermis, o receptores de patrones moleculares asociados a patógenos en células epiteliales e inmunes). Estas adaptaciones han permitido que los organismos puedan discriminar entre diferentes tipos de estímulos y así, evitar y responder de manera regulada a posibles amenazas provenientes tanto del medio externo como del *medio interno*.

Las primeras observaciones acerca de la *regulación neuro - inmune* fueron realizadas por el grupo de Pávlov a inicios del siglo XIX, quienes notaron que animales de experimentación con lesiones en el infundíbulo (región del piso del hipotálamo) desarrollaban algunos datos de inmunodeficiencia (revisado por Berczi, Quintanar-Stephano, & Kovacs, 2009).

Años más tarde, en 1936 el profesor Hans Selye, en McGill, describió el llamado *Síndrome General de Adaptación* para referirse a la respuesta estereotipada e inespecífica de los organismos hacia posibles amenazas a la homeostasis, a las que llamo “*noxious agents*”. Selye hizo observaciones acerca del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HPA axis) y su relación con este síndrome de adaptación, además de señalar que, existe un umbral en el que la fisiología puede llevarse hasta un punto de equilibrio cuando responde a estos agentes nocivos, como una reacción de defensa del huésped, a este proceso lo llamó respuesta de “*stress*”.

Posteriormente, en la década de los años 50's, los grupos de Szentivanyi, Luparello y Stain reforzaron estas observaciones al demostrar experimentalmente que las lesiones tuberales del hipotálamo inhiben el desarrollo del shock anafiláctico en animales inmunizados.

Posteriormente los grupos de Berczi y Kovacs, postularon la importancia de la glándula pituitaria y sus hormonas en la inmunidad innata y adaptativa, sugiriendo que mientras que la activación del eje HPA y la producción consecuente de glucocorticoides tienen un papel inhibitorio en las respuestas proliferativas de timocitos, hormonas como la prolactina (PRL) y la hormona del crecimiento (GH) estimulan la respuesta inmune adaptativa. Por otra parte, la secreción de histamina por células cebadas (mastocitos), además de las citocinas producidas por linfocitos en los sitios de inflamación, puede estimular vías ascendentes hasta el sistema nervioso central (SNC) que como consecuencia, activan el eje HPA. En conjunto, esta información permitió que denominaran a este circuito de interacciones el *Supersistema Neuroinmune* (Imagen 1), por la constante comunicación que existe entre los dos grandes sistemas de respuesta al entorno.

Años más tarde, el creciente interés en este campo llevó a la observación de que las hormonas neurohipofisarias oxitocina (Oxt) y vasopresina (Vp) poseen propiedades inmunomoduladoras y participan en diferentes fenómenos de la inflamación y las respuestas inmunes innatas y adaptativas. De esta forma, se concluye que estos dos sistemas se encuentran conectados constantemente a través de factores solubles entre los que se encuentran citocinas, hormonas, péptidos reguladores y neuropéptidos formando la llamada “*red neuroinmunoendocrina*” (*RNIE*, en adelante).

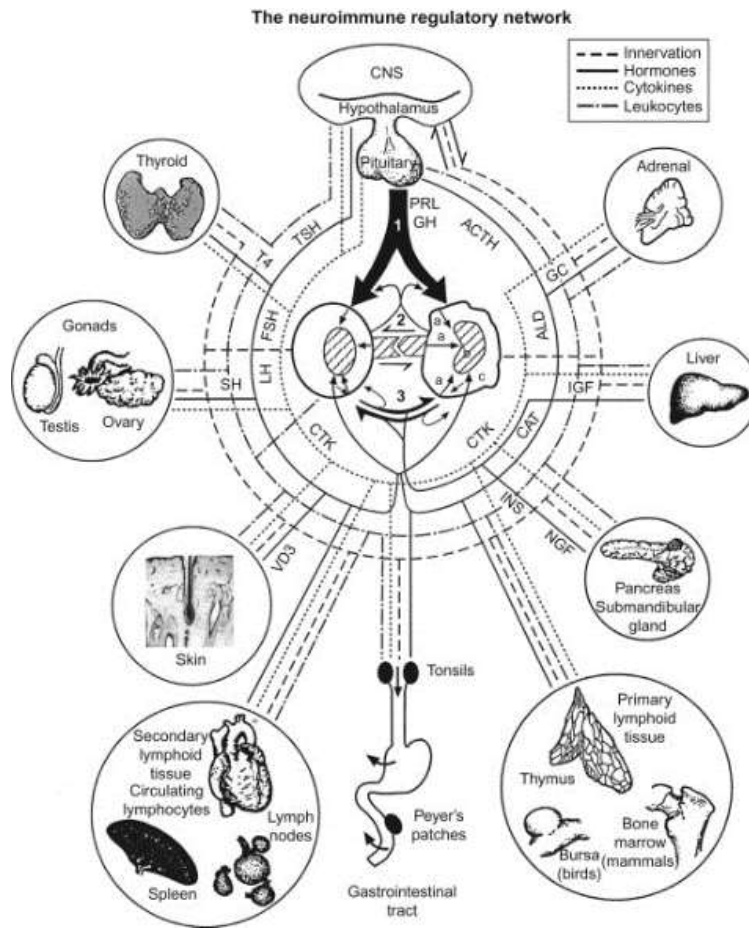


Imagen 1. El “Supersistema Neuroinmunoendocrino”

Las interacciones entre las hormonas pituitarias y neurohipofisarias así como diferentes péptidos reguladores interfieren con la actividad metabólica e inmunológica durante el stress y las respuestas inmunes; en el centro se observan células del sistema inmune innato (macrófago) y adaptativo (linfocito) interactuando entre ellas y comunicándose a la vez con el sistema nervioso a través de citocinas (CTK) y la respuesta del hipotálamo a través de hormonas y neuropéptidos. Tomado de Berczi, et al. *New Insights of Neuroimmune Biology*.

Desde hace algunas décadas este concepto se ha ampliado más allá de la comprensión de la fisiología integrativa, y diversos grupos de investigación han comenzado a profundizar en los mecanismos a través de los cuales estas interacciones pueden volverse patogénicas, con la idea de que la disrupción del equilibrio entre los componentes individuales de la RNIE tiene consecuencias funcionales en los otros. Bajo esta conceptualización se han generado diversas observaciones acerca de la disrupción de estas interacciones durante las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, tanto de origen autoinmune (p. ej. artritis reumatoide), infeccioso (bacteriano, viral o parasitario) y neoplásico.

Sin embargo, no queda claro si esta disrupción es resultado de la enfermedad o bien formó parte de su fisiopatología inicial. Resulta de particular interés

comprender cuáles son las causas y los efectos de estas alteraciones en la función neuroendocrina, pues esta aproximación podría resultar en una visión integrativa que permita solucionar problemas de salud que afecten a la población humana. En este sentido, las infecciones causadas por microorganismos persistentes (virales, bacterianos o protozoarios) son ejemplos de cómo estas interacciones pueden volverse aberrantes. Entre ellas, la tuberculosis pulmonar, una de las enfermedades más frecuentes en el mundo ha sido relacionada en años recientes con la disfunción no sólo en la función inmune, sino también en la respuesta metabólica y neuroendocrina del huésped.

En los siguientes capítulos se recopila la evidencia que sustenta la participación del sistema neuroendocrino y de neuropéptidos en la fisiopatología de la TB, con énfasis en la participación de Vp y su papel patogénico en la progresión de esta enfermedad. Además, se enfatiza en cómo posiblemente, durante las respuestas neuroendocrinas de adaptación al estrés causadas como consecuencia a una infección crónica e intensa como la Tb, los mecanismos destinados a mantener la homeostasis pueden volverse exagerados y disfuncionales, ocasionando enfermedad. Además, se explora un nuevo campo pues como se ha propuesto antes, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los microorganismos altamente evolucionados pueden extender su fenotipo (Arundhati, Dass, Vyas, & Vyas, 2014; Hoover et al., 2011; Lambrechts, Fellous, & Koella, 2006), utilizando los recursos fisiológicos del hospedero a su favor.

3. Marco Teórico

“From my numerous observations, I conclude that these tubercle bacilli occur in all tuberculous disorders, and that they are distinguishable from all other microorganisms”.

-Robert Koch-

3.1 Tuberculosis: conceptos generales

La TB es una enfermedad infecciosa crónica causada por el patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). *Mtb* es un bacilo prototipo de la familia Mycobacteriaceae que se ha expandido en la población humana como ningún otro microorganismo bacteriano. El éxito de este patógeno se debe, en parte, a su extraordinaria capacidad de adaptarse y evadir los cambios en el microambiente intracelular a los que se enfrenta dentro de las células del huésped (particularmente macrófagos con gran capacidad bactericida) durante las diferentes etapas del curso de la infección. Estos cambios incluyen la deprivación de nutrientes, hipoxia y diferentes condiciones exógenas relacionadas con el microambiente fago - lisosomal (Cook et al., 2009; Velayati et al., 2016). El éxito de *Mtb* se debe, en parte, a la capacidad de modificar y dirigir la maquinaria celular y tisular a su favor.

La TB es una de las enfermedades más antiguas y relevantes conocidas por el hombre moderno (Daniel, 2006). Estudios comparativos entre el genoma completo de *Mtb* y la diversidad del haplotipos en el genoma humano sugieren que el origen de esta enfermedad en el humano inició con la transición demográfica del neolítico hace aproximadamente 70,000 años y que la presencia constante de este bacilo en *H. sapiens* ha seguido prácticamente toda la diversificación poblacional y la distribución del humano en la tierra (Comas et al., 2013). Esto pone en evidencia e incita a la elucubración de que, posiblemente, la prolongada coevolución de este microorganismo con nuestra especie ha permitido que las interacciones entre ambos sean sumamente complejas.

Sin embargo, a medida que la población ha aumentado, la incidencia y prevalencia de este microorganismo lo han hecho también. Actualmente, se considera uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, ya que se calcula que afecta a un tercio de la población mundial. Se estima que cada año se infectan alrededor de 10 millones de personas y en el último reporte de la organización mundial de la salud (OMS) se calcula que un estimado de 1.3 millones

de personas (rango de 1.2 – 1.4 millones) murieron de TB entre las personas VIH – negativas, y aproximadamente 300 000 muertes por TB se asociaron a la coinfección por VIH. La TB es la décima causa de muerte en el mundo y desde 2011 ha sido la principal causa de muerte por un agente infeccioso único, por encima del VIH (WHO, 2018).

Los estimados de mortalidad por TB (tasa por cada 100 000 habitantes) han mostrado que el número de muertes en personas sin coinfección por VIH es de alrededor de 17. Según el Centro Nacional de Centros Preventivos y Control de enfermedades, en México, la tasa de mortalidad de la tuberculosis pulmonar es similar a la del promedio mundial, oscilando alrededor de 1.7 por cada 100 000 habitantes (CENAPRECE, 2015).

Existen países de alta incidencia de TB. La mayoría de los casos de esta enfermedad se concentran en países asiáticos y del África (por ejemplo: Angola, Etiopía, Bangladesh, China, India, Pakistán, Brasil, Rusia, entre otros) los cuales además son en los que la tasa de mortalidad por TB es la más alta.

Resulta de interés para el actual tema de investigación, que los países pobres, con hambrunas o que han atravesado por períodos de guerra, son también en los que se encuentran la mayor cantidad de casos incidentes y de muerte por tuberculosis (Barr & Menzies, 1994; Lönnroth, Jaramillo, Williams, Dye, & Raviglione, 2009), denotando la importante asociación entre los problemas sociales, la desnutrición y el *estrés* crónico, como factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad.

3.1.1. Historia natural

Mtb es transmitida a través de la inhalación de gotas de saliva de 1 a 5 μm de diámetro (*flügge*) generadas cuando una persona con TB pulmonar o laríngea tose, estornuda o habla cargadas con Mtb. Dependiendo de las condiciones del ambiente, estas gotas pueden quedar suspendidas en el aire por algunas horas. Mtb es transmitida por el aire y se calcula que la cantidad de bacilos para que se establezca la infección es sumamente baja (entre 1 y 5 bacilos son suficientes). Cuando un huésped (inmunocompetente) tiene contacto con el bacilo, pueden suceder tres escenarios: En el primero, el bacilo no puede establecer infección. Esto ocurre en la gran mayoría de los casos (90%) en los que un individuo tiene contacto con Mtb.

En el segundo, el bacilo se aloja en estado silente dentro de las células del hospedero sin causar enfermedad aparente. En este caso, el sistema inmune es incapaz de eliminar a Mtb el cual entra en un estado de *dormancia* que le permite evitar ser reconocido por el sistema inmune del hospedero por largos períodos de tiempo. A este estado se le conoce como Tuberculosis latente y ocurre en el 95% de los casos de los sujetos en los que se establece la infección (Tufariello, Chan, & Flynn, 2003). Un estimado de 2 billones de personas (alrededor de un tercio de la población mundial) está infectada de manera latente por Mtb. En estado latente, Mtb puede permanecer dentro de diferentes tipos celulares dentro y fuera del aparato respiratorio, como determinó Barrios y cols., encontrando DNA de genes de *Mycobacterium* en tejido adiposo, células endoteliales y glándulas endocrinas como la suprarrenal, denotando la importancia de la interacción hospedero – patógeno en el desarrollo de la infección (Barrios-Payán et al., 2012; Neyrolles et al., 2006).

El tercero comprende el escenario en el que este equilibrio entre el huésped y patógeno se rompen. La probabilidad anual de desarrollar tuberculosis activa con manifestaciones clínicas es muy baja, con un estimado de riesgo del 10% a lo largo de la vida. los mecanismos de control de la infección del huésped se combinan con cambios en la fisiología de *Mycobacterium* que le permiten proliferar y diseminarse

en los tejidos del hospedero; esta forma se conoce como Tuberculosis pulmonar activa. La Tb activa es la forma menos frecuente de presentación nosológica (solo ocurre en el 5 al 10% de los sujetos con primoinfección); sin embargo, constituye la primera causa de muerte de origen infeccioso en el mundo, significando la muerte de aproximadamente 1.5 millones de personas cada año.

Debe considerarse que, del total de casos de tuberculosis latente, alrededor del 5% de estos sujetos desarrollarán TB pulmonar activa durante el curso de su vida. Diversas comorbilidades acompañadas de disfunción inmune como la coinfección por VIH y la Diabetes mellitus, representan claros ejemplos del incremento de susceptibilidad al desarrollo de TB activa, mientras que otros, como la desnutrición, la pobreza, el hacinamiento y el estrés cognitivo crónico (como ocurre durante las guerras), parecen influenciar de manera indirecta la susceptibilidad al desarrollo de esta enfermedad. Por otra parte, la edad, el sexo (exposición a hormonas sexuales, por ejemplo, durante la pubertad) y el envejecimiento ejercen un papel importante en la protección o la susceptibilidad a la infección activa. También se ha determinado que existen mutaciones alélicas relacionadas con la expresión de citocinas que resultan causales para el desarrollo de la TB(Casanova & Abel, 2013).

A pesar de que los mecanismos de inmunidad que resultan protectores en la infección por Mtb son más o menos bien comprendidos, las causas que llevan a que estos mismos mecanismos se vuelvan patogénicos apenas están siendo estudiados. Sin embargo, Mtb ha desarrollado diferentes vías de supervivencia en el hospedero humano que le permiten permanecer en estados clínicamente latentes que permanecen sin definirse (ni comprenderse) por completo.

3.1.2 TB pulmonar activa: patogénesis

Una vez que los bacilos inhalados alcanzan las regiones más profundas del sistema respiratorio, estos son fagocitados, predominantemente por macrófagos en las luces alveolares. Estos macrófagos tienen toda la maquinaria necesaria para fagocitar y eliminar bacilos, principalmente a través de la activación del fagolisosoma; sin embargo, son también un nicho y vía de entrada y diseminación de bacilos (Cohen et al., 2018). Las células dendríticas localizadas en el intersticio, próximas a los espacios alveolares también fagocitan bacilos y procesan sus antígenos para presentarlos posteriormente a linfocitos en ganglios linfáticos regionales e iniciar así respuestas adaptativas, principalmente mediadas por la inmunidad celular (Guirado, Schlesinger, & Kaplan, 2013).

La interacción inicial entre *Mtb* y el sistema inmune del hospedero parece ser mediado a través del reconocimiento de *Mtb* por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en células inmunes. El reconocimiento por macrófagos y células dendríticas de los componentes bioquímicos de la pared de *Mtb* parecen ser percibidos también por receptores de Manosa, receptores del complemento, Receptores tipo *Scavenger* y el receptor DC-SIGN, este último, presente en células dendríticas (García-Aguilar, Espinosa-Cueto, Magallanes-Puebla, & Mancilla, 2016; Hossain & Norazmi, 2013; Lv et al., 2017).

La fagocitosis es uno de los fenómenos más importante para el control de la infección. Esta es desencadenada a través de diferentes mecanismos entre los que se encuentran el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el receptor tipo *Toll-4* (TLR 4). La activación de este último provoca la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), necesarias para la eliminación de bacilos (Lv et al., 2017). Por otra parte, a través de la vía MyD-88, TLR-4 induce la translocación de NF- κ B al núcleo, lo que desencadena la síntesis de citocinas que además de activar vías necesarias para la respuesta Th1 como el IFN γ , inducen

migración de macrófagos y células dendríticas al parénquima pulmonar (Cambier et al., 2014; Salgame, 2005). La producción de IL-1 β es uno de los mecanismos fundamentales de control del crecimiento intracelular de Mtb, interesantemente, existe evidencia de que Mtb puede dirigir estos mecanismos a su favor, evitando su eliminación (López et al., 2003; Master et al., 2008). Al ser fagocitada, Mtb se localiza dentro de fagosomas en el citoplasma, un fenómeno que es seguido por la fusión de lisosomas que contienen enzimas y sustancias microbicidas. La formación de fagolisosomas es trascendental para la eliminación de Mtb, sin embargo, ésta ha desarrollado diferentes estrategias para evadir este mecanismo, por ejemplo, salir del fagosoma y mantenerse en el ambiente del citoplasma (van der Wel et al., 2007), o bien, evitando la fusión del fagosoma con el lisosoma.

3.1.2.1 Inmunidad Innata

Como se mencionó anteriormente, los macrófagos son trascendentales para el control de la infección, y la defensa contra Mtb, fagocitando y eliminando bacilos (Liu & Modlin, 2008). De particular importancia son los macrófagos alveolares, pues son los primeros en estar en contacto con Mtb. Estos macrófagos infectados, producen citocinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) cuya actividad local (autocrina y paracrina) desencadena una respuesta inflamatoria local, aumentando la expresión de adhesinas y quimiocinas necesarias para la migración de células (monocitos) circulantes al sitio de infección (Salgame, 2005).

Los macrófagos sintetizan y secretan factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF), que de manera autocrina induce la eliminación de bacilos además de activar linfocitos y promover el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Das et al., 2013; Oddo, Calandra, Bucala, Meylan, & Meylan, 2005).

Las células dendríticas, localizadas en el intersticio, captan antígenos y bacterias localizadas en la luz alveolar contigua (Wolf et al., 2008b). Estos antígenos son procesados y llevados hasta los ganglios linfáticos regionales y posteriormente son presentados a células T y a través de moléculas de coestimulación la DC induce

la activación de los linfocitos T naïve (Balkhi, Latchumanan, Singh, & Sharma, 2004). En el humano y en modelos murinos se ha calculado que este fenómeno tiene una duración de 3 a 7 días (Imagen 2), tras los cuales se considera que se activa la inmunidad adaptativa (Wolf et al., 2008a). Mtb ha desarrollado mecanismos para evadir estos fenómenos, por ejemplo, retrasando la llegada de células dendríticas a los ganglios linfáticos y evitando la presentación antigénica de manera eficiente lo que evita la activación de células T, retrasando la respuesta protectora contra el bacilo (Espinosa-Cueto, Magallanes-Puebla, Castellanos, & Mancilla, 2017; García-Romo et al., 2004). En esta etapa se forma el llamado “granuloma incipiente” en el cual se mantiene el equilibrio de eliminación de bacterias.

Por otro lado, las quimiocinas y citocinas (por ejemplo, interferón) producidas por macrófagos y neumocitos sirven como quimioatrayentes para otras células mieloides, como los neutrófilos (Wong & Jacobs, 2013). Estas células, ignoradas por mucho tiempo en la fisiopatología de la Tb han surgido en años recientes como importantes en la respuesta bactericida contra el bacilo, ya que en sus gránulos contienen péptidos antimicrobianos y cathelicidinas, además de producir especies reactivas de oxígeno que promueven la eliminación de micobacterias (Yang et al., 2012).

3.1.2.2 Inmunidad Adaptativa

Una vez activada la inmunidad adaptativa linfocitos T CD4⁺⁺ y CD8⁺⁺ se dirigen al pulmón infectado y por estímulos quimiotácticos alcanzan los sitios de inflamación, en donde se encuentran grupos de macrófagos infectados por micobacterias que son además incapaces de eliminarlas (Hernández-Pando et al., 1996). Estos linfocitos producen inicialmente citocinas consideradas del fenotipo Th1 como IL-2, IL-12 e interferón gamma (IFN- γ) las cuales tienen como función aumentar la capacidad fagocítica y de eliminación de bacilos por los macrófagos (Hernández-Pando et al., 1996; Salgame, 2005). Además de estos mecanismos clásicamente propuestos, existen otras subclases de linfocitos con gran importancia

en la respuesta inmune hacia Mtb, por ejemplo, las células Th17. Estas promueven protección a través de aumentar la expresión de moléculas quimioatrayentes como CXCL-8/IL-8 y G-CSF, las cuales promueven quimiotaxis de células inmunes y producción de péptidos antimicrobianos, necesarios para el control de la infección durante las etapas tempranas, sin embargo, en la fase crónica de la enfermedad la activación de este eje (IL-17) parece tener efectos deletéreos sobre el control de la infección, promoviendo diseminación mediada por neutrófilos (Shen & Chen, 2018; Umemura et al., 2016).

Las células T citotóxicas (CD8⁺⁺) provocan apoptosis de células infectadas como mecanismo antimicrobiano (Green, DiFazio, & Flynn, 2013; Ríos-Barrera et al., 2006). Este ambiente local de citocinas induce una respuesta de hipersensibilidad retardada en la cual se forman estructuras esféricas de macrófagos rodeados por linfocitos T y fibroblastos conocidas como granulomas, las cuales son el sello histopatológico de la enfermedad y en los cuales existe un microambiente local finamente regulado de producción de citocinas y de expresión de fenotipos de células inmunes que determinan si esta estructura genera protección, o bien, si forma parte del proceso patogénico que termina permitiendo la proliferación y diseminación de bacilos (Dorhoi, Reece, & Kaufmann, 2011; Saunders & Britton, 2007). Además de estas células, también se ha descrito que linfocitos B y neutrófilos pueden encontrarse formando parte de esta estructura, la cual es dinámica y pueden acceder y salir células constantemente (Kozakiewicz, Phuah, Flynn, & Chan, 2013).

En el humano y algunos modelos experimentales, el granuloma se caracteriza por presentar un centro necrótico, conocido como necrosis caseosa, en el cual se encuentran detritos celulares de macrófagos y una gran cantidad de lípidos, que sirven como fuente de carbón para las micobacterias que se encuentran también en este sitio de necrosis (Saunders & Britton, 2007; Tsai et al., 2006).

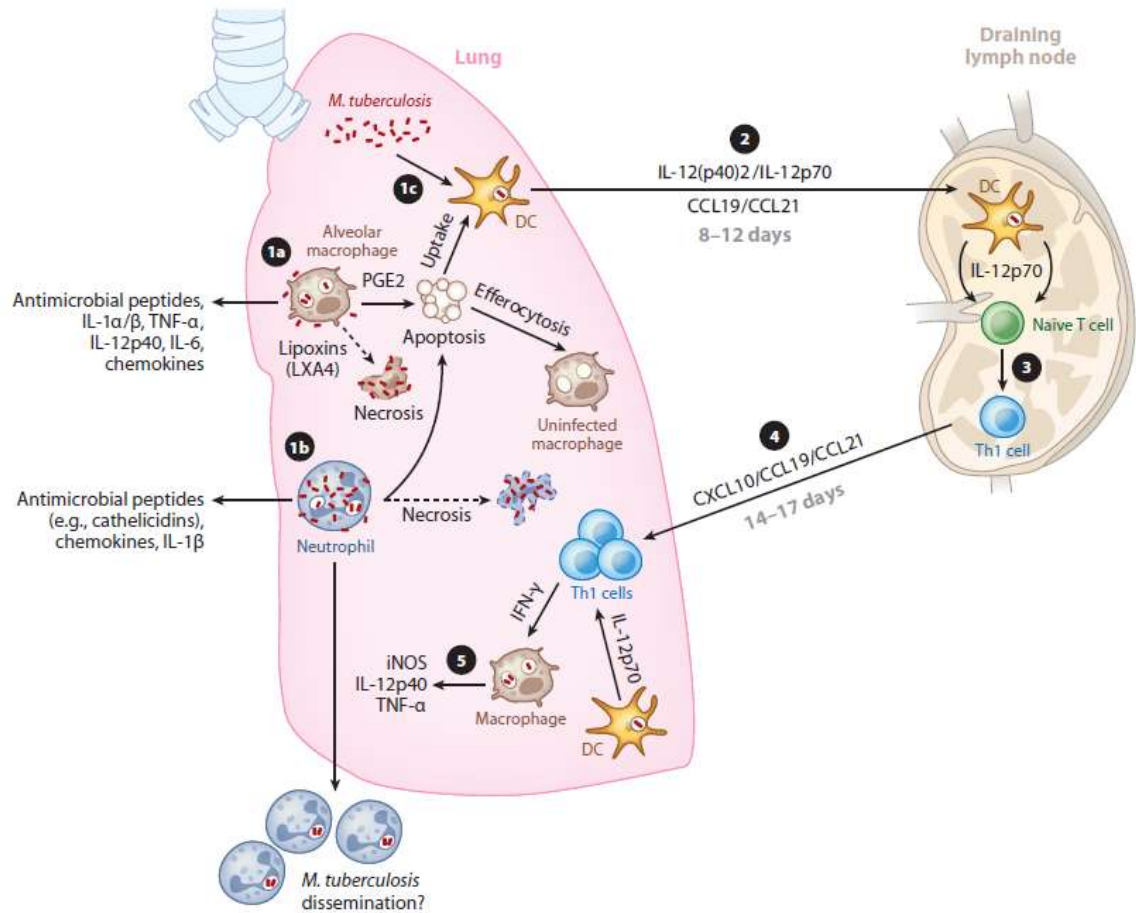


Imagen 2. Respuesta de la inmunidad celular a *M. tuberculosis* Tras la infección por aerosoles que contienen micobacterias, los macrófagos alveolares residentes (A), las células dendríticas (DC) y los neutrófilos pueden resultar infectados, llevando a la producción y secreción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. El balance de moléculas inflamatorias derivadas de lípidos de membrana como la prostaglandina (PGE2) y los tromboxanos en los macrófagos determina si estos entran en apoptosis o mueren por necrosis. Los cuerpos apoptóticos y antígenos de Mtb pueden ser captados por las DC y llevados hacia los ganglios linfáticos regionales por quimiotaxis inducida por quimiocinas, en donde presentan estos antígenos a células T vírgenes (T naïve) y las diferencian a T cooperadoras tipo 1, productoras de IFN, con efectos microbicidas. Tomado de (O’Garra, A Redford, 2013).

3.1.3 Granuloma: estructura de contención e inmunopatología

La progresión de la tuberculosis, del estado latente (subclínico) a la enfermedad activa, que culmina con la transmisión del bacilo, es determinada localmente a nivel del granuloma (O'Garra, A Redford, 2013).

El granuloma es la consecuencia anatomopatológica de la interacción entre el bacilo y las células del huésped en el sitio de infección. Desde la descripción del foco de Ghon hace 100 años, la estructura y los parámetros morfológicos del granuloma han sido extensamente estudiados (Ehlers & Schaible, 2012). Morfológicamente es caracterizado por ser una estructura conformada por un centro de macrófagos infectados, rodeados por una gran cantidad de linfocitos, neutrófilos y fibroblastos, que remodelan la matriz extracelular del parénquima pulmonar y forman estructuras de “contención” (C. da Costa, Walker, & Bonavia, 2015; Dheda et al., 2005). El perfil local de citocinas, sus receptores y factores de crecimiento se asocia inexorablemente al estado de contención y/o protección que confieren, de tal forma que pueden en un mismo pulmón infectado diferentes estadios del mismo (Ramakrishnan, 2012; Saunders & Britton, 2007): desde granulomas de contención en los cuales se produce una gran cantidad de IL-2, IL-1B, TNF α e IFN- γ en el que el balance de citocinas está orientado hacia el fenotipo Th1 (protector) hasta los granulomas en los cuales se produce una gran cantidad de factor transformante del crecimiento beta (TGF β), y un desbalance entre la respuesta Th1/Th2 que orienta el ambiente local hacia un perfil antiinflamatorio con una gran cantidad de células T productoras de IL-4 e IL-10 y finalmente una intensa producción de la citocina TGF- β , la cual ejerce potentes efectos inmunosupresores y de remodelación tisular (Hernández-Pando et al., 2006, 1996). Como consecuencia, la generación de células T reguladoras inducibles en el pulmón (Treg), en conjunto con las citocinas mencionadas anteriormente causan un ambiente local en el cual los macrófagos se vuelven incapaces de eliminar al bacilo y por lo tanto la proliferación bacteriana

aumenta, además de inducir mayor fibrosis y daño al parénquima pulmonar (García Jacobo et al., 2014).

Cuando la respuesta tisular a Mtb es sobrepasada, dado el número creciente de bacilos dentro del granuloma, finalmente, este microambiente en el parénquima pulmonar parece tornar la respuesta protectora de los macrófagos, provocando la acumulación de cuerpos lipídicos debido a una pérdida de balance entre la entrada y salida de partículas lipoproteicas de baja densidad (LDL). Esta situación se ha asociado con la presencia de células espumosas en diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, incluida la Tb (Genoula et al., 2018). Estas células, presumiblemente derivadas de macrófagos o células dendríticas que son expuestas a altas concentraciones de citocinas antiinflamatorias (Ordway, Henao-Tamayo, Orme, & Gonzalez-Juarrero, 2005). Estas células contienen en su citoplasma una gran cantidad de micobacterias y actúan como nichos de las mismas, esto en parte debido a que almacenan y sintetizan *de novo* una gran cantidad de lípidos (triacilglicerolos), que resultan reservorios cruciales como fuente de carbono para la supervivencia de la micobacteria (Russell, Cardona, Kim, Allain, & Altare, 2009). Resulta interesante que, al establecerse la infección, Mtb altera la maquinaria celular de los macrófagos dirigiendo la vía de la glucólisis hacia la síntesis de cuerpos cetónicos, lo que lleva a la perturbación de la homeostasis lipídica en el interior del macrófago, generando la formación de cuerpos lipídicos.

Finalmente, las células espumosas pierden su facultad de eliminar bacilos y parecen ser una fuente importante de citocinas inmunosupresoras (por ejemplo, IL-10), lo que los vuelve un “*caballo de troya*” para micobacterias activas (Singh et al., 2012).

3.2 Interacciones neuroinmunoendocrinas *adversas* durante el curso de la TB pulmonar

Desde hace algunas décadas, numerosas investigaciones han mostrado la importancia del SNIE en la fisiopatología de diversas enfermedades inflamatorias pues la inflamación se encuentra ligada y es regulada por las hormonas y neuropéptidos que, si son producidos de manera inapropiada, parecen provocar importantes efectos negativos en la resolución de la respuesta inflamatoria, generando lo que se conoce como *inflamación no resolutive* (Eskandari, Webster, & Sternberg, 2003a), en la cual no se logra eliminar la causa del daño tisular y por el contrario la propia inflamación se vuelve causante de enfermedad (inmunopatología). En años recientes, se ha demostrado que la producción de neuropéptidos y hormonas se encuentra alterada durante la inflamación no resolutive y cómo esta producción inadecuada puede determinar la dirección de la respuesta inmune (Goncharova, Marenin, & Oganyan, 2015). La tuberculosis no es la excepción.

Desde etapas tempranas de la infección, junto con la respuesta de fase aguda, se producen una gran cantidad de esteroides suprarrenales, sobre todo, cortisol (Oscar Bottasso, 2018). Además, se ha demostrado que la producción de hormonas pituitarias como la hormona del crecimiento (GH, Growth hormone) y la prolactina se encuentran anormalmente elevadas, sin embargo, la expresión de sus receptores es anormalmente baja, lo que ha sugerido que existe una especie de “resistencia” al efecto de estas hormonas (O. Bottasso, Bay, Besedovsky, & Del Rey, 2007). Es importante mencionar que estas dos hormonas son estructuralmente similares a citocinas de tipo 1 como la IL-2, además, sus efectos son similares a ella ya que inducen activación de linfocitos, macrófagos y amplifican la respuesta de cooperadora tipo Th1 (Shelly, Boaz, & Orbach, 2012). La aparente resistencia a estas hormonas parece evitar su papel protector; sin embargo, no ha sido explicado si esto es consecuencia de la inflamación o provocado directamente por Mtb.

Las glándulas suprarrenales se ven afectadas también durante el curso de esta enfermedad. La producción de cortisol en individuos infectados es sostenida y pierde la variación circadiana. Curiosamente, como se ha demostrado de manera experimental, los ratones cursando tuberculosis pulmonar progresiva presentan hipertrofia de la corteza adrenal, coincidiendo con la elevación sérica de cortisona, el principal glucocorticoide producido en murinos (Hernandez-Pando et al., 1995). Resulta importante este fenómeno por el hecho bien conocido de que la elevación del cortisol, promueve el “*shift*” del estado de respuesta de linfocitos T de un perfil Th1 hacia Th2, además de inhibir la actividad de otras células como macrófagos, neutrófilos y células NK (Cain & Cidlowski, 2017). Interesantemente, aun cuando la afectación a órganos extrapulmonares durante la Tb pulmonar activa, como el riñón y la glándula suprarrenal es frecuente, Bini y cols. mostraron que en la corteza adrenal existen células que, durante la infección pulmonar son intensamente inmunopositivas para las citocinas IL-1 β y TNF α , sugiriendo que durante la enfermedad, la producción de citocinas de manera sistémica y a nivel local es un inductor importante de la producción y síntesis de hormonas corticosuprarrenales, sugiriendo que existe una especie de “autonomía” por parte de esta glándula, independiente de la activación inducida por el hipotálamo durante la enfermedad (resultados no publicados).

Además del cortisol, en la corteza adrenal se sintetizan otras hormonas como los mineralocorticoides (aldosterona) y andrógenos. Resulta de interés que estos últimos también contribuyan a la susceptibilidad y la inmunopatología de la enfermedad ya que como se ha demostrado, la incidencia de tuberculosis pulmonar activa es mayor en hombres que en mujeres en relación 2:1 (Santucci et al., 2011) un dato que además se ha demostrado en el modelo experimental de este laboratorio, ya que los ratones hembra infectados no desarrollan tuberculosis en la misma intensidad que los machos, aún más si a estos se les realiza orquiectomía, muestran protección ante la infección, sugiriendo que en parte, son los andrógenos los responsables de estas particularidades (Bini et al., 2014).

En la corteza suprarrenal se producen además andrógenos débiles como la dehidroepiandrosterona (DHEA), la cual ha mostrado ejercer efectos antagónicos a los del cortisol. De manera concordante, se ha demostrado que la DHEA, cuyos efectos estimulan la inmunidad celular e innata al evitar la acción de los glucocorticoides (se desconoce el mecanismo de este fenómeno), se encuentra anormalmente baja en pacientes con TB activa, y además, cultivos de células adrenales tratadas con TGF- β disminuyen la producción de esta hormona (Bongiovanni et al., 2015; O. Bottasso et al., 2007), señalando que las citocinas producidas en el pulmón durante las fases avanzadas de la infección favorecen un estado hormonal que ralentiza la actividad inmune permitiendo la progresión de la enfermedad.

3.2.1 Trastornos en el metabolismo del agua durante la TB pulmonar

El pulmón puede ser una fuente de síntesis de una gran diversidad de péptidos y hormonas en diferentes condiciones patogénicas, que puede ser manifestado como síndromes de producción ectópica de hormonas y sustancias biológicamente activas con actividad hormonal (Said, 1974). Es generalmente aceptado que, durante la inflamación pulmonar, independiente de su origen la secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH) es una de las posibles causas de hiponatremia que acompaña a los procesos inflamatorios de este órgano (Vincent & Su, 2008).

Además de los trastornos endocrinos y hormonales mencionados anteriormente durante la tuberculosis pulmonar, desde hace más de 90 años, numerosas investigaciones y reportes clínicos han descrito alteraciones en el metabolismo del agua en individuos con TB pulmonar activa.

La disminución en la concentración de sodio asociada a la tuberculosis pulmonar fue reconocida desde la década de los 30, cuando Wrinckler y Crankshaw describieron un síndrome de pérdida de sal que no era debida a alteraciones renales ni adrenales, en sujetos cursando con Tb pulmonar (Winkler & Crankshaw, 1938).

Existe evidencia de que durante la Tb activa, estos trastornos son producidos por la producción excesiva o inapropiada de hormona antidiurética (Hill, Uribarri, Mann, & Berl, 1990); además, datos clínicos y experimentales han sugerido fuertemente que durante esta enfermedad la fuente de vasopresina se encuentra fuera del hipotálamo, en el pulmón pues como H. Vorherr describió que existe un “principio antidiurético” con las mismas propiedades antidiuréticas que la vasopresina en el pulmón de un individuo que murió por Tb pulmonar activa (Vorherr, Massry, Fallet, Kaplan, & Kleeman, 1970); sin embargo, la confirmación de estos datos así como la posible contribución de esta hormona en la patogénesis de la Tb había permanecido desconocida.

3.3 El sistema vasopresinérgico (SVp)

Los sistemas de péptidos reguladores se encuentran ampliamente distribuidos en los organismos y sus blancos celulares (mediados a través de receptores pertenecientes a la superfamilia de GPCR) son tremendamente diversos, encontrándose distribuidos en prácticamente cualquier órgano y tejido del organismo.

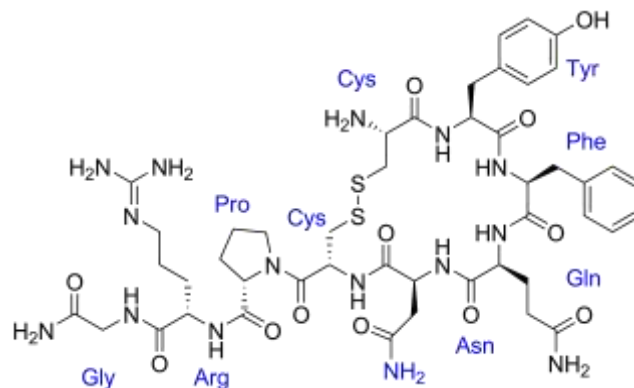
Entre estos se encuentra el sistema vasopresinérgico, conformado por el ligando Vp y al menos tres tipos de receptores de siete dominios transmembranales: los receptores V1a, V1b y V2. En general, el SVp participa en la regulación de diferentes sistemas biológicos: en el SNC ejerce efectos neuromoduladores, mientras que, en la periferia, está involucrado en respuestas inespecíficas como el control del ciclo celular, la apoptosis, la regeneración tisular y la diferenciación de células madre derivadas de la mesénquima, como adipocitos, células musculares y fibroblastos. Por otro lado, el SVp ejerce funciones específicas en algunos órganos: en los túbulos colectores del riñón, regula la translocación de las acuaporinas a la membrana basocelular de las células epiteliales controlando de esta manera el flujo de agua e iones hacia el intersticio medular renal. Este mismo efecto puede encontrarse en otros órganos epiteliales como el pulmón, en donde parece participar en la

regulación la expresión de aquaporinas y de factor surfactante en el epitelio respiratorio y los neumocitos (Brown & Chen, 1990; Rabolli et al., 2014).

Estas observaciones ejemplifican como este sistema se encuentra ampliamente distribuido y participa, coherentemente, modulando la respuesta de stress junto con otros péptidos reguladores pertenecientes a esta superfamilia. Por otro lado, resulta interesante que muchos de estos mecanismos, dirigidos a mantener los estados de homeostasis se encuentran disregulados en enfermedades en las que la inflamación crónica o la pérdida de homeostasis tisular son un factor común, por ejemplo, el cáncer, la fibrosis hepática y renal (Forti & Armelin, 2007; Heasley, 2001), así como algunas enfermedades de origen inmunológico como la autoinmunidad: en los pacientes con artritis reumatoide existe una sobreactivación de este sistema y Vp parece ser el mediador de la respuesta de stress en esta enfermedad; además de estar involucrada en la fisiopatología del Lupus eritematoso sistémico (Chowdrey, Lightman, Harbuz, Larsen, & Jessop, 1994; Il Shin et al., 2016). Esta evidencia experimental sugiere que el SVp puede tener, en dado caso, una naturaleza pleiotrópica, ya que aun cuando fisiológicamente está dirigido a mantener la homeostasis, puede ser también causante de enfermedad y desbalance tisular.

3.3.1 Vasopresina

La arginina-vasopresina (Avp), también conocida como hormona antidiurética (ADH) o simplemente vasopresina (Vp), fue caracterizada por Oliver y Shäefer en 1985. Vp es una hormona pequeña (oligopéptido) constituido por nueve



aminoácidos (NH₂-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-COOH) entre los cuales se encuentra un residuo de arginina que lo distingue de su homólogo Oxitocina, y dos residuos de cisteína entre los que se forma un enlace disulfuro que le confiere su estructura cíclica (Imagen 3).

Imagen 3. Estructura y secuencia del nonapéptido Arginina-Vasopresina (NH₂-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-COOH)

El gen de que codifica para Vp se localiza en el cromosoma 2 en el humano y 20 en el ratón y está conformado por dos intrones y tres exones, que transcriben para una pre-prohormona de 164 aminoácidos (Pre-provasopresina) que es procesada pos-traduccionalmente en el aparato de Golgi, por endoproteasas que escinden al prepropéptido en los siguientes segmentos moleculares:

1) Un péptido acarreador necesario para el adecuado plegamiento de la hormona madura, llamado Neurofisina II; 2) el nonapéptido con forma de anillo vasopresina; 3) un péptido C-terminal de 39 aminoácidos sin funciones fisiológicas conocidas llamado Copeptina; y 4) un glucopéptido señal. Estos compuestos son empaquetados en vesículas de núcleo denso (LDCV, *Large and Dense Core Vesicles*), en las que son almacenados de manera independiente. Se cree que la Neurofisina II participa en el plegamiento adecuado de Vp dentro de las vesículas. En las terminales axonales de las neuronas magnocelulares encontradas en la neurohipófisis hay alrededor de 1.47×10^{10} vesículas (LDCV) y cada vesícula contiene cerca de 85,000 moléculas de Vp (Leng & Ludwig, 2008).

El gen de la vasopresina se encuentra separado del de su homólogo oxitocina por una porción intergénica de alrededor de 200 Kpb y los genes de estas dos hormonas traducen en sentido opuesto; de hecho, se cree que OT surgió de un antecesor común (vasotocina) por eventos de duplicación génica. Resulta interesante que algunos de los efectos de estas dos hormonas son redundantes y en algunos casos, tienen efectos opuestos (Kochman, 2013).

El sitio principal de síntesis de vasopresina y el primero en describirse fueron las neuronas magnocelulares y parvocelulares del hipotálamo, encontradas en los núcleos paraventricular y supraóptico (Castel & Hochman, 1976; Richter & Schmale, 1987). Además de estos sitios clásicamente descritos se ha encontrado un gran número de células inmunopositivas para Vp y la presencia de Vp en diferentes áreas del cerebro incluido el hipocampo, la amígdala y la médula oblonga (Buijs & Swaab, 1979; Buijs, Swaab, Dogterom, & van Leeuwen, 1978). Estas vesículas vierten su contenido durante la despolarización neuronal hacia a la circulación general, manteniendo así las concentraciones séricas de vasopresina oscilando alrededor de los 5 pg/ml (Leng, Pineda, Sabatier, & Ludwig, 2015).

Además de la síntesis y secreción central, diferentes órganos han mostrado ser sitios de síntesis de Vp tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de Vp en el timo (Geenen, Legros, & Franchimont, 1987), en donde parece ejercer un efecto autocrino y paracrino, así como en la glándula suprarrenal (Guillon et al., 1998) y las gónadas también son un sitio de producción de esta hormona y las hormonas sexuales están íntimamente relacionadas con la síntesis central de Vp. Por otro lado, células linfoides y mieloides como linfocitos y macrófagos contienen Vp tanto en su citoplasma como en fracciones nucleares, lo que sugiere que contienen toda la maquinaria necesaria para sintetizar el péptido además de almacenarlo (Ekman, Gobom, Persson, Mecocci, & Nilsson, 2001; Jessop, Chowdrey, Lightman, & Larsen, 1995).

3.3.2 Receptores de Vasopresina

Los efectos biológicos de Vp son producidos por su interacción *nanomolar* de Vp con receptores de siete pasos transmembranales pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G – Protein Coupled Receptors*). Estos receptores se encuentran distribuidos de manera ubicua en el organismo (ver tabla 1) y han sido nombrados genéricamente V1a, V1b (antes V3) y V2. Vp también puede interactuar con el receptor de su homólogo Oxt (Maybauer, Maybauer, Enkhbaatar, & Traber, 2008)v.

La distribución de estos receptores en el organismo se menciona en la tabla 1. Los receptores V1a y V1b son receptores con siete dominios transmembranales que se acoplan a la proteína G subunidad q (Gq) que activa la vía de la fosfolipasa C lo que desencadena la cascada intracelular del fosfatidil-inositol, que culmina en el aumento de calcio intracelular y la consecuente activación de cinasas dependientes de calcio. Por otra parte, la unión al receptor V2 induce la expresión de adenilato-ciclasa en la membrana plasmática lo que lleva a la generación del segundo mensajero adenosina-monofosfato cíclico (AMPC).

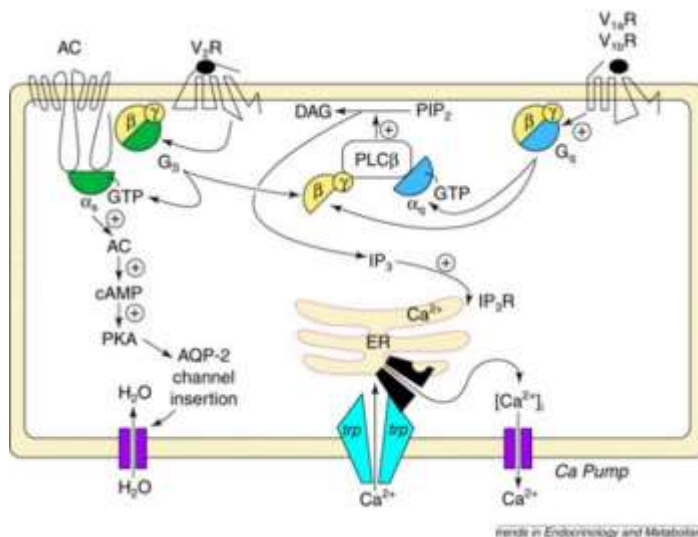


Imagen 4. Receptores de vasopresina y cascada de señalización intracelular. Tomado de Maybauer, Maybauer, Enkhbaatar, & Traber, 2008.

La expresión en la membrana celular de los receptores puede ser inducida y regulada por la propia Vp o bien por estímulos como la hiperosmolaridad o las citocinas (Bucher, Hobbhahn, Taeger, & Kurtz, 2002; Hurbin, Orcel, Alonso, Moos, & Rabié, 2002). En general los efectos biológicos de la activación de estos receptores están relacionados con la proliferación celular, la progresión en el ciclo celular, así como la activación celular mediada por calcio y AMPc. Vp es una molécula con actividad anti – apoptótica en neuronas, fibroblastos y algunas células epiteliales (Chen, Liu, Soh, & Aguilera, 2009; Chiu et al., 2002; Miller, Sandoval, Pisitkun, Knepper, & Hoffert, 2013). Sus efectos dependen también del contexto tisular, el microambiente local y el tipo de célula a la que estimule.

V1aR	V1bR	V2R
Músculo liso	Adenohipófisis.	Túbulos colectores.
Cerebro	Medula suprarrenal.	Epitelio alveolar (pulmón)
Corteza suprarrenal.	Islotes de Langerhans.	Osteoblastos
Tejido adiposo.	Tejido adiposo.	Osteoclastos.
Hepatocitos.		Linfocitos T
Osteoblastos	Linfocitos B	
Osteoclastos.		
Macrófagos		

Tabla 1. Localización de los receptores de Vp en el organismo. Adaptado de: Juul, Bichet, Nielsen, & Norgaard, 2014; Maybauer, Maybauer, Enkhbaatar, & Traber, 2008; Vincent & Su, 2008.

3.3.3 Efectos inmunomoduladores de VP

Las primeras observaciones con respecto a la asociación entre la vasopresina y la función inmune fueron hechas a mediados de los años 80 por Johnson y Torres, quienes describieron que en cultivos esplénicos depletados de células T cooperadoras, Vp es capaz de reemplazar a la IL-2 para inducir la secreción de IFN- γ (Johnson & Torres, 1985). Al mismo tiempo, el uso como control negativo de la rata Brattleboro deficiente de Vp, fue posible detectar por inmunohistoquímica la presencia de vasopresina y moléculas similares en tejidos periféricos, incluido el timo (Clements & Funder, 1986). Más tarde, se descubrió la existencia de un receptor de Vp en los linfocitos, similar al receptor V1 encontrado en el hígado (Johnson & Torres, 1988).

Años más tarde, el estudio en la rata deficiente de Vp hizo notar la importancia de la vasopresina en la activación de la inmunidad humoral y la producción de anticuerpos en las respuestas inmunes secundarias (Zakharova, Karyagina, Popova, Khagai, & Ivanova, 2001). Además, se pudo conocer que Vp participa en la maduración y salida de precursores mieloides de la médula ósea tienen niveles disminuidos de linfocitos y monocitos (Khagai, Gulyaeva, Popova, Zakharova, & Ivanova, 2003).

Observaciones funcionales con respecto a la Vp en las respuestas inmunes hicieron evidente su participación en la hipersensibilidad retardada y la inmunidad adaptativa. En linfocitos B regula de manera negativa la expresión de la IgG de superficie (Hu et al., 2003), y es necesaria para la producción anticuerpos T dependientes. Además, se requiere para el *homing* de células T CD4⁺ y CD8⁺ en la submucosa de algunos órganos (Cárdenas-Jaramillo et al., 2012).

Vp es una molécula pleiotrópica que participa en el mantenimiento de la homeostasis, pero también parece contribuir al establecimiento de ciertas enfermedades caracterizadas por inflamación excesiva y remodelación tisular tales

como el cáncer, la autoinmunidad y la misma tuberculosis (Baranowska-Bik et al., 2015; Chowdrey et al., 1995; Il Shin et al., 2016; Park & Shin, 2013).

En los sitios de inflamación, Vp induce expresión de adhesinas por las células endoteliales, provoca vasodilatación/vasoconstricción y fomenta la migración de células inmunes a los sitios de infección (Callewaere et al., 2006; Chassin et al., 2007). En macrófagos, puede incrementar su capacidad fagocítica, mientras que también modula a la baja la expresión de citocinas inflamatorias en respuesta a ciertos estímulos antigénicos, como el LPS (Chang et al., 2015; Jan, Kao, Yang, Chang, & Huang, 2017). Vp es un mitógeno de fibroblastos y durante la inflamación regula la producción de citocinas inflamatorias y de prostaglandina E2 (PGE2) en un mecanismo dosis y tiempo-dependiente. A nivel sistémico, Vp es un mediador del estado de fibrosis y remodelación tisular (Quintanar-Stephano et al., 2016; Sigal, 2004; Yan-Ping et al., 2008). En linfocitos T induce proliferación en reacciones autólogas y puede iniciar la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) (Johnson & Torres, 1985; Torres & Johnson, 1988).

4. Planteamiento del problema

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa sumamente compleja en la que las interacciones de los sistemas de respuesta del hospedero son multidireccionales y comprometen la actividad de diversos fenómenos metabólicos y homeostáticos. Durante la tuberculosis pulmonar activa, estas interacciones se vuelven exageradas o aberrantes y como consecuencia, frecuentemente, los mecanismos dirigidos a proteger al hospedero suelen resultar patogénicos (causantes de enfermedad). Este parece ser el caso del sistema neuroendocrino y su conexión con el sistema inmune, cuyas interacciones se han comenzado a estudiar en esta enfermedad y parece ser que su disrupción participa en el desarrollo de inmunopatología. Entre estas, la desregulación vasopresinérgica parece formar parte de la patogénesis de esta enfermedad, sin embargo, hasta la fecha, la posible contribución de este neuropéptido a la protección o la patogénesis de esta enfermedad permanece desconocida, sin embargo, la evidencia de su producción extra-hipotalámica durante la tuberculosis pulmonar parece sugerir un rol importante en la misma. Por ello, el presente trabajo pretende comprender a partir de una aproximación experimental la contribución de esta hormona en las interacciones *neuro – inmuno – endocrinas* durante esta enfermedad infecciosa, por la posibilidad de desarrollar nuevas terapias dirigidas al hospedero al modular la respuesta inmune modificando la actividad endocrina de este péptido.

5. Hipótesis

Durante la tuberculosis pulmonar activa, el pulmón es un sitio de síntesis de Vp lo que resulta deletéreo para el control de la infección y ocasiona inmunopatología.

6. Objetivos

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue estudiar la asociación funcional entre el sistema vasopresinérgico y la patogénesis de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo murino.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la cinética de síntesis de Vp en hipotálamo y pulmón, así como la expresión de los VpR en pulmón de ratones infectados con la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
2. Estudiar los efectos de la manipulación vasopresinérgica con agonista y antagonistas farmacológicos
 - 2.2. Carga bacilar
 - 2.3. Inflamación pulmonar e inmunopatología
3. Analizar *in vitro* el papel de la vasopresina en la fagocitosis y eliminación de bacilos por macrófagos alveolares en cultivo celulares.
 - 3.2. Efectos sobre la fagocitosis y el *Killing* de Mtb
 - 3.3. Efectos sobre la síntesis de citocinas
4. Estudiar el posible efecto directo de Vp en el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*.
 - 4.2. *Efecto en la proliferación bacilar (número de UFCs)*
 - 4.3. *Efecto sobre la actividad de la cadena de transporte de electrones de Mtb*
 - 4.4. *Efecto en el consumo de O₂*

7. Métodos

“Do, or do not. There is no Try”

Yoda

7.1 Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad del departamento de investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los procedimientos fueron realizados en un bioterio con bioseguridad nivel III (BSL-3) y de acuerdo con las guías de la Norma oficial Mexicana NOM 062-200-1999 con aprobación de comité de ética de investigación en animales (CICUAL) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

7.1.1 Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

El modelo experimental de Tb pulmonar progresiva ha sido descrito anteriormente (Hernández-Pando et al., 1996). Brevemente, la cepa de referencia de laboratorio Mtb H37Rv fue crecida en medio selectivo 7H9 enriquecido con OADC (albúmina bovina, dextrosa, ácido oleico). Para todos los experimentos descritos a continuación se utilizaron bacterias obtenidas en la fase logarítmica de crecimiento. Para la infección, ratones machos de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron anestesiados en una cámara de acrílico usando Sevofluorane y a través de una cánula de punta roma por vía intratraqueal se instilaron 100µl de PBS conteniendo un aproximado de 2.5×10^5 bacilos vivos de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa de mediana virulencia H37Rv. La infección fue seguida de manera cinética en el tiempo, realizando eutanasia a grupos de 4 ratones en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. Durante la necropsia, se tomaron los pulmones derecho e izquierdo, bazo, glándulas suprarrenales y cerebros, de los últimos se disecó el hipotálamo el cual fue almacenado en criotubos que contenían RLT plus, para asegurar la preservación de los ácidos nucleicos. Todos los órganos obtenidos para histología fueron fijados en alcohol absoluto. Los tejidos para procesamiento de biología molecular y microbiología fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados hasta su procesamiento a -80°C .

7.1.2 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón

Los pulmones izquierdos de 4 de los ratones en cada tiempo de eutanasia fueron usados para determinación de la cantidad de bacterias vivas por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Posterior a la eutanasia, los pulmones derechos de cada ratón (n = 5) fueron almacenados en Criotubos herméticos de 1.5 ml y congelados inmediatamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Fueron almacenados en ultracongeladores a -80°C hasta su procesamiento, para el que fueron homogenizados colocando una perla de Zirconia de bordes afilados y 1 mL de fosfato buffer-salino (PBS) + Tween 20. Cada tubo fue colocado en un homogenizador de tejidos (FastPrep) y a todos los tubos se les trató con tres ciclos de 20 segundos cada uno. Posteriormente, las muestras homogenadas se sonicaron durante 45 segundos, dos pulsos. Del homogenado de cada pulmón, se tomaron 30 µl y se realizaron diluciones decrecientes (1:10, 1:100 y 1:1000) en medio líquido 7H9. Se sembraron 10 µl de cada dilución y 10 µl de la muestra concentrada (1:1) , por duplicado, en placas de Petri bacteriológicas estériles previamente preparadas con ~ 15 ml de medio de cultivo sólido Middlebrook 7H10 (Difco Labs, Detroit, USA) enriquecido con ácido oleico, albumina, catalasa y dextrosa (OADC, Middlebrook Difco Labs, Detroit, USA). Las placas fueron secadas y almacenadas en incubadoras térmicas a 37°C, con humedad de 25% concentración de CO₂ de 3% durante 21 días. Se realizaron cuentas de unidades UFC bajo un microscopio estereoscópico a los 10, 14 y la lectura definitiva a los 21 días de incubación. Fueron consideradas positivas las colonias con morfología algodonosa característica de las colonias de *Mycobacteriaceae*. El número de colonias fue multiplicado por su factor de dilución y se realizó un promedio entre replicados biológicos. Se reportó el número de unidades formadoras de colonia por pulmón por ratón.

7.1.3 Preparación de tejido pulmonar para análisis histológico y morfometría

El pulmón izquierdo de cada uno de los ratones fue perfundido con ~2ml de etanol absoluto por vía intratraqueal con una jeringa de 5 ml. El bronquio derecho fue pinzado para evitar fugas de etanol. Los pulmones fueron removidos para fijarlo en 30 ml de etanol absoluto durante 72 hrs. Después fueron embebidos en bloques de parafina con ayuda un histokinette y posteriormente se realizaron cortes de 5µm de espesor, colocados sobre laminillas de vidrio y teñidos con hematoxilina y eosina para su análisis morfométrico.

Para el estudio histológico y morfometría se utilizó un analizador de imágenes (Qwin Leica, Milton Keynes). Las áreas neumónicas fueron medidas realizando un *Stich* de micrografías tomadas a 20x, y observando al microscopio se definió un área neumónica cuando se encontró infiltrado intersticial, material eosinófilo proteináceo dentro de las luces alveolares, alveolitis e infiltrado inflamatorio en las luces alveolares. Al área total de cada pulmón se restaron las áreas vacías (espacio muerto pulmonar) medidas en el mismo software. El área de neumonía se obtuvo de acuerdo con el área resultante. Se hicieron mediciones de tres pulmones por cada grupo experimental y de dos cortes consecutivos por pulmón.

7.1.4 Detección de transcritos (mRNA) y cinética de expresión de Vp en hipotálamo y pulmón

Los pulmones derechos de cada uno de 3 ratones fueron obtenidos durante la necropsia, almacenados en criotubos de 1.5 ml y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Los cerebros fueron obtenidos y se disecaron hipotálamos los cuales fueron almacenados en criotubos de 1.5 ml que contenían 1 ml de RLT-plus, los tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80°C hasta su procesamiento. A cada tubo se agregó una perla de zirconio y sílex y cada pulmón fue homogeneizado en 1 ml de medio RPMI en el equipo FastPrepR -24 (MP biomedical). La extracción del ARN se realizó con el kit RNeasyR Mini (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (A260/280). Se utilizaron 100ng de ARN de cada pulmón para la producción de cDNA mediante retro-transcripción (RT) siguiendo las indicaciones del kit Omniscript (Qiagen), posteriormente se corrió un PCR de punto final con el sistema de PCR 7500 (Applied Biosystems) para analizar la integridad del RNA se amplificó el gen de la proteína ribosomal larga (RPLPo) como house-keeping, se analizó su integridad mediante gel de agarosa al 2% teñido con SYBR green.

Del DNA complementario (cDNA) obtenido de cada muestra se realizó PCR en tiempo real (qPCR) con el sistema PCR-RT 7500 (Applied Biosystems), y el kit Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen), incluyendo en cada corrida las curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas de productos de PCR cuantificados de cada una de Vp y sus receptores, así como un control negativo. Primers específicos (Invitrogen) se diseñaron con el primer-BLAST (PubMed) para Vp, Vp1aR y Vp2R. El número de copias de cada gen fue normalizado a un millón de copias de ARNm del gen de la proteína ribosomal larga (RPLPo). Los detalles y secuencias de los primers se detallan en la Tabla 2.

Target gene	5'- 3'	Product length
Vp	Fw: GCTGCCAGGAGGAGAACTAC Rv: AAAAACCGTCGTGGCACTCG	141
V1aR	Fw: AGCATGTGTGACCAC CCT AAG Rv: GGCAGGATATCCAAGAACCCT	104
V2R	Fw: GACCCCCCTTTGTGTTGCTCA Rv: TCAGGAGGGTGTATCCTTCAT	206
TGF- β	Fw: GCTGATCCCGTTGATTTCCA Rv: GCTGAACCAAGGAGACG	100
RPLP-0	Fw: CTCTCGCTTTCTGGAGGGTG Rv: ACGCGCTTGTACCCATTGAT	108

Tabla 2. Secuencias sentido y antisentido (*Forward, Fw y Reverse, Rv*) de los iniciadores utilizados para los análisis de PCR en punto final y tiempo real. Las sondas fueron obtenidas con el PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

7.2 Experimentos de manipulación farmacológica del sistema vasopresinérgico

Para los experimentos de tratamiento farmacológico, grupos de 45 ratones fueron infectados y divididos en cuatro grupos diferentes: 2 grupos de tratamiento temprano (primer mes de infección) a los cuales se les administró el análogo sintético desmopresina (DdAVP) (0.75 mg/Kg/2/día) por vía subcutánea o el antagonista no selectivo de los receptores de Vp, Conivaptan (CVP) I.M. (1mg/Kg/2/día) por vía intramuscular. Los animales control de estos grupos fueron solución salina (para los tratados con DdAVP) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, diluido en agua inyectable como controles del tratamiento con Conivaptan. Otros dos grupos con sus respectivos controles fueron infectados y tratados a partir del día 60 hasta el día 120 postinfección, con DdAVP o CVP durante un mes (tratamiento crónico). Se realizó eutanasia de grupos de 5 ratones en los días mencionados anteriormente en la cinética del modelo experimental incluyendo para los grupos de tratamiento tardío los días 75, 90 y 120 postinfección.

7.2.1 Cuantificación de colágena en pulmón por el método de hidrólisis de la hidroxiprolina

Como una medida indirecta de la cantidad de colágeno en pulmón, la hidroxiprolina fue cuantificada como se ha descrito anteriormente y fue expresada en miligramos de colágeno por gramo de tejido seco. Todos los reactivos fueron obtenidos del kit de cuantificación de hidroxiprolina (Sigma-Aldrich). Brevemente, los pulmones derechos de 3 ratones de los grupos tratados con DdAVP o controles fueron deshidratados a 60°C e hidrolizados con 1 ml de HCl (6N) e incubados a 110°C toda la noche. Posteriormente las muestras fueron neutralizadas con NaOH (pH7), filtradas y se diluyeron 50µl de muestra en 2 ml de agua destilada. Se agregó cloramina T a cada tubo (1 ml), mezcladas e incubadas por 25 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 1 ml de ácido perclórico (3.15 M) e incubado 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente 1 ml de p-dimetilaminobenzaldehido y etilenglicol fueron agregados. Los tubos fueron colocados en baño maría a 60°C por 20 minutos y después enfriados en agua por 5 minutos.

Se colocaron las muestras y se realizó una curva standard a partir de un standard de hidroxiprolina de 10ug/ml). Cada muestra se colocó por triplicado. La absorbancia fue leída en un lector de placas a 557nm. Para determinar la concentración de colágeno, los valores obtenidos de hidroxiprolina fueron multiplicados por el factor de dilución y multiplicado por la constante 7.23, como se ha reportado anteriormente.

7.2.2 Inmunohistoquímica y morfometría de tejido pulmonar

Los pulmones izquierdos de cada ratón, fijados y embebidos en parafina se usaron para realizar la IHQ, cortes del mismo espesor mencionado anteriormente fueron montados en laminillas electrocargadas, rehidratados e incubados con el anticuerpo de interés durante tiempos entre 1 y 24 horas. Los anticuerpos se diluyeron previamente con Immuno Detector Protein Blocker/Antibody Diluent, Bio SB. Después de lavarlas con PBS, las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (PolyDetector HRP Label, Bio BS) por 45 minutos y se reveló con diaminobencidina (PolyDetector DAB, Bio SB) y contrateñidos con hematoxilina de Weigert para su posterior montaje y análisis microscópico. Para la inmunotinción de Vp se usaron anticuerpos policlonales IgG (Genetex, USA) a una dilución 1:100 incubado toda la noche a temperatura ambiente. La IHQ anti-TGF β se realizó con un anticuerpo policlonal (SantaCruz, USA) a dilución de 1:250, incubado durante una hora. Para revelar se utilizaron anticuerpos secundarios dirigidos contra IgG anti-conejo o anti-cabra, dependiendo del anticuerpo primario. Estos anticuerpos secundarios están marcados con complejos de biotina – streptavidina y fueron revelados con diaminobencidina (1:100).

7.3 Ensayos *In vitro*

Además de los efectos de Vp en el curso de la enfermedad progresiva, decidimos estudiar *in vitro* la contribución de esta hormona en uno de los fenómenos más importantes de la infección por Mtb: la fagocitosis y la eliminación de bacilos. Para ello, estudiamos el efecto dosis-dependiente de Vp en un modelo de fagocitosis (temprana) y de Killing, con una línea inmortalizada de macrófagos alveolares murinos obtenidos de la cepa Balb / c y posteriormente, estudiamos sus efectos tiempo-dependientes, además de cuantificar la producción de citocinas por los macrófagos infectados, tratados con agonistas de Vp. A continuación, se detallan los métodos realizados para estos experimentos.

7.3.1 Ensayo de fagocitosis y Killing de Mtb en cultivos celulares de macrófagos alveolares murinos (MH-S)

Macrófagos alveolares murinos de la línea MH-S (ATCC) fueron sembrados en placas de 96 pozos. En cada placa se sembraron en total 1×10^4 células por pozo en un volumen de 0.2 ml de medio RPMI complementado con SFB al 10%. Los grupos por estudiar fueron: Grupo control (vehículo), DdAVP en tres dosis diferentes: DdAVP dosis baja (10^{-8} M), media (10^{-7} M) y alta (10^{-6} M), y CVP (10^{-6} M). Para analizar el efecto del tiempo se colectaron células infectadas 1 hora y 24 horas después de la infección. Cada grupo se conformó de tres replicados biológicos y se realizó el experimento por duplicado. Los fármacos se agregaron inicialmente 1 hora previa a la infección en un volumen de 3 μ l. Para la infección se retiró el medio RPMI complementado y se agregó medio RPMI solo con Mtb de la cepa H37Rv en una MOI 1:5, durante una hora. Después se lavaron los pozos con medio RPMI/Amikacina 3 veces para eliminar bacterias no fagocitadas. Para el análisis de killing, se colectaron y lisaron las células de los pozos de la hora 1 y 24 postinfección de los diferentes grupos experimentales. Para ello, las células fueron lisadas agregando 0.2 ml de SDS 1% durante diez minutos. Posteriormente se agregó albúmina sérica bovina al 20%

(BSA) para neutralizar el SDS. Se tomaron 10 μ l de este lisado y se sembraron directamente sobre la placa, además se realizaron diluciones seriadas (0.1, 0.01, 0.001) del lisado en medio 7H9 y se realizaron UFCs como se describió anteriormente. En el grupo de 24 hrs, los macrófagos infectados fueron suplementados cada 12 horas con las diferentes dosis de DdAVP o CVP y al concluir el experimento se realizó el mismo procedimiento de preparación y siembra de bacterias en medio 7H10.

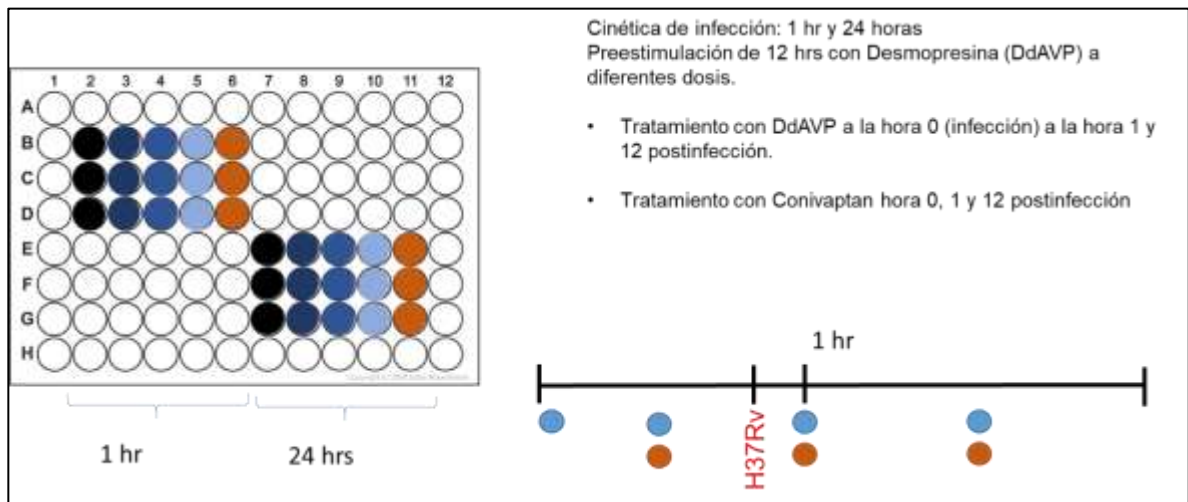


Imagen 2. Diseño del experimento 1 de *Killing*, en cultivos de macrófagos alveolares murinos (MH-S) infectados con Mtb H37Rv.

7.3.2 Ensayo de Killing y cuantificación de citocinas en sobrenadantes

Debido a los efectos encontrados en el ensayo de fagocitosis y killing con las diferentes dosis de DdAVP y CVP, se decidió estudiar el posible efecto de Vp en la eliminación de bacilos fagocitados a tiempos crónicos (24 y 72 horas) así como su efecto en la secreción de citocinas, medidas en sobrenadantes. Para ello, se sembraron $\sim 5 \times 10^5$ células de la línea MH-S por pozo en placas de 12 pozos, cada condición fue estudiada por triplicados biológicos y cada experimento se repitió por duplicado. Las células fueron contadas y sembradas (Día 0) en placas con un volumen final de 500 μ L de RPMI suplementado con SFB (10%), posteriormente, tras 24 horas, las células fueron infectadas con Mtb de la cepa H37 Rv en una MOI de 1:5, las células fagocitaron durante 1 hora, posteriormente se retiró el medio y se hicieron lavados con medio RPMI suplementado nuevo, el cual contenía 1mg de antibiótico (Amikacina) tres veces para eliminar los bacilos no fagocitados. Posteriormente se agregó medio RMPI + SFB conteniendo: 1) Avp sintética (10^{-6} M) (Sigma-Aldrich, USA) o bien CVP (10^{-6} M), diluidas en un volumen final fue de 1 ml por pozo. A cada pozo se agregó Avp o CVP cada 12 horas. Todo se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con las condiciones de O₂ y CO₂ mencionadas anteriormente. Se tomaron los especímenes (Sobrenadantes) y lisados celulares (Para UFC) a las 24 y 72 horas de haber iniciado el experimento. Los sobrenadantes fueron colectados a las 24 horas en tubos de 1ml y centrifugados a 3000 RPMI por 5 minutos, se tomaron sobrenadantes de los tres pozos y se realizaron pools, posteriormente se transfirieron a tubos de 1 ml que contenían 25 μ l de Cocktail inhibidor de proteasas (Merck, Ger.). Los lisados celulares se obtuvieron de la misma manera que se describió anteriormente. Para el análisis de Citocinas en sobrenadantes (IL-6 y TNF α) se usaron kits de ELISA y se siguieron las indicaciones del fabricante (Biolegend). La absorbancia (colorimetría) fue analizada en un lector de placas a la longitud de onda indicada por el fabricante.

7.3.3 Cultivo de micobacterias y cuenta de UFC de ensayos *in vitro*

Para la cuantificación de colonias en los ensayos de cultivo celular, se realizó la misma metodología de siembra en medio sólido (7H10 + OADC) incubado a 37°C durante 21 días. En todos los experimentos, los grupos fueron realizados por triplicados biológicos. A cada pozo se agregó SDS 1% por diez minutos y posteriormente BSA al 20% para detener el efecto lítico del SDS, se realizó pipeteo durante 10 ocasiones para homogenizar el espécimen. Posteriormente, se tomaron 30 µl de esta mezcla los cuales se usaron para realizar diluciones decrecientes en medio 7H9 como se mencionó anteriormente (arriba). Se sembraron 10 µl del concentrado obtenido de cada pozo y de cada dilución por duplicado en medio sólido 7H10. Todas las placas fueron mantenidas en incubadoras de CO₂ a 37°C durante 21 tras los cuales se realizó el conteo final de UFCs bajo un microscopio estereoscópico.

7.4 Ensayo de proliferación y crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*

7.4.1 Estudio de viabilidad, proliferación y metabolismo de Mtb incubada con Vp

Micobacterias (3×10^{-5}) de la cepa H37Rv fueron sembradas en una placa de 96 pozos con medio de cultivo líquido 7H9. Se destinaron 3 pozos al grupo control (100% de bacterias), y 3 pozos a cada grupo experimental. En el grupo control no se administró ningún tratamiento. Los grupos experimentales fueron tratados con DdAVP o Vp, para lo cual se colocaron 10 μ l de desmopresina (DdAVP) o arginina-vasopresina (Sigma-Aldrich, USA) diluidas en agua destilada estéril, en las siguientes concentraciones: DdAVP o Vp 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M. Se dejó un grupo de 3 pozos de control negativo (medio sin bacterias). El volumen final de todos los pozos fue de 270 μ l. Posteriormente, la placa fue colocada en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 7 días. Para el ensayo de proliferación, al concluir el tiempo de incubación, se agregaron 20 μ l del compuesto MTS en solución acuosa (Cell-titer 96, Promega, USA) el cual es transformado al compuesto Formazán por células metabólicamente activas. Finalmente, las bacterias de los pozos fueron sembradas en diluciones decrecientes en placas con medio sólido 7H10 y contadas a los 21 días de incubación como se describió anteriormente.

7.4.2 Cuantificación del consumo de O₂ por *Mycobacterium tuberculosis*

Como se muestra más adelante en la sección de resultados, los experimentos con sales de tetrazolio mostraron diferencia entre las bacterias incubadas con Avp sintética con relación a las cultivadas con DdAVP y las bacterias control, sugiriendo que esta hormona podría influir en el metabolismo de Mtb. Por esta razón, decidimos realizar una prueba de consumo de oxígeno utilizando un sistema comercial de detección de crecimiento de micobacterias (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*, MGIT) utilizado para el diagnóstico temprano de este microorganismo. Este ensayo está fundamentado en la utilización de frascos herméticos que contienen en la base una cantidad conocida de Rutenio Rojo embebido en silicona. Al ser un sistema cerrado, En este tubo, se agregan 7 ml de medio líquido 7H9 suplementado con OADC como se describió anteriormente. En estos tubos (N=6) se sembró la misma cantidad de bacterias del ensayo de proliferación y crecimiento de micobacterias: (3×10^{-5}) de la cepa H37Rv y se incubaron con la concentración más alta (1×10^{-6} M) de Avp en tubos de detección (N=3 y en el resto de los tubos (N=3) solo se agregó el vehículo (Solución inyectable estéril). Los tubos fueron cerrados dentro de una campana de flujo laminar. Los tubos fueron entonces colocados dentro del aparato lector (BACTEC 960, Applied Biosystems, USA)

7.5 Análisis estadístico

Los resultados mostrados son expresados como promedio \pm error standard de la media (SEM). El análisis estadístico fue realizado usando GraphPad Prism v6.0 (San Diego, CA, USA). Se evaluó la normalidad y diferencia entre datos por pruebas *t* de Student y/o ANOVA de dos vías. Para el análisis de carga bacilar, hidroxiprolina y ensayos *in vitro* fue realizado análisis de varianza (ANOVA de dos vías) seguido de análisis post-hoc de Sidak-Bonferroni para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (CI:95%).

8. Resultados

Los resultados mostrados en las siguientes secciones fueron publicados, en su mayoría, en el número especial “*Regulatory Peptides in Neuroscience and Endocrinology: a New Era Begins*” de la revista “*Frontiers in Neuroendocrine Science*” del año 2019. El artículo se puede encontrar en los apéndices de la tesis.

Los resultados se dividen en 3 secciones. En la primera “*Papel del sistema vasopresinérgico durante el curso de la tuberculosis pulmonar*” se reportan los datos que indican que la infección por Mtb induce la síntesis de Vp en el pulmón infectado, además de provocar cambios en la síntesis de Vp a nivel hipotalámico. Por otro lado, se muestran los resultados con respecto a la manipulación del sistema vasopresinérgico durante el curso de la TB con un agonista y un antagonista no selectivo de los VpR, así como su posible uso sinérgico con antifímicos usualmente usados para el tratamiento de la TB.

En la segunda sección “*estudios in vitro*” se reportan los resultados relacionados con el papel de la Vp en la fagocitosis y eliminación de micobacterias por macrófagos alveolares infectados con tuberculosis en cultivos celulares y el papel modulador de la producción de citocinas por Vp.

En la tercer Sección “*Efecto directo de Vp sobre Mycobacterium tuberculosis*” nos dimos a la tarea de investigar si Vp pudiera ejercer efectos directos sobre el crecimiento y la multiplicación de micobacterias, así como su efecto en el metabolismo de Mtb.

Apartado I:

Papel del sistema vasopresinérgico durante el curso de la tuberculosis pulmonar experimental

- a) Cinética de expresión de Vp y sus receptores

- b) Efectos de la manipulación farmacológica del sistema vasopresinérgico durante el curso de la
Tb

8.1 Cinética de infección de la tuberculosis pulmonar progresiva experimental

En el modelo murino de TB pulmonar los ratones desarrollan enfermedad progresiva, que asemeja en términos inmunopatológicos y de carga bacilar a la enfermedad activa en humanos. En este modelo se han estudiado los cambios inmunológicos y morfológicos de la inflamación y se distinguen dos fases temporales con características histopatológicas bien definidas. Al inicio de la infección, un gran número de células son atraídas hacia el parénquima pulmonar e infiltran los espacios perivasculares e intersticiales (día 3, Fig. 1B). La mayoría de estas células corresponden a monocitos circulantes y linfocitos. Esta activación de la respuesta inflamatoria y la migración de células coincide con una reducción drástica en el número de bacterias en el pulmón (Fig. 1A). A medida que avanza la infección, aumenta el infiltrado perivascular y al día 7 es claramente visible que un gran número de linfocitos migran al sitio de infección (Fig. 1B, arriba, derecha) por lo que se deduce que la inmunidad celular (adaptativa) ha comenzado a ejercer su función. Posteriormente al día 14, comienza la formación de estructuras formadas por cúmulos de macrófagos rodeados por linfocitos que asemejan los granulomas humanos. Al día 21, estos granulomas son sumamente activos y productores de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como la IL-2 e IL-12 así como IFN γ , por lo cual se considera que este día de la cinética de infección es el de máxima protección (Fig. 1B, abajo, izquierda). Posterior a esto, la respuesta inmune torna hacia un fenotipo Th2, con una alta producción de IL-4 y grandes cantidades de TGF β en el pulmón. Esta situación impide el control adecuado del crecimiento bacilar y se observa un incremento drástico en la cantidad de bacterias cultivables en el pulmón, aunado al depósito de material proteináceo en la luz alveolar, infiltrados intra-alveolares (alveolitis) y zonas de consolidación pulmonar (Fig 1B abajo, derecha): se desencadena un proceso neumónico, que lleva a la muerte del animal.

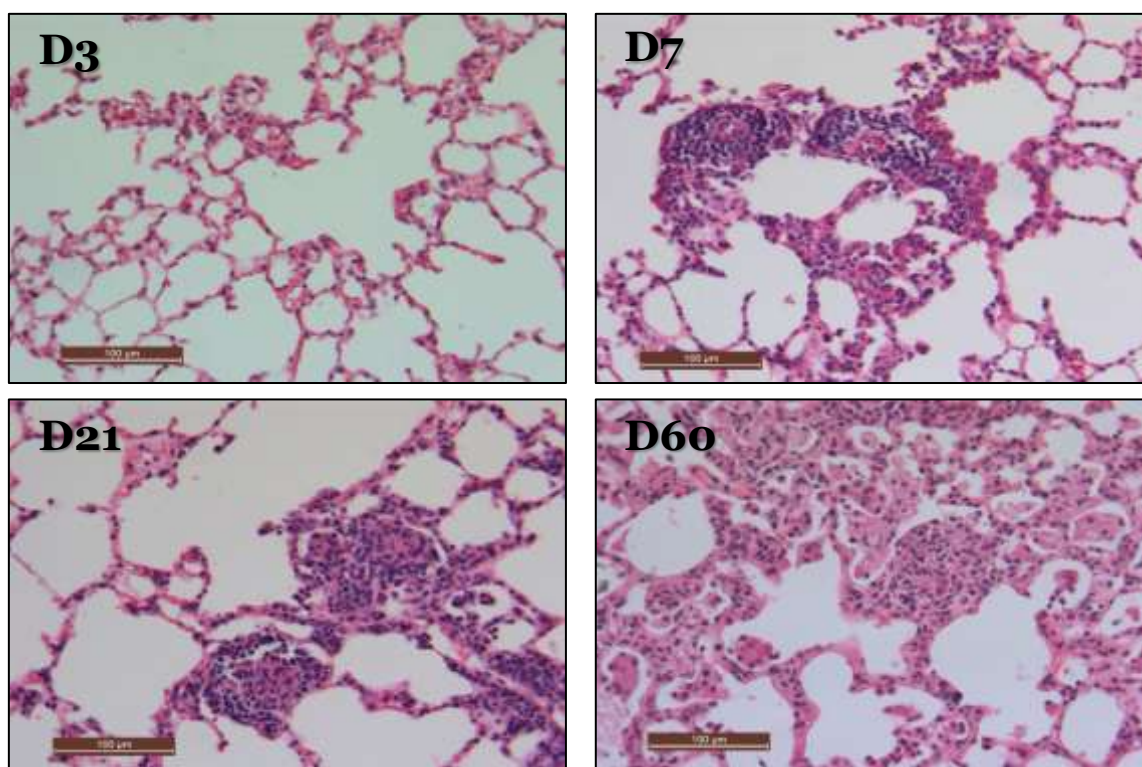
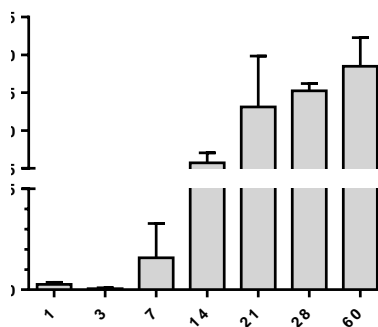


Figura 1. Cinética de infección y cambios histopatológicos característicos de la TB murina (A) Carga bacilar en lisados de pulmón de ratones infectados con $\sim 2.5 \times 10^5$ bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv) por vía intratraqueal. (B) Micrografías representativas (Hematoxilina y Eosina, 200x) de los cambios histopatológicos en el pulmón mostrando 4 días representativos de la cinética (Días 1, 14, 21 y 60).

8.2 Cinética de expresión de transcritos en hipotálamo como consecuencia de la TB pulmonar.

El hipotálamo es uno de los sitios principales de síntesis de Vp. Además, el hipotálamo participa en las respuestas de stress y se ha descrito que tanto citocinas periféricas como PAMPS pueden estimular a las células del PVN y el SON, como respuesta estas células sintetizan y secretan Vp a la circulación (Giusti-paiva et al., 2003; Matsunaga & Miyata, 2000; Palin et al., 2009). Además, durante la TB pulmonar activa, la infección pulmonar induce cambios en la transcripción de citocinas como IFN y TNF en el hipotálamo (Lara-Espinosa Jacqueline, tesis de maestría). Con estos antecedentes, se analizó la cantidad de mRNA de Vp en el hipotálamo obtenido de ratones infectados durante la cinética temporal del modelo. La cantidad de mRNA del gen de Vp en el hipotálamo comenzó a aumentar desde el inicio de la infección y notamos un aumento paulatino en la cantidad de mRNA que tuvo su acmé el día 21 postinfección, coincidiendo con el final de la fase protectora (Th1) de la TB en el modelo experimental; posteriormente, la cantidad de transcritos disminuye paulatinamente; sin embargo, se mantuvo elevado durante todo el segundo mes de disminuyendo brevemente al final de la infección en comparación con los controles no infectados (Fig. 1A).

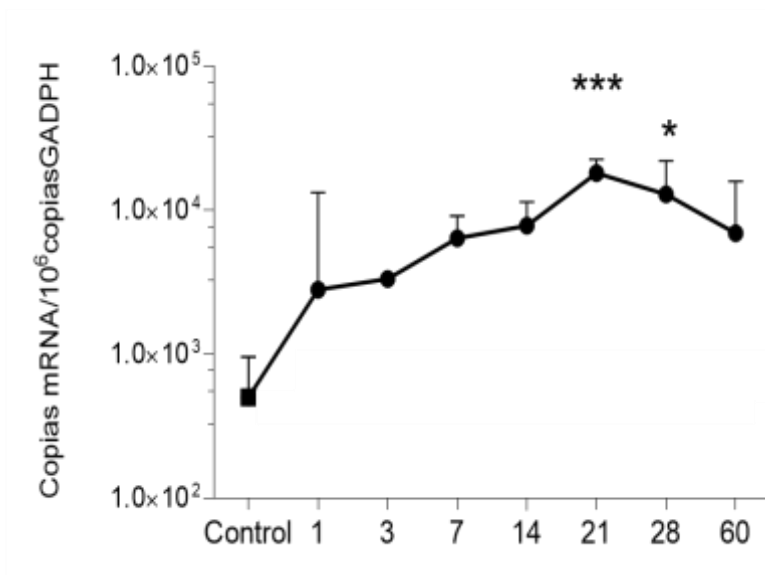


Figura 2. La infección pulmonar induce cambios en la expresión de Vp en hipotálamo (A) Cuantificación absoluta del número de transcritos de Vp en relación con el gen housekeeping GAPDH, en ratones no infectados (n = 3, control) y en la cinética temporal de infección en el modelo murino. Análisis estadístico: prueba *t* de Student, (*P <0.05, ***P <0.001).

8.2.1 Respuesta vasopresinérgica en el pulmón durante el curso de la infección

Siguiendo la hipótesis planteada, y los datos mencionados anteriormente con respecto a la presencia de un principio antidiurético en el pulmón tuberculoso, se estudió la expresión de mRNA en homogenados de pulmón de ratones sanos y de ratones infectados. No se detectó mRNA de Vp en pulmón de ratones no infectados, sin embargo, se detectaron en los pulmones infectados desde el inicio de la infección, aumentando al día 14 (coincidiendo con la formación de granulomas) e incrementando de manera marcada al día 60 postinfección (Fig. 3A, B). Es de importancia mencionar que en esta fase comienza el edema alveolar en conjunto con alveolitis y se generan áreas extensas de infiltrado inflamatorio y neumonía, llevando a la muerte del animal. Debido a la presencia de mRNA y al aumento en su cantidad siguiendo la progresión de la infección, este hallazgo fue confirmado por inmunohistoquímica. Anteriormente se había realizado la descripción de un compuesto con la misma actividad antidiurética que la Vp en el pulmón infectado. Por medio de inmunohistoquímica se determinó que dicho compuesto es vasopresina dado que se observó inmunopositividad en células del parénquima pulmonar desde la etapa temprana de la infección en la que se observó positividad en la superficie de neumocitos y en el interior de algunas células inflamatorias que morfológicamente fueron definidas como macrófagos alveolares. Es interesante que a medida que estos se organizaron en forma de granulomas, la positividad fue más marcada (Fig. 3C). Durante la fase crónica de la infección (a partir del día 60), se observaron macrófagos vacuolados (espumosos) intensamente positivos para Vp, la cual además se colocalizó con la neumonía, sugiriendo su posible papel en esta fase de la enfermedad (Fig. 2D).

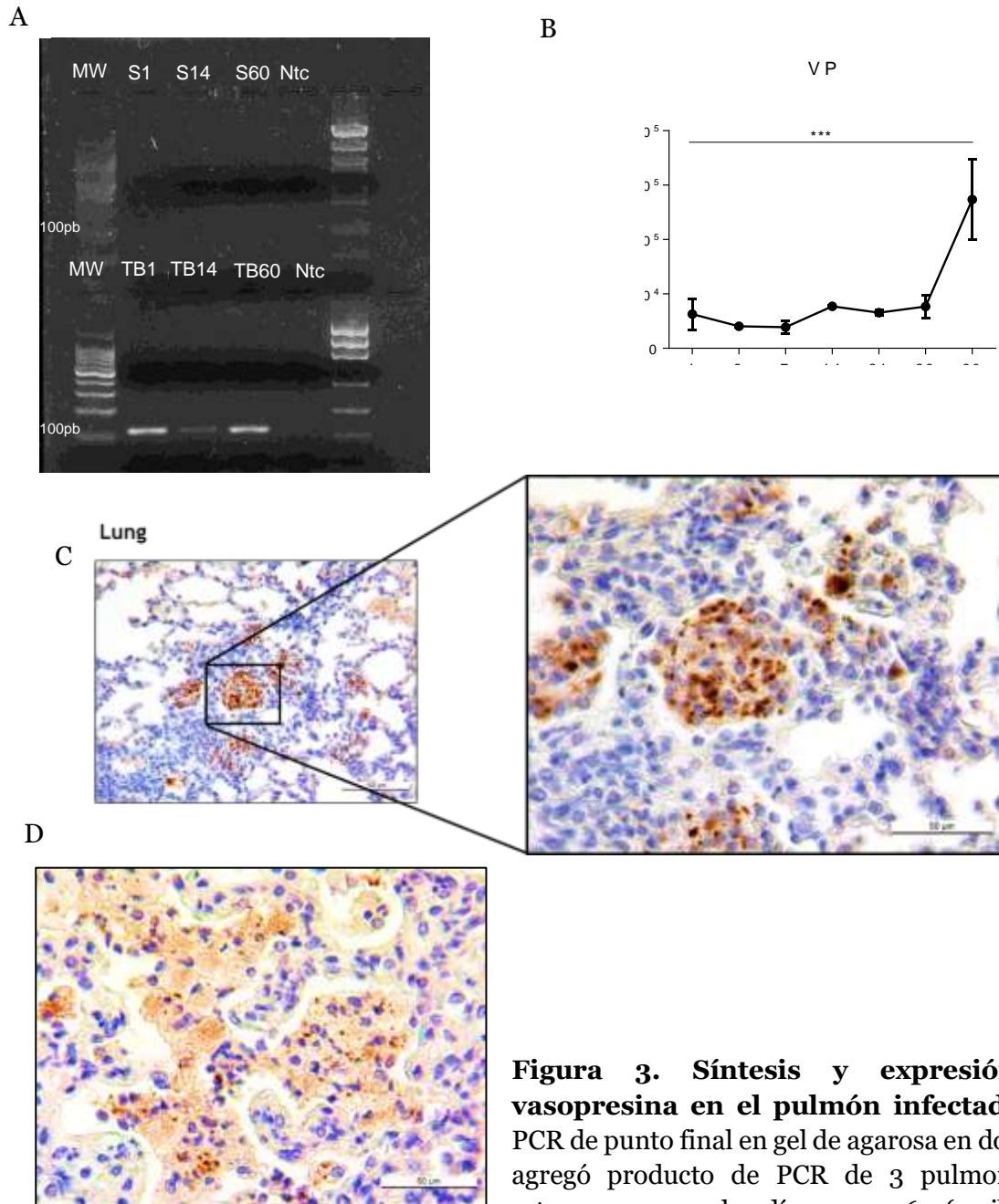


Figura 3. Síntesis y expresión de vasopresina en el pulmón infectado. (A) PCR de punto final en gel de agarosa en donde se agregó producto de PCR de 3 pulmones de ratones sanos en los días 1, 14 y 60 (arriba) y 3 pulmones de ratones infectados en los mismos días posteriores a la infección (abajo). El carril de MW indica el peso molecular, Ntc indica los controles negativos de reacción. (B) Cantidad de RNA mensajero (mRNA) de Vp en homogenados de pulmón de ratones infectados (n = 3) durante el curso de la tuberculosis pulmonar activa. (C) Inmunohistoquímica Anti-Vp representativa del día 28 en donde se observan células inmunopositivas morfológicamente compatibles con macrófagos formando parte de granulomas. (D) Células espumosas con morfología de macrófagos espumosos, positivos para Vp por IHQ, día 60. Análisis: *t* de Student, ANOVA de una vía *** P < 0.001.

8.2.3 Expresión de mRNA de los receptores de Vp en pulmón infectado

Debido al hallazgo de la presencia de un compuesto con la misma estructura molecular de VP en el pulmón durante la TB pulmonar, se estudió la expresión del mRNA de sus receptores. Como se mencionó anteriormente, los receptores de Vp están ampliamente distribuidos en diferentes órganos y tejidos del organismo. Anteriormente se había descrito la expresión del receptor V2 en el pulmón y su relación con la inflamación en este órgano (Guetta et al., 2012), además de la modificación en su expresión durante la endotoxemia (Grinevich, Knepper, Verbalis, Reyes, & Aguilera, 2004). En el pulmón sano e infectado, detectamos mRNA tanto del receptor V1a como del receptor V2. Durante el curso de la TB, se notaron cambios en la cantidad de mRNA de V1aR, sin embargo, no hubo ninguna tendencia y su expresión fue constante (Fig. 4A); por el contrario, la cantidad de mRNA del V2R disminuyó desde el inicio de la TB y se redujo drásticamente al final de la infección, a partir del día 28 y 60, en donde se mantuvo esta tendencia (Fig. 4B)

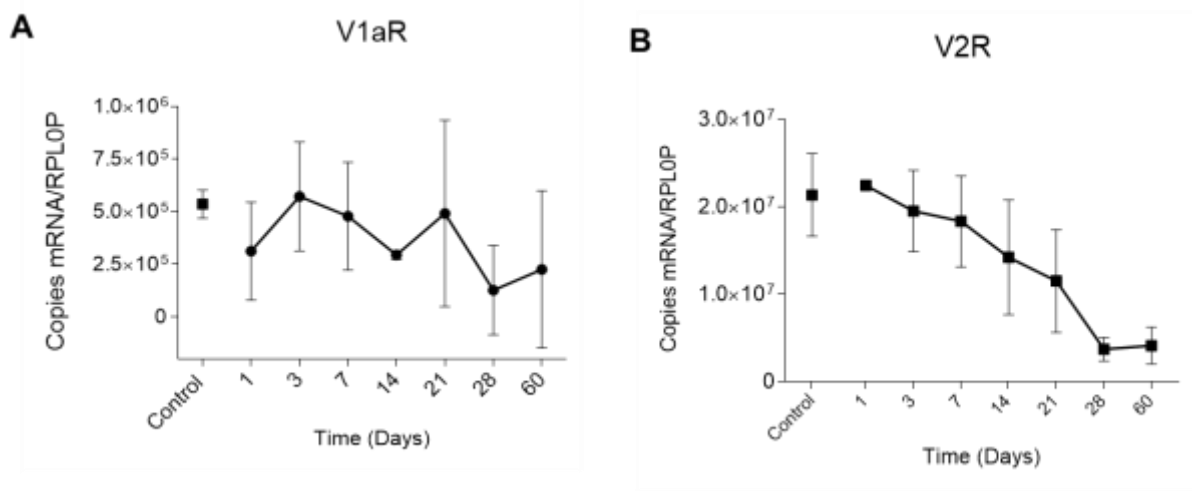


Figura 4. Expresión absoluta del mRNA de los receptores V1a y V2 en el pulmón durante la cinética de infección. (A) Número de copias de mRNA del receptor V1a de ratones sanos (cuadro, control) y cinética de expresión durante las fases aguda y crónica de la infección, (B) Expresión cinética del receptor V2 en pulmón de ratones sanos e infectados (n = 3), prueba *t* de Student, ANOVA de una vía.

8.3 Efectos de la manipulación farmacológica del sistema vasopresinérgico en la progresión de la TB pulmonar.

Debido a los hallazgos anteriores y las observaciones previamente descritas sobre los efectos inmunomoduladores de Vp, decidimos explorar sus posibles efectos en la enfermedad. Para ello, grupos de ratones infectados fueron tratados con el agonista sintético desmopresina (8-deamino-arginina vasopresina, DdAVP). DdAVP es un potente agonista de los receptores V2 con menor afinidad por el receptor V1a y prácticamente nula para el receptor V1b que además tiene una vida media prolongada, con respecto a la vasopresina. El tratamiento con DdAVP durante el primer mes, en la fase aguda de la Tb murina, no mostró efectos en la histopatología, sin embargo, al continuar el tratamiento por dos meses se encontró un mayor número de bacilos en los pulmones de estos ratones, sugiriendo que el efecto de Vp podría notarse más intensamente en la fase crónica (Fig. 5A). Dado que la fase progresiva de la enfermedad se asocia con un fenotipo Th2 y menor control bacilar, además de encontrar una mayor cantidad de Vp en esta etapa, grupos de ratones fueron infectados y después de 2 meses de infección (a partir del día 60, en adelante) fueron tratados con DdAVP. La cuantificación de las UFCs en homogenados de pulmones de estos ratones mostraron un marcado aumento en la carga bacilar tras 15 días de tratamiento con respecto a los controles, este efecto se mantuvo hasta el día 30 de tratamiento; sin embargo, a los 2 meses no hubo diferencia significativa con respecto a los controles tratados con vehículo (Fig. 5B).

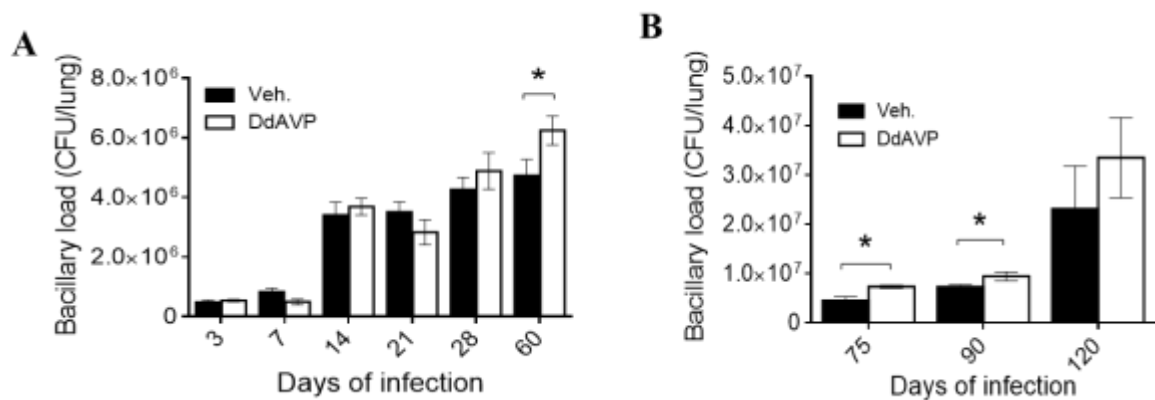


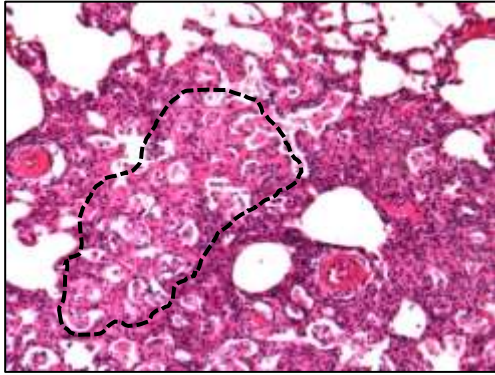
Figura 5. Efecto de la administración del agonista DdAVP sobre la carga bacilar en pulmón. La DdAVP (0.75 mg/Kg/día) se administró diario, por vía subcutánea durante dos meses. (A) Durante la fase inicial de la enfermedad, desde el día 1 postinfección hasta el día 60, (B) durante la fase crónica, desde el día 60 hasta el 120. Los controles (barras negras) recibieron solución salina fisiológica. Los resultados se presentan como el promedio de 3 pulmones, las barras de error indican Desviación Estándar (D.E.). ANOVA de dos vías, corrección de Sidak-Bonferroni para comparaciones múltiples, * P < 0.05.

8.3.1 El tono vasopresinérgico aumentado incrementa la fibrosis pulmonar

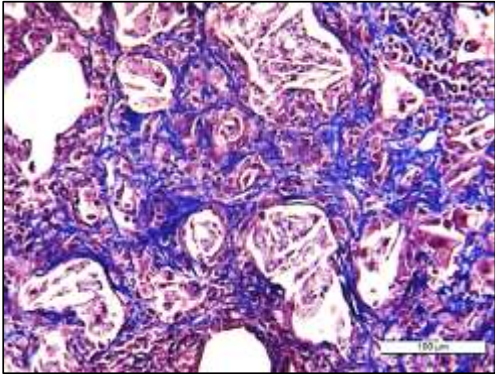
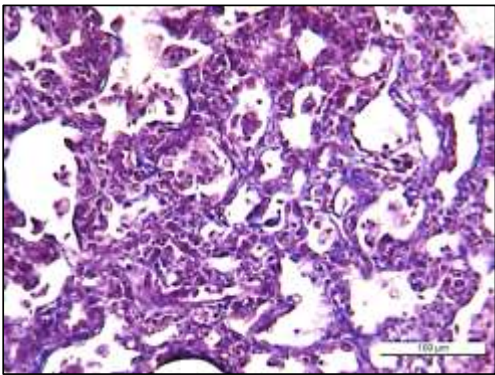
Anteriormente había sido demostrado que Vp se encuentra involucrada en situaciones de remodelación y fibrosis, ya que sus receptores se encuentran en fibroblastos, en los que induce proliferación, además de estar involucrada en fenómenos de fibrosis anormal y remodelación tisular en otros órganos como el corazón, hígado y riñón (Abel, Wittau, Wieland, Schultz, & Kalkbrenner, 2000; Quintanar-Stephano et al., 2016; Tahara, Tsukada, Tomura, Yatsu, & Shibasaki, 2008)

Los ratones tratados con DdAVP durante la fase crónica de la TB pulmonar mostraron, además de un incremento en la carga bacilar, lesiones macroscópicas y amplias regiones microscópicas con parches de fibrosis y oclusión vascular acompañada de remodelación endotelial (Fig. 6A). Estas lesiones fueron analizadas a mayor detalle por medio de tinción con el método tricrómico de Masson, que permite distinguir la colágena colorada de azul. Los pulmones de ratones tratados con DdAVP mostraron extensas áreas de depósito de fibras colágena en el intersticio pulmonar, localizada en la cercanía de macrófagos vacuolados y en las áreas neumónicas (Fig. 6B). Este hallazgo fue corroborado por medio de la cuantificación indirecta por el método de hidrólisis de hidroxiprolina el cual mostró un aumento significativo en la cantidad de colágena en pulmones de ratones tratados con DdAVP durante la fase crónica (Fig. 6C).

A



B



C

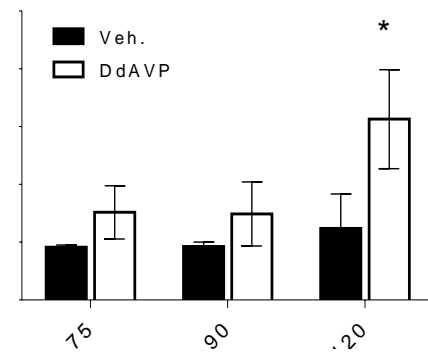


Figura 6. Efectos histopatológicos del tratamiento con DdAVP durante la fase crónica de la TB A) Micrografía representativas (Día 120, aumento 100x) de pulmón infectado y tratado con DdAVP, se muestra punteada el área de fibrosis. (B) Micrografías representativas (Día 120, 200x) de pulmón infectado (arriba) y pulmón tratado con DdAVP (abajo) teñidos con el método tricrómico de Masson, que evidencia las extensas áreas de fibrosis (color azul) encontradas en pulmón durante la fase progresiva. (C) Cinética de cuantificación de colágeno en los pulmones control (barras negras) y tratados con DdAVP (barras blancas) por el método de hidrólisis de la hidroxiprolina. ANOVA de dos vías, corrección de Sidak para comparaciones múltiples. * $P < 0.05$

8.3.2 Inducción de TGF β en el pulmón de ratones tratados con DdAVP

Durante la Tb pulmonar activa, la remodelación de la matriz extracelular y la fibrosis son dos fenómenos que ocurren, en parte, como consecuencia del desbalance inmunológico que resultan deletéreas para el mantenimiento del estado funcional del pulmón, ocasionando grandes áreas de daño pulmonar y pérdida de la función en caso de remisión de la infección. Por otra parte, se ha demostrado que la citocina inmunosupresora TGF β es en gran parte responsable de la regulación de la fibrosis (Meng, Nikolic-Paterson, & Lan, 2016), y se encuentra elevada en las fases crónicas del modelo de Tb pulmonar progresiva (Hernández-Pando et al., 2006; Hernandez-Pando et al., 1997).

Por los hallazgos anteriores y debido a los antecedentes previamente publicados sobre el efecto profibrótico de VP induciendo la síntesis de colágena dependiente de TGF- β en otros tejidos, y por el hecho de que en los sitios de fibrosis se encontraba una gran cantidad de macrófagos espumosos que fueron intensamente positivos para Vp por inmunohistoquímica, estudiamos si este efecto pudo haber sido mediado por esta citocina con propiedades antiinflamatorias y profibróticas, que además es característica de las fases avanzadas de la Tb pulmonar. Como se observa en las micrografías de inmunohistoquímica, los pulmones de ratones tratados con DdAVP mostraron una mayor intensidad de marcaje para TGF- β 1, tras 60 días de tratamiento (Día 120 post-infección). Interesantemente esta positividad fue muy evidente en macrófagos espumosos y células epiteliales (Fig. 7A). Debido a el mecanismo a través del cual Vp induce el aumento de esta citocina no se conoce, estudiamos el efecto de VP en la cantidad relativa de mRNA de TGF- β . Sorpresivamente en los pulmones de ratones tratados con DdAVP esta indujo expresión de aproximadamente 1.5 veces más de transcritos que los ratones control tratados con vehículo (Fig. 7B).

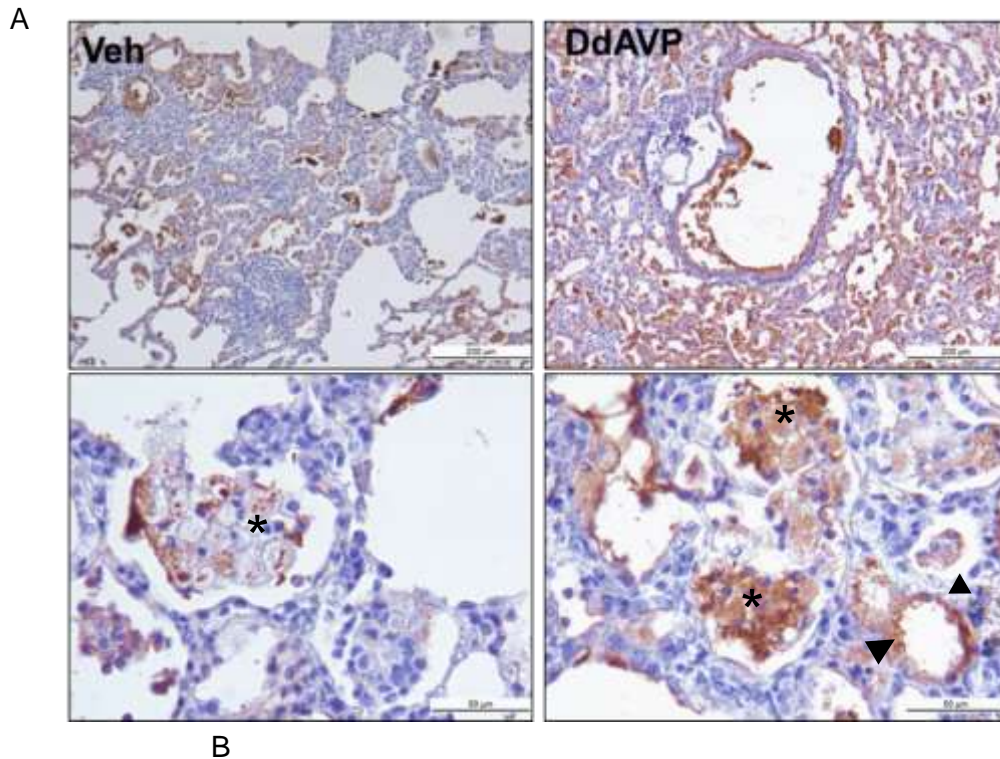


Figura 7. Efectos inmunopatogénicos del tratamiento con DdAVP en la producción TGF- β en pulmón. Micrografías representativas de IHQ anti-TGF β 1 en pulmón de ratones infectados en el día 120 postinfección (A, izquierda) y en ratones infectados tratados durante dos meses con DdAVP a partir del día 60 postinfección (A, derecha). Los asteriscos señalan macrófagos vacuolados (espumosos) y las cabezas de flecha señalan células epiteliales del tracto respiratorio inferior. (B) Cuantificación relativa de transcritos de mRNA de TGF- β 1 calculado por el método de 2-deltaCt, en pulmones de ratón tratados por 1 y 2 meses (día 90 y 120) con DdAVP (barras blancas) en comparación con los controles no tratados (barras negras). Análisis: ANOVA de dos vías, corrección de Sidak-Bonferroni (* $P < 0.05$)

8.3.3 El antagonismo de los receptores de Vp reduce la carga bacilar

Los hallazgos anteriores y la evidencia en la literatura sugieren que Vp promueve efectos antiinflamatorios y de reparación tisular, por lo tanto, animales infectados fueron tratados todos los días durante 2 meses con el antagonista competitivo CVP, administrado durante la fase tardía de la enfermedad en donde los efectos negativos de la actividad vasopresinérgica fueron más marcados. El tratamiento con CVP resultó en una disminución en la carga bacilar notable desde el día 30 de tratamiento (90 postinfección) y contrario a lo que sucedió en los ratones tratados con DdAVP, el efecto del tratamiento sobre la carga bacilar incrementó marcadamente al final del experimento, resultando en la reducción de aproximadamente la mitad la carga bacilar en los pulmones de los ratones tratados (Fig. 8A).

Con este antecedente, y debido a la alta tasa de falla terapéutica con los tratamientos antifímicos convencionales, se evaluó el posible efecto sinérgico de CVP con antibióticos usados rutinariamente como primera línea de tratamiento antifímico (Rifampicina, Isoniazida y etambutol). Los ratones fueron infectados y al día 60 postinfección se inició el tratamiento diario con vehículo (DMSO), CVP, AB o CVP + AB. Notablemente, el tratamiento con Cvp en conjunto con antibióticos tuvo efecto en los primeros 15 días de tratamiento, a diferencia del tratamiento con los tres antibióticos solos, provocando una reducción más rápida de la carga bacilar; sin embargo, el efecto sinérgico notado en esos primeros días, desapareció a medida que avanzó la enfermedad y no se encontró diferencia entre el tratamiento con antibióticos solos en comparación con los tratados en combinación con CVP (Fig. 8B).

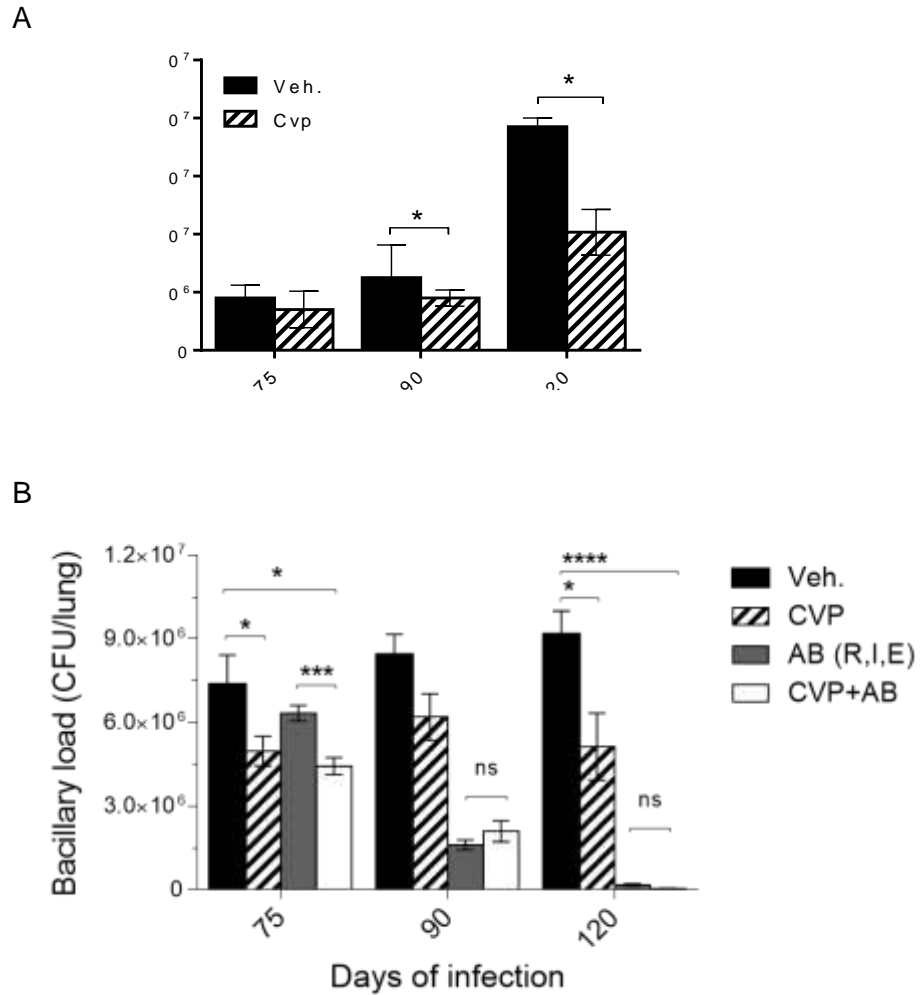


Figura 8. Efecto del antagonista CVP en la progresión de la TB pulmonar. (A) Carga bacilar en pulmón de ratones infectados (barras negras) y tratados con CVP (barras con diagonales, 1mg/Kg/día) durante dos meses. (B) Carga bacilar en pulmón de ratones infectados (Barras negras), tratados con CVP (barras diagonales), tratados con antibióticos de 1^a línea: isoniazida, rifampicina y etambutol (barras grises) y tratados con la combinación de CVP + antibióticos durante 2 meses. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías, corrección de Sidak - Bonferroni para comparaciones múltiples. (*P <0.05, ***P <0.001, ****P <0.0001)

8.3.4 El tratamiento con CVP reduce la extensión de la neumonía

Además de la carga bacilar, uno de los puntos más sobresalientes de la TB pulmonar es el desarrollo de daño mediado por el sistema inmune. Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, una gran parte del daño al parénquima pulmonar es causado por inmunopatología, más que por la simple actividad de Mtb (Rook & Hernandez-Pando, 1996; Saunders & Britton, 2007). Entre las consecuencias de este, se encuentra la formación de áreas caracterizadas histológicamente por el engrosamiento del intersticio alveolocapilar por infiltrado inflamatorio, la pérdida de la permeabilidad selectiva y salida de material proteínico hialino hacia la luz de los alvéolos acompañada de infiltrado de células mononucleares y macrófagos en los espacios alveolares (Arriaga, Orozco, Aguilar, Rook, & Hernández Pando, 2002).

Uno de los objetivos ideales de la terapia adyuvante al tratamiento con antibióticos es que debe modular el daño generado por el propio sistema inmune y sus consecuencias patogénicas. En este sentido, debido a la reducción en la carga bacilar por el CVP en sinergia con AB de primera línea, se evaluó la extensión de las áreas neumónicas en pulmones de los grupos experimentales planteados en el diseño del experimento de sinergia mencionado anteriormente. En ellos, encontramos que el tratamiento combinado de CVP y antibióticos redujo significativamente el porcentaje de pulmón afectado por neumonía (Fig. 9A y B).

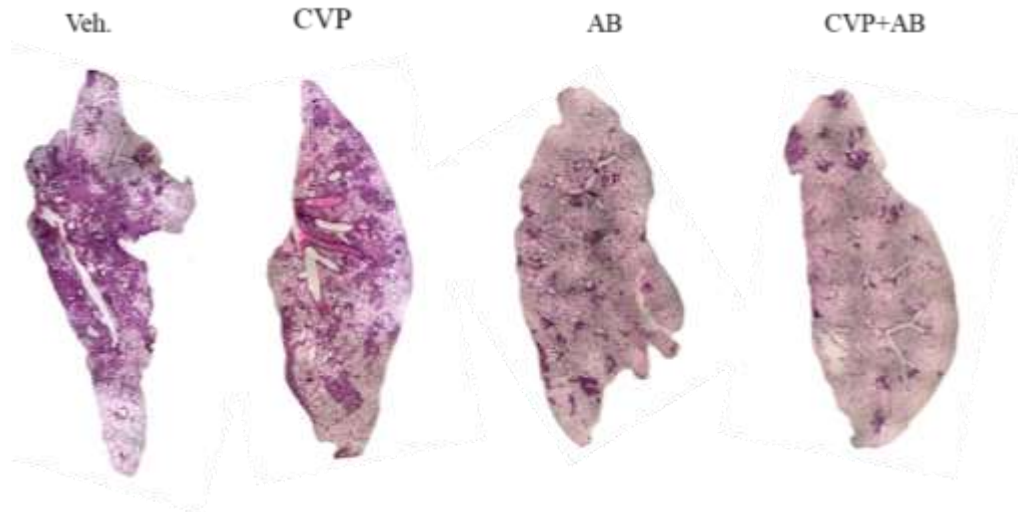
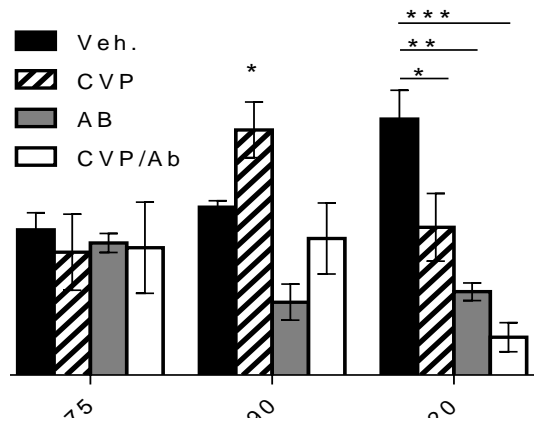


Figura 9. Efecto sinérgico del CVP en conjunto con AB de primera línea sobre la extensión de las áreas neumónicas. (A) Área de extensión de pulmón afectada por neumonía representada como porcentaje en pulmones de ratones infectados tratados con vehículo (Barras negras), tratados con CVP (barras con rayas diagonales), con antibiótico (barras grises) y CVP + AB (barras blancas). (B) Imágenes representativas de reconstrucción automatizada de pulmón de ratones infectados de los diferentes grupos experimentales. Las columnas representan la media y las barras la Desviación Estándar (D.E.). Análisis: ANOVA de dos vías con corrección de Sidak - Bonferroni para comparaciones múltiples (*P <0.05, ***P <0.001, ****P <0.0001)

Apartado II: Experimentos *In vitro*

- a) Infección de cultivos celulares de macrófagos alveolares murinos

- b) Ensayos con cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*

8.4 Efecto de Vp en la eliminación de micobacterias por macrófagos alveolares (MH-S) en ensayos de Killing.

Debido a que los macrófagos presentaron intensa inmunopositividad y dada su importancia en la patogénesis de esta enfermedad, decidimos realizar experimentos en cultivos de macrófagos alveolares murinos (MH-S) infectados con Mtb y tratados con tres diferentes dosis del agonista sintético DdAVP o el antagonista CVP. Tras 1 hora de infección en MO previamente tratados con ambos fármacos, no se observaron diferencias en la cantidad de bacterias fagocitadas; sin embargo, tras 24 horas de infección, la administración repetida (cada 12 horas) de dosis elevadas de DdAVP provocó un aumento en el número de bacilos dentro de los macrófagos, en un mecanismo aparentemente dosis dependiente (Fig. 8A). Por el contrario, el tratamiento con Conivaptan resultó en la disminución en la carga bacilar que fue estadísticamente significativo con respecto a la dosis más alta de DdAVP. En un segundo ensayo, debido a los efectos tiempo y dosis dependiente observados, se realizó un experimento agregando la dosis más alta de Avp y la dosis más alta de CVP; este experimento se siguió hasta las 72 horas. Como era esperado, la carga bacilar aumentó con la incubación con Avp y la disminución con CVP de la carga bacilar fue evidente a las 72 horas (Fig. 10B). Con el fin de explicar este efecto, se analizó por ELISA la cantidad de IL-6 y TNF α , dos citocinas clave para el control y eliminación de micobacterias. Concordantemente, se observó que los macrófagos tratados con Avp secretan de manera inapropiada estas citocinas, con una tendencia hacia la inhibición de estas (Fig. 10C y D, respectivamente). Resalta mencionar que *in vitro*, los macrófagos alveolares no sintetizan Vp durante los tiempos analizados en los experimentos (Fig. 10E).

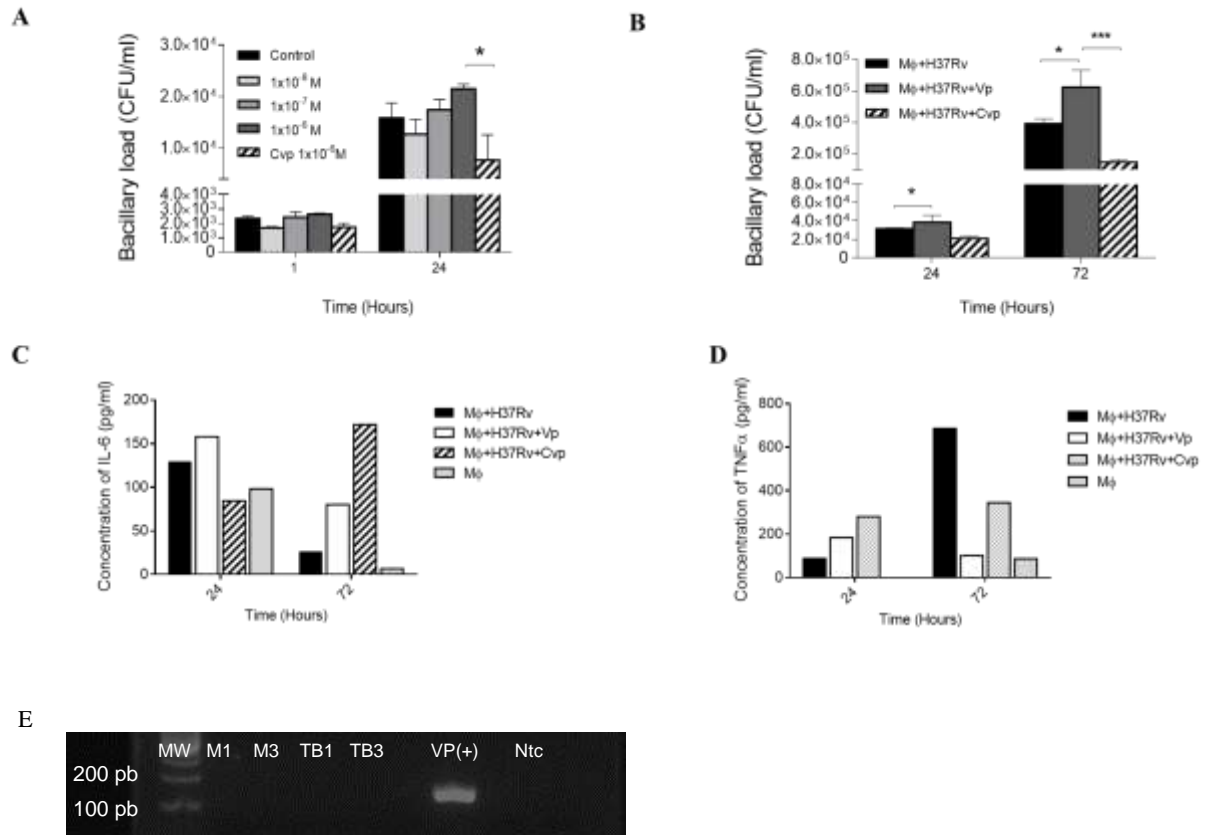


Figura 10. Efecto de Vp sobre la fagocitosis y Killing de Mtb. (A) Cantidad de bacterias intracelulares en macrófagos MH-S tratados con las diferentes dosis de DdAVP y CVP 1 hora y 24 horas después de la infección con Mtb de la cepa H37Rv, MOI 1:5. (B) Cantidad de bacterias intracelulares a las 24 y 72 horas con la dosis más alta de Avp (Sigma-Aldrich) y CVP. Los fármacos se agregaron al inicio del experimento y cada 12 horas el medio se suplementó con fármaco. Las columnas representan la media y las barras el error estándar de la media (E.E.M). (C, D) Concentración de citocinas en sobrenadantes de los macrófagos infectados en el experimento cuantificado por ELISA, las barras representan el promedio de dos lecturas de pools de sobrenadantes obtenidos de los experimentos. (E) PCR de punto final de cDNA obtenido de lisados de macrófagos control a las 24 y 72 horas (M1 y M3) y en macrófagos infectados (TB1 y TB3). El control positivo se tomó de la curva de amplicones de Avp. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías, corrección de Sidak – Bonferroni para comparaciones múltiples (* $P < 0.05$)

Sección III:

Efectos directos de Vp sobre el
metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*

- a) Metabolismo y proliferación
- b) Consumo de Oxígeno

8.5 Efectos de vasopresina sobre *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis ha coevolucionado con nuestra especie durante al menos de 70 000 años, por lo que ha desarrollado mecanismos complejos de adaptación al medio hostil que encuentra dentro de las células del organismo. Mtb es altamente adaptable al medio en el que se encuentra.

8.5.1 Efectos sobre el metabolismo de Mtb

Los resultados anteriores no excluyeron la posibilidad de que Mtb pudiera responder al estímulo vasopresinérgico. Por ello, decidimos sembrar bacterias en medio líquido 7H9, en placas de 96 pozos y estimularles con Vp liofilizada (Sigma-Aldrich) o DdAVP, a diferentes concentraciones e incubarlas durante 7 días en agitación a 37°C como se mencionó en la metodología. Como se mencionó anteriormente, la DdAVP es un isómero de la vasopresina con la arginina en posición D (a diferencia de la posición L de la arginina de Vp) que le confiere además de una vida media prolongada, una mayor afinidad por el receptor V2 (Thibonnier, Coles, Thibonnier, & Shoham, 2001; Vilhardt, 1990). Tras siete días de incubación con uno u otro fármaco, encontramos que al agregar sales de MTT-tetrazolio. Las bacterias que recibieron el compuesto liofilizado de Vp transformaron una mayor cantidad de este compuesto al metabolito formazán, leído a 490 nm; sin embargo, este fenómeno no ocurrió al administrar DdAVP a las micobacterias, en donde se mantuvo la transformación de MTT (Fig. 11A). Esta reacción, es llevada a cabo en la bacteria por una reacción de reducción del compuesto NADH y es irreversible, por lo que la intensidad de la positividad indica el número de bacterias vivas y de manera indirecta, mayor actividad metabólica en las micobacterias. Para corroborar este efecto se tomaron 100 µl de cada uno de los pozos experimentales y se sembraron en diluciones en medio 7H10. No se encontraron diferencias en el número de bacterias entre los pozos de los diferentes grupos experimentales (Fig. 11B)

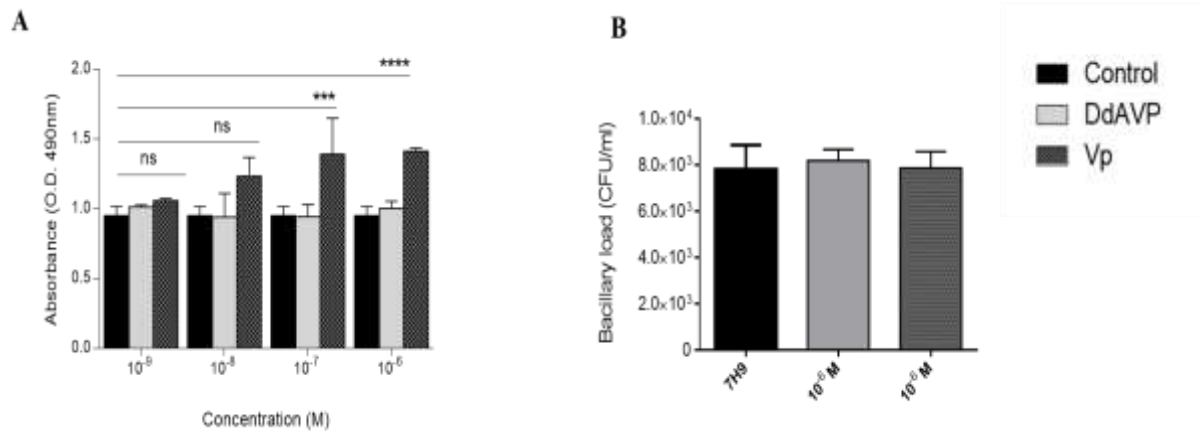


Figura 11. Efectos directos de Vp en cultivos de Mycobacterium (A) Transformación del compuesto MTS a formazán por oxidación, intensidad de la absorbancia como medida de la actividad metabólica de las bacterias incubadas en los pozos control (barras negras), tratados con DdAVP (barras grises) y tratados con Avp (barras con textura) a diferentes concentraciones molares. (B) Cantidad de bacterias en los pozos de los diferentes grupos experimentales, tomadas al día 7 después del inicio del experimento y sembradas en medio 7H10. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías, corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (*P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001).

8.5.2 Efecto de VP sobre el consumo de O₂ de *Mycobacterium tuberculosis*

Por los resultados anteriores con respecto a la transformación de MTS a formazán, decidimos analizar el consumo de O₂ por micobacterias incubadas con Avp durante 10 días, todos los días se tomaron lecturas de la fluorescencia de rutenio rojo en un sistema cerrado de detección de consumo de oxígeno específico para Mtb. Como se observa en la figura 12, las micobacterias comienzan a proliferar y su actividad metabólica se puede detectar desde el día 3 después del inicio del ensayo. La tasa de consumo (indicada por la intensidad de fluorescencia) se mantiene en una meseta hasta el día 7, y después hay un pico de consumo notado al día 10 del inicio del ensayo. Por el contrario, Mtb tratadas con Avp no presentan este incremento inicial de consumo de Oxígeno, presentando una especie de estado “silente”, no es hasta el día 7 que estas bacterias comienzan a consumir O₂ de manera muy intensa, tanto que igualan a las bacterias sin tratamiento en 1 día. Posteriormente no se observa diferencia al final del ensayo. Es importante mencionar que ni en el ensayo de metabolismo de formazán ni en el ensayo de consumo de O₂ encontramos diferencias en el número de bacterias cultivables.

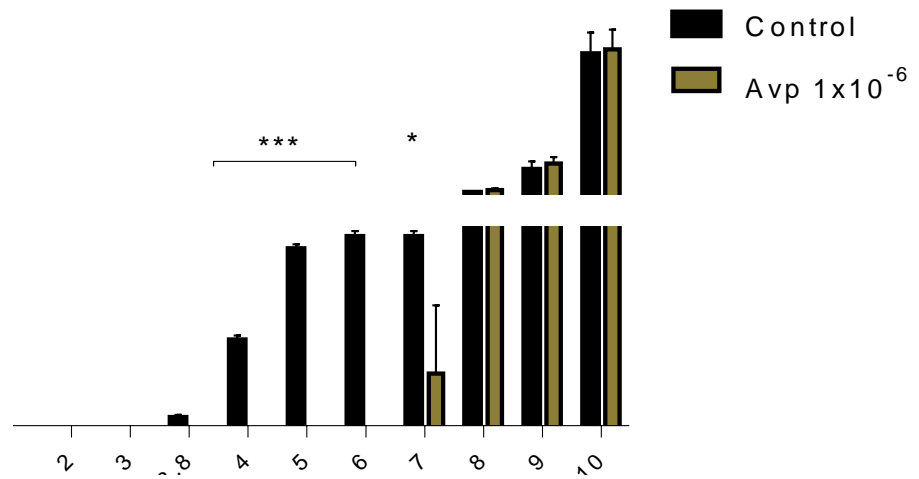


Figura 12. Consumo de O₂, determinado por la fluorescencia de rojo rutenio en el sistema de detección de crecimiento de Mtb (MGIT) La fluorescencia indica mayor cantidad de CO₂ producto del metabolismo de Mycobacterium. Las columnas negras representan control y las doradas representan las bacterias incubadas con la dosis alta de Avp. Análisis: ANOVA de dos vías corrección de Sidak para comparaciones múltiples (*P <0.05, ***P <0.001).

9. Discusión y conclusiones

Los hallazgos mostrados en el desarrollo de esta tesis muestran cómo durante la tuberculosis, una enfermedad inflamatoria crónica de etiología infecciosa, diversos sistemas de respuesta del huésped están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis, incluidos los llamados “péptidos de respuesta al stress”. La patogénesis de esta enfermedad es un claro ejemplo de la constante comunicación neuroinmunoendocrina, y de cómo los mecanismos de protección pueden volverse patogénicos. Por otra parte, los resultados sugieren que entre las funciones del sistema vasopresinérgico se encuentra el mantenimiento de la homeostasis tisular del pulmón, pero que, durante el establecimiento del estado patogénico, este sistema puede convertirse en un nodo de interacción que lleve, paulatinamente, al deterioro de la respuesta del huésped ocasionando más rápidamente la pérdida de la función y fibrosis anormal, dos de las consecuencias patológicas de la inflamación.

Ontogénicamente, las células del epitelio pulmonar son diferenciadas a través de diferentes estímulos provenientes, en gran parte, de células neuroendocrinas originadas en las crestas neurales que migran hacia los primordios embrionarios del pulmón; de la misma forma, la presencia de células linfoides al tejido pulmonar (particularmente células linfoides innatas de tipo 2, con fenotipo antiinflamatorio) es influenciada por la secreción de péptidos reguladores por los llamados cuerpos *neuroepiteliales*.

Durante la vida adulta, se requiere de la influencia de hormonas y neuropéptidos para su adecuada función, incluyendo la actividad inmunológica de este órgano, la cual es influenciada por células linfoides asociadas con la anergia y la limitación de la inflamación, conocidas como ILC de tipo 2 (Bordon, 2016; Engelmann, Landgraf, & Wotjak, 2004). Este fenotipo inmunológico genera que el pulmón sea un sitio de privilegio inmune ya que es necesaria la tolerancia hacia inmunógenos de la más diversa naturaleza y origen; sin embargo, esta misma característica lo convierte en un sitio de entrada y alojamiento de microorganismos altamente evolucionados como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*.

Vp es una hormona con efectos ubicuos, específicos e inespecíficos, que ejerce actividad biológica sobre células epiteliales, mesenquimales e inmunes, además de participar regulando la respuesta de reparación tisular a través de efectos biológicos en células como los fibroblastos. Por otra parte, Vp parece participar en fenómenos pleiotrópicos ya que la disregulación vasopresinérgica se ha descrito en diferentes enfermedades inflamatorias crónicas.

En este y otros modelos experimentales, Vp parece jugar un papel importante en la regulación de la resistencia al *Stress inflamatorio* e infeccioso. Sus efectos sobre la fagocitosis, la producción de citocinas por los linfocitos y su actividad inductora de la quimiotaxis, así como su papel en el control de la apoptosis, se encuentran asociados a enfermedades en las que el exceso de tono vasopresinérgico ha sido reportado, sugiriendo que la disfunción vasopresinérgica podría influir la patogénesis en diversas infecciones y/o inflamación no resolutive, en donde la desregulación de la homeostasis tisular es un factor común, ejemplos de ello se pueden encontrar en el cáncer (George, Capen, & Phillips, 1972; Heasley, 2001; Ripoll, Garona, Hermo, Gomez, & Alonso, 2010), la autoinmunidad (Chikanza & Grossman, 1998; Chowdrey et al., 1995) y enfermedades infecciosas agudas y crónicas (Bevilacqua, 1994; L. H. A. da Costa et al., 2016; Hoorn et al., 2012).

No menos importante es la asociación que existe entre la inmunosupresión mediada por el stress, la vasopresina, y su relación con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades infecciosas/inflamatorias crónicas (Elenkov & Chrousos, 1999; Eskandari, Webster, & Sternberg, 2003b). Interesantemente, vasopresina es uno de los principales mediadores de las respuestas de stress cognitivo al ser coactivador del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, sobre todo en períodos de stress crónico en donde parece mediar la producción de cortisol.

Diversas enfermedades crónicas cursan con un “tono” vasopresinérgico aumentado, particularmente, la inflamación pulmonar de diferentes etiologías se acompaña de esta característica hormonal (Park & Shin, 2013). Los experimentos

descritos en esta tesis pretenden ser una primera aproximación a los efectos patogénicos de la vasopresina en la Tb pulmonar.

En este trabajo de tesis, hemos demostrado que, como se había descrito con anterioridad, existe un principio antidiurético en la tuberculosis pulmonar y confirmamos que este principio corresponde a Vp como se puede observar en la inmunohistoquímica; la intensidad y el número de células positivas para Vp en pulmón incrementó a medida que avanzó la enfermedad correlacionándose con la extensión de la neumonía lo que sugiere que podría estar relacionada con la progresión de la enfermedad. Interesantemente, los macrófagos vacuolados fueron intensamente positivos para la hormona, este hallazgo resulta de importancia pues se correlaciona con la presencia de Mtb en este tipo de células, que funcionan como verdaderos “nichos” de bacterias durante la fase avanzada de la enfermedad. Por otra parte, hemos podido detectar transcritos de vasopresina en el pulmón, y la expresión de estos correlaciona con la inmunohistoquímica, lo que sugiere que su síntesis se encuentra también en el pulmón. Los efectos de Vp son altamente dependientes de la dosis, el tiempo de acción y el tipo de órgano o célula en la cual tenga su efecto. Anteriormente, se ha descrito el efecto antiinflamatorio de Vp en el pulmón, ya que inhibe la producción de IL-6 (Boyd, Holmes, Wang, Roberts, & Walley, 2008). Además, en órganos como el hígado y en fibroblastos, vasopresina es inductor de fibrosis en un mecanismo dependiente de TGF β (Quintanar-Stephano et al., 2016; Tahara et al., 2008). Con estos antecedentes y con el objetivo de determinar las consecuencias funcionales de la manipulación vasopresinérgica, decidimos tratar con el agonista sintético DdAVP, debido a que su vida media es más prolongada que Vp y el antagonista no selectivo de los receptores CVP.

Los resultados encontrados sugieren que Vp tiene efectos antiinflamatorios/profibróticos en el pulmón durante la TB activa, que, si bien son necesarios para mantener el equilibrio en la respuesta hacia Mtb, el tono vasopresinérgico elevado de manera sostenida produce efectos deletéreos en la enfermedad. Contrariamente, la inhibición de los efectos de vasopresina resultó en

menor carga bacilar en los pulmones de ratones tratados y aparentemente este efecto es mediado por una menor cantidad de TGF β . Sin embargo, son necesarios más experimentos ya que no ha sido posible dejar claro aún si esta respuesta fisiológica sea “aprovechada” y alterada por la micobacteria, de tal manera que le permita establecer de manera exitosa la infección, o bien, si la propia bacteria produzca una molécula similar a Vp, que provoque efectos biológicos aberrantes que desregulen los mecanismos del sistema inmune, resultando a favor de la infección. Tampoco ha quedado claro cuál o cuáles son los mecanismos que subyacen a la disminución en la carga bacilar al bloquear la vasopresina *in vivo* o *in vitro*, ya que podrían ser causados por un menor índice de fagocitosis al bloquear su efecto, reduciendo el número de bacterias, o bien, por la inhibición de efectos inmunosupresores de vasopresina (mediados por TGF β) en el microambiente pulmonar.

Finalmente, estas observaciones incitan a la elucubración de si Vp, en conjunto con otros péptidos y neurotransmisores, podrían estar induciendo presión sobre la micobacteria de tal forma que provoque cambios en su fenotipo, que puedan influir en su virulencia. Este punto parte del hecho de que Vp pertenece a un enorme grupo de péptidos reguladores que se han mantenido en la evolución desde hace más de 500 millones de años (Kochman, 2013). Los resultados mostrados con respecto a la mayor transformación del formazán por las micobacterias cuando fueron tratadas con Vp abre la posibilidad de que exista algún tipo de receptor ancestral en Mtb y dados los hallazgos de vesículas positivas para Vp en macrófagos espumosos, sugieren la posibilidad de que la bacteria haya logrado aprovecharse de estos mecanismos del huésped para causar inmunopatología y aprovechando estos factores hormonales a favor de su propio metabolismo. Esta serie de posibilidades hipotéticas no han sido demostradas; pero forman parte de las posibles perspectivas de este trabajo. Por otra parte, cabe mencionar que los efectos específicos de Vp en esta infección sobre la función inmune no han sido dilucidados. Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* administrando agonistas y antagonistas solo permiten tener un panorama acerca de los posibles efectos deletéreos de esta hormona durante la TB, sin embargo, son necesarios más experimentos para

determinar el mecanismo responsable de estos. En esta serie de experimentos solo se utilizaron ratones macho. Se sabe que los efectos de Vp son dependientes del sexo, pues los machos expresan una mayor cantidad de Vp de manera constitutiva en relación con las hembras, además de que existen diferencias en la expresión y localización de los VpR. Sería interesante analizar estos efectos en hembras infectadas. Sin embargo, es interesante que VP parezca influenciar la enfermedad de tal forma que existe una especie de espada de dos filos, induciendo mayor “tolerancia” al estrés inflamatorio, pero teniendo como consecuencia a largo plazo la pérdida de control de la infección. Además, no ha quedado claro el mecanismo a través del cual Vp puede inducir cambios metabólicos en Mtb.

Todos estos puntos son necesarios para comprender a profundidad la asociación entre el sistema vasopresinérgico y su relación con enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas, sin embargo, es claro que a través de la modulación de este y otros péptidos reguladores se podrían desarrollar nuevas estrategias de terapia dirigida al huésped.

10. Tabla de abreviaturas

AA	Aminoácido
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ADH	Hormona antidiurética (<i>Antidiuretic Hormone</i>)
AQP	Aquaporina
Avp	Arginina - Vasopresina
BCG	Bacillo <i>Calmette / Guerin</i>
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cDNA	DNA complementario
CRF	Factor liberador de corticotropina
Cvp	Conivaptan (Antagonista no selectivo V1a / V2)
DC	Célula dendrítica
DdAVP	Desmopresina
Etam	Etambutol
GH	Hormona de Crecimiento
IGF-1	Factor de crecimiento Insulinoide de tipo 1
IL-1 β	Interleucina 1 - Beta
IL - 6	Interleucina 6
IL - 10	Interleucina 10
IFN γ	Interferón gamma
ILC	Células linfoides innatas
INH	Isoniazida
KDa	Kilodalton
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MGIT	<i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>
NHH	Hormona neurohipofisiaria
NF κ -B	Factor Nuclear Kappa – B
NOS	Sintasa de Óxido Nítrico
OT	Oxitocina
OMS	Organización Mundial de la Salud
Tb	Tuberculosis

TLR-4	Receptor tipo Toll - 4
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF β	Factor transformante del crecimiento Beta
OADC	ácido oleico / Dextrosa / Catalasa (suplemento para Mtb)
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PBS	Fosfato Buffer – Salino
PAMPS	Patrones moleculares Asociados a Patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Prolactina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Rif	Rifampicina
SFB	Suero fetal Bovino
SON	Núcleo supraóptico del hipotálamo
SVp	Sistema vasopresinérgico
Vp	Vasopresina

11. Bibliografía

- Abel, A., Wittau, N., Wieland, T., Schultz, G., & Kalkbrenner, F. (2000). Cell cycle-dependent coupling of the vasopressin V(1a) receptor to different G proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32543–32551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002171200>
- Arriaga, A. K., Orozco, E. H., Aguilar, L. D., Rook, G. A. W., & Hernández Pando, R. (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 128(2), 229–237. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01832.x>
- Arundhati, S., Dass, H., Vyas, A., & Vyas, A. (2014). *Toxoplasma gondii*. <https://doi.org/10.1111/mec.12888>
- Balkhi, M. Y., Latchumanan, V. K., Singh, B., & Sharma, P. (2004). Cross-regulation of CD86 by CD80 differentially regulates T helper responses from *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen-activated dendritic cell subsets Abstract : We report that stimulation of *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen- and tu. <https://doi.org/10.1189/jlb.1003476.1>
- Baranowska-Bik, A., Kochanowski, J., Uchman, D., Litwiniuk, A., Kalisz, M., Martynska, L., ... Bik, W. (2015). Association of copeptin and cortisol in newly diagnosed multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 282, 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.03.011>
- Barr, R. G., & Menzies, R. (1994). The effect of war on tuberculosis. Results of a tuberculin survey among displaced persons in El Salvador and a review of the literature. *Tubercle and Lung Disease*, 75(4), 251–259. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(94\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0962-8479(94)90129-5)
- Barrios-Payán, J., Saqui-Salces, M., Jeyanathan, M., Alcántara-Vazquez, A., Castañon-Arreola, M., Rook, G., & Hernandez-Pando, R. (2012). Extrapulmonary locations of mycobacterium tuberculosis DNA during latent infection. *Journal of Infectious Diseases*, 206(8), 1194–1205. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis381>
- Berczi, I., Quintanar-Stephano, A., & Kovacs, K. (2009). Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 220–239. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03975.x>
- Bevilacqua, M. (1994). Hyponatraemia in AIDS. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 8(4), 837–848. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80304-0](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80304-0)
- Bini, E. I., Mata Espinosa, D., Marquina Castillo, B., Barrios Payán, J., Colucci, D., Cruz, A. F., ... Hernández Pando, R. (2014). The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*, 9(4), 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093831>

- Bongiovanni, B., Mata-espinosa, D., Attilio, L. D., Leon-contreras, J. C., Marquez-velasco, R., Bottasso, O., ... Luisa, M. (2015). Effect of cortisol and / or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 95(5), 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.011>
- Bordon, Y. (2016). Mucosal immunology: Neuroendocrine cells regulate lung inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 76–77. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.7>
- Bottasso, O., Bay, M. L., Besedovsky, H., & Del Rey, a. (2007). The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 166–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01962.x>
- Bottasso, Oscar. (2018). *Chronic Infections and the Hypothalamus- Pituitary- Adrenal Axis in the Context of Immune-Mediated Inflammation*. 7, 79–89. <https://doi.org/10.3233/NIB-170135>
- Boyd, J. H., Holmes, C. L., Wang, Y., Roberts, H., & Walley, K. R. (2008). Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R. *Resuscitation*, 79(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2008.07.006>
- Brown, L. a, & Chen, M. (1990). Vasopressin signal transduction in rat type II pneumocytes. *The American Journal of Physiology*, 258(6 Pt 1), L301-7.
- Bucher, M., Hobbhahn, J., Taeger, K., & Kurtz, A. (2002). Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V(1A) receptors during acute endotoxemia in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282, R979–R984. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00520.2001>
- Buijs, R. M., & Swaab, D. F. (1979). Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. *Cell and Tissue Research*, 204(3), 355–365. <https://doi.org/10.1007/BF00233648>
- Buijs, R. M., Swaab, D. F., Dogterom, J., & van Leeuwen, F. W. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell and Tissue Research*, 186(3), 423–433. <https://doi.org/10.1007/BF00224932>
- Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.1>
- Callewaere, C., Banisadr, G., Desarménien, M. G., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostène, W. H., & Mélik Parsadaniantz, S. (2006). The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), 8221–8226. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602620103>

- Cambier, C. J., Takaki, K. K., Larson, R. P., Hernandez, R. E., Tobin, D. M., Urdahl, K. B., ... Ramakrishnan, L. (2014). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*, *505*(7482), 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature12799>
- Cárdenas-Jaramillo, L. M., Quintanar-Stephano, A., Jarillo-Luna, R. A., Rivera-Aguilar, V., Oliver-Aguillón, G., Campos-Rodríguez, R., ... Berczi, I. (2012). Regulation of intestinal morphology and GALT by pituitary hormones in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1261*(1), 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06648.x>
- Casanova, J., & Abel, L. (2013). *The Genetic Theory of Infectious Diseases : A Brief History and Selected Illustrations*. (May), 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153448>
- Castel, M., & Hochman, J. (1976). Ultrastructural immunohistochemical localization of vasopressin in the hypothalamic-neurohypophysial system of three murids. *Cell and Tissue Research*, *174*(1), 69–81. <https://doi.org/10.1007/BF00222151>
- CENAPRECE, S. (2015). *Mortalidad por Tuberculosis Pulmonar. Estados Unidos Mexicanos 1990-2015*. 2030.
- Chang, Y. Y., Yang, C. H., Wang, S. C., Kao, M. C., Tsai, P. S., & Huang, C. J. (2015). Vasopressin inhibits endotoxin binding in activated macrophages. *Journal of Surgical Research*, *197*(2), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.04.042>
- Chassin, C., Hornef, M. W., Bens, M., Lotz, M., Goujon, J.-M., Vimont, S., ... Vandewalle, A. (2007). Hormonal control of the renal immune response and antibacterial host defense by arginine vasopressin. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(12), 2837–2852. <https://doi.org/10.1084/jem.20071032>
- Chen, J., Liu, Y., Soh, J.-W., & Aguilera, G. (2009). Antiapoptotic effects of vasopressin in the neuronal cell line H32 involve protein kinase Calpha and beta. *Journal of Neurochemistry*, *110*(4), 1310–1320. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06219.x>
- Chikanza, I. C., & Grossman, a S. (1998). Hypothalamic-pituitary-mediated immunomodulation: arginine vasopressin is a neuroendocrine immune mediator. *British Journal of Rheumatology*, *37*(2), 131–136.
- Chiu, T., Wu, S. S., Santiskulvong, C., Tangkijvanich, P., Yee Jr., H. F., & Rozengurt, E. (2002). Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *282*(3), C434-50.
- Chowdrey, H. S., Larsen, P. J., Harbuz, M. S., Jessop, D. S., Aguilera, G., Eckland, D. J., & Lightman, S. L. (1995). Evidence for arginine vasopressin as the primary activator of the HPA axis during adjuvant-induced arthritis. *British*

- Journal of Pharmacology*, 116(5), 2417–2424. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15089.x>
- Chowdrey, H. S., Lightman, S. L., Harbuz, M. S., Larsen, P. J., & Jessop, D. S. (1994). Contents of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin immunoreactivity in the spleen and thymus during a chronic inflammatory stress. *Journal of Neuroimmunology*, 53(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0165-5728(94)90059-0)
- Clements, J. A., & Funder, J. W. (1986). Arginine vasopressin (avp) and avp-like immunoreactivity in peripheral tissues. *Endocrine Reviews*, 7(4), 449–460. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-4-449>
- Cohen, S. B., Gern, B. H., Delahaye, J. L., Adams, K. N., Plumlee, C. R., Winkler, J. K., ... Urdahl, K. B. (2018). Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host and Microbe*, 24(3), 439–446.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.001>
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato-Maeda, M., ... Gagneux, S. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nature Genetics*, 45(10), 1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>
- Cook, G. M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R. A., Danilchanka, O., & Niederweis, M. (2009). Physiology of Mycobacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 55(09). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7)
- da Costa, C., Walker, B., & Bonavia, A. (2015). Tuberculosis Vaccines – state of the art, and novel approaches to vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases*, 32, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.11.026>
- da Costa, L. H. A., J??nior, N. N. D. S., Catal??o, C. H. R., Sharshar, T., Chr??tien, F., & da Rocha, M. J. A. (2016). Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation. *Molecular Neurobiology*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0094-x>
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>
- Das, R., Koo, M.-S., Kim, B. H., Jacob, S. T., Subbian, S., Yao, J., ... Bucala, R. (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), E2997–3006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301128110>
- Dheda, K., Booth, H., Huggett, J., Johnson, M., Zumla, A., & Rook, G. (2005). Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(7), 1201–1209. <https://doi.org/10.1086/444545>

- Dorhoi, A., Reece, S. T., & Kaufmann, S. H. E. (2011). For better or for worse: The immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunological Reviews*, *240*(1), 235–251. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x>
- Ehlers, S., & Schaible, U. E. (2012). The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*, *3*(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>
- Ekman, R., Gobom, J., Persson, R., Mecocci, P., & Nilsson, C. L. (2001). Arginine vasopressin in the cytoplasm and nuclear fraction of lymphocytes from healthy donors and patients with depression or schizophrenia. *Peptides*, *22*(1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00357-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00357-0)
- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. (1999). Pro / Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Science*, *10*(9), 359–368.
- Engelmann, M., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *25*(3–4), 132–149. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2004.09.001>
- Eskandari, F., Webster, J. I., & Sternberg, E. M. (2003a). Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, *5*(6), 251–265. <https://doi.org/10.1186/ar1002>
- Eskandari, F., Webster, J. I., & Sternberg, E. M. (2003b). Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, *5*(6), 251–265. <https://doi.org/10.1186/ar1002>
- Espinosa-Cueto, P., Magallanes-Puebla, A., Castellanos, C., & Mancilla, R. (2017). Dendritic cells that phagocytose apoptotic macrophages loaded with mycobacterial antigens activate CD8 T cells via cross-presentation. *PLoS ONE*, *12*(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182126>
- Forti, F. L., & Armelin, H. A. (2007). Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocrine-Related Cancer*, *14*(4), 1117–1125. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0154>
- García-Aguilar, T., Espinosa-Cueto, P., Magallanes-Puebla, A., & Mancilla, R. (2016). The mannose receptor is involved in the phagocytosis of mycobacteria-induced apoptotic cells. *Journal of Immunology Research*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/3845247>
- García-Romo, G. S., Pedroza-González, A., Aguilar-León, D., Orozco-Estevez, H., Lambrecht, B. N., Estrada-García, I., ... Hernández-Pando, R. (2004). Airways infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* delays the influx of dendritic cells and the expression of costimulatory molecules in mediastinal

- lymph nodes. *Immunology*, 112(4), 661–668. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2004.01904.x>
- García Jacobo, R. E., Serrano, C. J., Enciso Moreno, J. a., Gaspar Ramírez, O., Trujillo Ochoa, J. L., Uresti Rivera, E. E., ... García Hernández, M. H. (2014). Analysis of Th1, Th17 and regulatory T cells in tuberculosis case contacts. *Cellular Immunology*, 289(1–2), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.010>
- Geenen, V., Legros, J.-J., & Franchimont, P. (1987). The Thymus as a Neuroendocrine Organ: Synthesis of Vasopressin and Oxytocin in Human Thymic Epithelium. *Annals New York Academy of Sciences*, 496, 56–66.
- Genoula, M., Franco, J. L. M., Dupont, M., Kviatcovsky, D., Milillo, A., Schierloh, P., ... Balboa, L. (2018). Formation of foamy macrophages by tuberculous pleural effusions is triggered by the interleukin-10/signal transducer and activator of transcription 3 axis through ACAT upregulation. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00459>
- George, J. M., Capen, C. C., & Phillips, A. S. (1972). Biosynthesis of vasopressin in vitro and ultrastructure of a bronchogenic carcinoma. Patient with the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(1), 141–148. <https://doi.org/10.1172/JCI106784>
- Giusti-paiva, A., Graciela, S., Castro, M. De, Leiko, L., Elias, K., & Capellari, E. (2003). Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. 346, 21–24. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00543-3)
- Goncharova, N. D., Marenin, V. Y., & Oganyan, T. E. (2015). *Individual Differences in Stress Responsiveness of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Its Vasopressinergic Regulation in Old Monkeys*. (July), 280–294.
- Green, A. M., DiFazio, R., & Flynn, J. L. (2013). IFN- from CD4 T Cells Is Essential for Host Survival and Enhances CD8 T Cell Function during Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology*, 190(1), 270–277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200061>
- Grinevich, V., Knepper, M. A., Verbalis, J., Reyes, I., & Aguilera, G. (2004). Acute endotoxemia in rats induces down-regulation of V2 vasopressin receptors and aquaporin-2 content in the kidney medulla. *Kidney International*, 65(1), 54–62. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00378.x>
- Guetta, J., Klorin, G., Tal, R., Berger, G., Ismael-Badarneh, R., Bishara, B., ... Azzam, Z. S. (2012). Vasopressin-2 receptor antagonist attenuates the ability of the lungs to clear edema in an experimental model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(5), 583–588. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0117OC>

- Guillon, G., Grazzini, E., Andrez, M., Breton, C., Trueba, M., Serradeil-LeGal, C., ... Gallo-Payet, N. (1998). Vasopressin : a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res*, 24(3-4), 703-710. <https://doi.org/10.3109/07435809809032672>
- Guirado, E., Schlesinger, L. S., & Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0388-2>
- Heasley, L. E. (2001). Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*, 20(13), 1563-1569. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204183>
- Hernández-Pando, R., Orozco-Esteves, H., Maldonado, H. A., Aguilar-León, D., Vilchis-Landeros, M. M., Mata-Espinosa, D. A., ... López-Casillas, F. (2006). A combination of a transforming growth factor- β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(2), 264-272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03049.x>
- Hernandez-Pando, R., Orozco E., H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J., & Madrid-Marina, V. (1997). Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 90(4), 607-617. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00193.x>
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, a, Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., ... Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26-33.
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Honour, J., Silva, P., Leyva, R., & Rook, G. A. W. (1995). Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(1), 63-72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00176.x>
- Hill, A. R., Uribarri, J., Mann, J., & Berl, T. (1990). Altered water metabolism in tuberculosis: Role of vasopressin. *The American Journal of Medicine*, 88(4), 357-364. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90489-Z](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90489-Z)
- Hoorn, E. J., van Wolfswinkel, M. E., Hesselink, D. a, de Rijke, Y. B., Koelewijn, R., van Hellemond, J. J., & van Genderen, P. J. (2012). Hyponatraemia in imported malaria: the pathophysiological role of vasopressin. *Malaria Journal*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-26>
- Hoover, K., Grove, M., Gardner, M., Hughes, D. P., McNeil, J., & Slavicek, J. (2011). A gene for an extended phenotype. *Science*, 333(6048), 1401. <https://doi.org/10.1126/science.1209199>

- Hossain, M. M., & Norazmi, M. N. (2013). Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection - The double-edged sword? *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/179174>
- Hu, S. B., Zhao, Z. S., Yhap, C., Grinberg, A., Huang, S. P., Westphal, H., & Gold, P. (2003). Vasopressin receptor 1a-mediated negative regulation of B cell receptor signaling. *Journal of Neuroimmunology*, 135(1–2), 72–81. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00442-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00442-3)
- Hurbin, A., Orcel, H., Alonso, G., Moos, F., & Rabié, A. (2002). The vasopressin receptors colocalize with vasopressin in the magnocellular neurons of the rat supraoptic nucleus and are modulated by water balance. *Endocrinology*, 143(2), 456–466. <https://doi.org/10.1210/en.143.2.456>
- Il Shin, J., Park, S. J., Suh, C.-H., Lee, G. H., Hur, M. W., Han, S. Y., ... Kim, J. H. (2016). Hyponatremia in patients with systemic lupus erythematosus. *Scientific Reports*, 6, 25566. <https://doi.org/10.1038/srep25566>
- Jan, W. C., Kao, M. C., Yang, C. H., Chang, Y. Y., & Huang, C. J. (2017). Phosphoinositide 3-Kinase Is Involved in Mediating the Anti-inflammation Effects of Vasopressin. *Inflammation*, 40(2), 435–441. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0489-x>
- Jessop, D. S., Chowdrey, H. S., Lightman, S. L., & Larsen, P. J. (1995). Vasopressin is located within lymphocytes in the rat spleen. *Journal of Neuroimmunology*, 56(2), 219–223. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(94\)00155-H](https://doi.org/10.1016/0165-5728(94)00155-H)
- Johnson, H. M., & Torres, B. a. (1985). Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 135(2 Suppl), 773s-775s.
- Johnson, H. M., & Torres, B. a. (1988). A novel arginine vasopressin-binding peptide that blocks arginine vasopressin modulation of immune function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(7), 2420–2423.
- Juul, K. V., Bichet, D. G., Nielsen, S., & Norgaard, J. P. (2014). The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors. *AJP: Renal Physiology*, 306(9), F931–F940. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00604.2013>
- Khegai, I. I., Gulyaeva, M. a., Popova, N. a., Zakharova, L. a., & Ivanova, L. N. (2003). Immune system in vasopressin-deficient rats during ontogeny. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136(5), 448–450. <https://doi.org/10.1023/B:BEBM.0000017089.28428.1c>
- Kochman, K. (2013). *Neurohormones : oxytocin , vasopressin and related peptides – structure , genes , receptors , and evolution*. 283–294.
- Kozakiewicz, L., Phuah, J., Flynn, J., & Chan, J. (2013). The role of B cells and

- humoral immunity in mycobacterium Tuberculosis infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 783(6), 225–250.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1-12>
- Lambrechts, L., Fellous, S., & Koella, J. C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology*, 22(1), 12–16.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.008>
- Leng, G., & Ludwig, M. (2008). Neurotransmitters and peptides: Whispered secrets and public announcements. *Journal of Physiology*, 586(23), 5625–5632. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159103>
- Leng, G., Pineda, R., Sabatier, N., & Ludwig, M. (2015). The posterior pituitary, from Geoffrey Harris to our present understanding. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T173–T185. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0087>
- Li, T., Wang, P., Wang, S. C., & Wang, Y. F. (2017). Approaches mediating oxytocin regulation of the immune system. *Frontiers in Immunology*, 7(JAN), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00693>
- Liu, P. T., & Modlin, R. L. (2008). Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Current Opinion in Immunology*, 20(4), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.05.014>
- Lönnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B. G., Dye, C., & Raviglione, M. (2009). Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. *Social Science and Medicine*, 68(12), 2240–2246.
<https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2009.03.041>
- López, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., ... Van Soolingen, D. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(1), 30–37.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02171.x>
- Lv, J., He, X., Wang, H., Wang, Z., Kelly, G. T., Wang, X., ... Qian, Z. (2017). TLR4-NOX2 axis regulates the phagocytosis and killing of Mycobacterium tuberculosis by macrophages. *BMC Pulmonary Medicine*, 17(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12890-017-0517-0>
- Master, S. S., Rampini, S. K., Davis, A. S., Keller, C., Ehlers, S., Springer, B., ... Deretic, V. (2008). Mycobacterium tuberculosis Prevents Inflammasome Activation. *Cell Host and Microbe*, 3(4), 224–232.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.003>
- Matsunaga, W., & Miyata, S. (2000). LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. 9–18.
- Maybauer, M. O., Maybauer, D. M., Enkhbaatar, P., & Traber, D. L. (2008). Physiology of the vasopressin receptors. *Best Practice and Research: Clinical*

- Anaesthesiology*, 22(2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2008.03.003>
- Meng, X., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>
- Miller, R. L., Sandoval, P. C., Pisitkun, T., Knepper, M. A., & Hoffert, J. D. (2013). Vasopressin inhibits apoptosis in renal collecting duct cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 304(2), F177–88. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00431.2012>
- Neyrolles, O., Hernández-Pando, R., Pietri-Rouxel, F., Fornès, P., Tailleux, L., Payán, J. A. B., ... Gicquel, B. (2006). Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence? *PLoS ONE*, 1(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000043>
- O'Garra, A Redford, P. (2013). The immune response and tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 475–527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
- Oddo, M., Calandra, T., Bucala, R., Meylan, R. a, & Meylan, P. R. a. (2005). Macrophage Migration Inhibitory Factor Reduces the Growth of Virulent Mycobacterium tuberculosis in Human Macrophages. *Infection and Immunity*, 73(6), 3783–3786. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3783>
- Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Orme, I. M., & Gonzalez-Juarrero, M. (2005). Foamy Macrophages within Lung Granulomas of Mice Infected with Mycobacterium tuberculosis Express Molecules Characteristic of Dendritic Cells and Antiapoptotic Markers of the TNF Receptor-Associated Factor Family . *The Journal of Immunology*, 175(6), 3873–3881. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3873>
- Palin, K., Moreau, M. L., Sauvant, J., Orcel, H., Nadjar, A., Duvoid-Guillou, A., ... Moos, F. (2009). Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(6), E1289–E1299. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90489.2008>
- Park, S. J., & Shin, J. Il. (2013). Inflammation and hyponatremia: An underrecognized condition? *Korean Journal of Pediatrics*, 56(12), 519–522. <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.12.519>
- Quintanar-Stephano, A., Ventura-Juárez, J., Sánchez-Alemán, E., Aldaba-Muruato, L. R., Cervantes-García, D., Gonzalez-Blas, D., & Muñoz-Ortega, M. H. (2016). Liver cirrhosis reversion is improved in hamsters with a neurointermediate pituitary lobectomy. *Experimental and Toxicologic Pathology*, (March), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.04.006>
- Rabolli, V., Wallemme, L., Lo Re, S., Uwambayinema, F., Palmari-Pallag, M.,

- Thomassen, L., ... Huaux, F. (2014). Critical role of aquaporins in interleukin 1 β (IL-1 β)-induced inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(20), 13937–13947. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534594>
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 352–366. <https://doi.org/10.1038/nri3211>
- Richter, D., & Schmale, H. (1987). Expression of the Oxytocin and Vasopressin Genes. *Current Topics in Membranes and Transport*, 31(C), 251–276. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60063-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60063-5)
- Ríos-Barrera, V. A., Campos-Peña, V., Aguilar-León, D., Lascurain Ledesma, R., Meraz-Ríos, M. A., Moreno, J., ... Hernández-Pando, R. (2006). Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: Their relationship to mycobacterial virulence. *European Journal of Immunology*, 36(2), 345–353. <https://doi.org/10.1002/eji.200535202>
- Ripoll, G. V., Garona, J., Hermo, G. A., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2010). Effects of the synthetic vasopressin analog desmopressin in a mouse model of colon cancer. *Anticancer Research*, 30(12), 5049–5054. <https://doi.org/30/12/5049> [pii]
- Rook, G. a, & Hernandez-Pando, R. (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Review of Microbiology*, 50, 259–284. <https://doi.org/10.2105/AJPH.42.8.1011-b>
- Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., & Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, 10(9), 943–948. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>
- Said, S. I. (1974). Endocrine Role of the Lung in Disease. *American Journal of Medicine*, 57(September), 453–465.
- Salgame, P. (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Current Opinion in Immunology*, 17(4 SPEC. ISS.), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.006>
- Santucci, N., D’Attilio, L., Kovalevski, L., Bozza, V., Besedovsky, H., del Rey, A., ... Bottasso, O. (2011). A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*, 6(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026363>
- Saunders, B. M., & Britton, W. J. (2007). Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 103–111. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100027>
- Shelly, S., Boaz, M., & Orbach, H. (2012). Autoimmunity Reviews Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 11(6–7), A465–A470.

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.009>

- Shen, H., & Chen, Z. W. (2018). The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in M. Tuberculosis infection. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(3), 216–225. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.128>
- Sigal, F. (2004). Multiple effects of arginine vasopressin on prostaglandin E2 synthesis in fibroblasts. *European Journal of Pharmacology*, 485(1–3), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.049>
- Singh, V., Jamwal, S., Jain, R., Verma, P., Gokhale, R., & Rao, K. V. S. (2012). Mycobacterium tuberculosis-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. *Cell Host and Microbe*, 12(5), 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.012>
- Tahara, A., Tsukada, J., Tomura, Y., Yatsu, T., & Shibasaki, M. (2008). Vasopressin increases type IV collagen production through the induction of transforming growth factor-beta secretion in rat mesangial cells. *Pharmacological Research*, 57(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.01.003>
- Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A., & Shoham, M. (2001). *the Basic and Clinical Pharmacology Ofnonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists*. 175–202.
- Torres, B. a, & Johnson, H. M. (1988). Arginine vasopressin (AVP) replacement of helper cell requirement in IFN-gamma production. Evidence for a novel AVP receptor on mouse lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7), 2179–2183.
- Tsai, M. C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., ... Chan, J. (2006). *Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs : cellular composition and relative tissue oxygen tension*. 8(September 2005), 218–232. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00612.x>
- Tufariello, J. M., Chan, J., & Flynn, J. L. (2003). Latent tuberculosis: Mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infectious Diseases*, 3(9), 578–590. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00741-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00741-2)
- Umemura, M., Okamoto-Yoshida, Y., Yahagi, A., Touyama, S., Nakae, S., Iwakura, Y., & Matsuzaki, G. (2016). Involvement of IL-17A-producing TCR $\gamma\delta$ T cells in late protective immunity against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(4), 401–412. <https://doi.org/10.1002/iid3.121>
- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluittsma, D., van Zon, M., Pierson, J., ... Peters, P. J. (2007). M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell*, 129(7), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059>
- Velayati, A. A., Abeel, T., Shea, T., Konstantinovich Zhavnerko, G., Birren, B.,

- Cassell, G. H., ... Farnia, P. (2016). Populations of latent Mycobacterium tuberculosis lack a cell wall: Isolation, visualization, and whole-genome characterization. *International Journal of Mycobacteriology*, 5(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.12.001>
- Vilhardt, H. (1990). Basic Pharmacology of Desmopressin: A Review. *Drug Investigation*, 2(5), 2–8. <https://doi.org/10.1007/BF03258235>
- Vincent, J. L., & Su, F. (2008). Physiology and pathophysiology of the vasopressinergic system. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 22(2), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2008.03.004>
- Vorherr, H., Massry, S. G., Fallet, R., Kaplan, L., & Kleeman, C. R. (1970). Antidiuretic principle in tuberculous lung tissue of a patient with pulmonary tuberculosis and hyponatremia. *Annals of Internal Medicine*, 72(3), 383–387. <https://doi.org/10.1059/0003-4819-72-3-383>
- Weiss, H., & Katz, S. (1965). Hyponatremia resulting from apparently inappropriate secretion of antidiuretic hormone in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 92(4), 609–616.
- WHO. (2018). *Global Tuberculosis Report*.
- Winkler, A. W., & Crankshaw, O. F. (1938). Chloride Depletion in Conditions Other Than Addison's Disease 12. *Journal of Clinical Investigation*, 17(1), 1–6. <https://doi.org/10.1172/jci100920>
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008a). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008b). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>
- Wong, K. W., & Jacobs, W. R. (2013). Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon γ to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 208(1), 109–119. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit097>
- Yan-Ping, H., Lian-You, Z., Qiang-Sun, Z., Shao-Wei, L., Xiao-Yan, Z., Xiao-Long, L., ... Xia, L. (2008). Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast: Involvement of PKC-erk1/2 pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 52(1), 72–81. <https://doi.org/10.1097/FJC.ob013e31817f36b8>

Yang, C. T., Cambier, C. J., Davis, J. M., Hall, C. J., Crosier, P. S., & Ramakrishnan, L. (2012). Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host and Microbe*, 12(3), 301–312.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.07.009>

Zakharova, L. A., Karyagina, A. Y., Popova, N. A., Khagai, I. I., & Ivanova, A. L. N. (2001). *Humoral Immune Response in Ontogeny of the Brattleboro Rats with a Hereditary Defect of Vasopressin Synthesis*. 376(2), 70–71.

12. Apéndices

a) Artículo Original

*b) Presentaciones relevantes en
congresos*

12.1 Artículo Original: “Involvement of Vasopressin in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: A New Therapeutic Target?”

Contribución en el artículo

Diseño de los experimentos y preguntas de investigación	+++
Ejecución de los experimentos	++++
Redacción del Manuscrito	+++
Análisis de Resultados	++++
Respuesta a los revisores	++



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

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

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

OPEN ACCESS

Edited by:

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

Reviewed by:

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

*Correspondence:

Rogelio Hernández-Pando
rhdezpando@hotmail.com

Specialty section:

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

Received: 27 February 2019

Accepted: 16 May 2019

Published: 06 June 2019

Citation:

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

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

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

INTRODUCTION

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

mycobacteria that reaches alveoli and is then engulfed by alveolar macrophages. Macrophages are key cells in bacilli elimination through different mechanisms (3). Nevertheless, Mtb has evolved several mechanisms to avoid immune responses, and eventually, phagocytic cells become incapable of bacilli clearance (4). Mycobacterial antigens are then processed by dendritic cells and presented to T lymphocytes in regional lymph nodes, and so, a type IV (delayed) hypersensitivity response is generated. Lymphocytes migrate to the lung and, together with fibroblasts, surround infected macrophages and form containment structures known as granulomas, which are the histopathological hallmark of TB (5). Thus, complex interactions between bacterium and host cells occur, determining the outcome of infection. In early stages of active infection, Th1 cellular immune responses are protective, as interferon gamma (IFN γ) and interleukin 12 (IL-12) induce macrophage activation, allowing bacterial growth control; nevertheless, during late active disease, extensive inflammation leads to a shift toward a Th2 immune response in which IL-4, IL-10, and transforming growth factor- β (TGF- β) induce a local anti-inflammatory and immunosuppressive milieu resulting in poor containment of infection and progression of tissue damage, necrosis, and fibrosis, driving host to death (6). Besides these immunologic features, an intense neuroendocrine response during pulmonary mycobacterial infection creates a complex network of cytokines, hormones, and neurotransmitters that contribute to the outcome of TB pathogenesis (7, 8).

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statements

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

Experimental Model of Progressive Pulmonary TB in BALB/c Mice

The experimental model of progressive pulmonary Tb has been described previously (6). Briefly, the *M. tuberculosis* reference strain H37Rv (ATCC No. 25618) was grown in Middlebrook 7H9 broth (DIFCO) supplemented with 0.2% glycerol, 10% OADC enrichment, and 0.02% Tween-80 and maintained at 37°C in agitation. Mid log-phase cultures were used for all the experiments. Mycobacteria were counted and stored at -80°C until use. Bacterial aliquots were thawed and pulse-sonicated to remove clumps. For the infection, male BALB/c mice ($n = 36$), 8 weeks old and weighing 21–23 g, were anesthetized in gas chamber using Sevoflurane and infected intratracheally with 2.5×10^5 live bacilli using a cannula inside a biosafety level III cabinet. Mice were maintained in vertical position until spontaneous recovery and maintained in groups of five in cages fitted with microisolators connected to negative pressure in animal biosafety level III facilities. Groups of five animals were euthanized inside a cabinet of biosecurity level III at 1, 3, 7, 14, 21, 28, and 60 days post-infection by exsanguination under anesthesia with 210 mg/kg of intraperitoneal pentobarbital. Three left lungs per time were perfused with absolute ethanol, fixed, and prepared for histopathological studies. After eliminating hilar lymph nodes and thymic tissues, seven lungs were frozen and kept to -80°C for bacilli loads determination and gene expression studies in two separated experiments. Animals were monitored daily and humanely euthanized under pentobarbital anesthesia if respiratory insufficiency, accentuated cachexia, or total immobilization was noted.

Preparation of Lung Tissue for Morphological and Immunohistochemical Analysis

Lungs of infected mice were perfused with absolute ethanol by endotracheal route and fixed for 24 h and then embedded in paraffin blocks. Sections of 4 µm were obtained with a microtome, mounted on glass slides, deparaffinized, and stained with hematoxylin and eosin or with Masson's trichrome staining method. For quantification and morphometric analysis, three different mouse lungs per time point were evaluated. Pneumonic areas were measured with a histology automated system (Leica Microsystems), and then the percentage of affected area in microns was reported from two different experiments. For immunohistochemistry, lung tissues were sectioned and mounted on glass slides and then deparaffinized. Slides were first blocked for unspecific activity of peroxidase with methanol peroxide 3% for 1 h. For VP tissue detection, a rabbit anti-mouse polyclonal antibody (Genetex, USA) was used at a concentration of 1:100, incubated overnight in agitation, followed by incubation with secondary anti-rabbit IgG labeled with peroxidase. For TGF-β immunostaining, a rabbit anti-mouse polyclonal antibody directed to TGF-β1 isoform was used at a final concentration of 1:250. In both cases, bound antibodies were detected with diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin.

Gene Expression Kinetics of VP, VPR, and TGF-β in Lung Homogenates

The right lungs of three of the euthanized mice were obtained and stored in 1.5-ml cryotubes, immediately frozen in liquid nitrogen, and maintained at -80°C until processing. For homogenization, lungs were slowly defrosted and zirconium flint beads were added to each tube and lung tissue was homogenized in the FastPrepR-24 (MP Biomedicals). RNA extraction was performed with the RNeasyR Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The RNA obtained was quantified by spectrophotometry (A260/280), 100 ng of RNA from lung was used for the production of cDNA by retro-transcription following the indications of the Omniscript kit (Qiagen), and later an endpoint PCR was run to amplify the constitutive gene RPLP0 (Ribosomal protein large P0, Gen ID:11837, GenBank, NCBI) and its integrity was analyzed by running at 2% agarose gel stained with SYBR green. Complementary DNA (cDNA) obtained from each sample was analyzed by real-time PCR (qPCR) using the Real-Time PCR system 7500 (Applied Biosystems) and the Quantitech SYBR Green Mastermix kit (Qiagen) with specific primers (Invitrogen) designed with the first-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov) for VP, V1aR, and V2R. For absolute quantification, the number of copies of each target gene was normalized to 1 million amplicons of mRNA of the housekeeping gene RPLP0, including the standard curves and a negative control. Cycling conditions used were as follows: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 34 s. In the case of TGF-β, for relative quantification, the Ct values were determined by 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the fold change of gene expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (38). Sequences of primer probes can be found in Supplementary Table 1.

Pharmacological Manipulation of Vasopressinergic System

For the pharmacological treatment during early infection, male mice ($n = 60$) were infected as mentioned above and divided into two different groups: (1) saline control group (SS, $n = 30$) and (2) desmopressin (DdAVP, $n = 30$). Treatments were administered twice a day from day 1 post-infection and during the first 2 months. Animals were euthanized in groups of five in each time point (days 3, 7, 14, 21, 28, and 60). Three lungs were perfused and embedded in paraffin, and seven lungs were frozen immediately and stored at -80°C until processing for CFU counting as mentioned above and used for PCR analysis. In another set of experiments (late disease treatment), infected mice ($n = 120$) were divided into four groups: (1) saline control group (SS, $n = 30$), (2) desmopressin (DdAVP, $n = 30$), (3) conivaptan (CVP, $n = 30$), and (4) control vehicle (DMSO 10%) group ($n = 30$). Treatments were administered twice a day for 2 months, starting on day 60 of infection. Groups of 5 mice were euthanized on days 75, 90, and 120 post-infection (days 15, 30, and 60 of treatment). It is important to mention that DdAVP is a selective agonist of V2 receptor with weak affinity for V1a

and V1b receptors, while CVP is a non-peptidic antagonist of V1aR/V2R with weak effects on V1b receptor. Two independent experiments were performed. The dose of DdAVP was 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ twice a day in a volume of 10 μl (vehicle was 0.9% NaCl solution) administered intramuscularly, which is the necessary dose to restore antidiuresis in neurointermediate-lobectomized animals (39). CVP obtained from BiochemPartner (BCP07817, Shanghai) was diluted in sterile water for injection with DMSO [10%] and administered via intramuscular (1 mg/kg twice a day in a final volume of 10 μl).

As shown later in the Results section, the group of infected mice treated with CVP during the advanced phase of the disease showed a significant decrease in the lung bacillary load, which suggests that the administration of this VP receptor blocker could have synergistic effect when administered in conjunction with conventional antibiotics used in the treatment of TB, with the objective of shortening the treatment. To study this aspect, mice ($n = 120$) on the 60th day of infection were divided into four groups ($n = 15$, each): the first group was a vehicle control (DMSO 10%); the second group received CVP at the same dose mentioned above; a third group (AB) was treated with first-line antibiotics, which are isoniazid (10 mg/kg of weight), rifampicin (10 mg/kg of weight), and pyrazinamide (30 mg/kg of weight), administered every day with an intragastric cannula in a volume of 100 μl ; and a fourth group of antibiotic plus conivaptan (AB + CVP, $n = 15$) received the same type of antibiotic therapy plus CVP intramuscularly (1 mg/kg twice a day). All experimental groups were treated for 2 months. Groups of five animals were euthanized on days 15, 30, and 60 post-treatment. The right lungs were used to determine bacillary load and the left lungs were used to analyze the extent of the pneumonic damage by automated morphometry.

Collagen Quantification by Hydroxyproline Assay

To determine the extent of fibrosis during the advanced phase of pulmonary Tb, the amount of hydroxyproline was determined as an indirect measure of the amount of collagen in lung expressed in milligrams per gram of dry tissue. All reagents were obtained from the Hydroxyproline Quantification Kit (Sigma-Aldrich). Briefly, the right lungs of three mice per group treated with DdAVP or controls were dehydrated at 60°C and hydrolyzed with 1 ml of HCl (6N) and incubated at 110°C overnight. Subsequently, the samples were neutralized with NaOH (pH 7) and filtered and 50 μl of sample was diluted in 2 ml of distilled water. Chloramine T was added to each tube (1 ml), mixed, and incubated for 25 min at room temperature. Then, 1 ml of perchloric acid (3.15 M) was added and incubated for 5 min at room temperature. Finally, 1 ml of *p*-dimethylaminobenzaldehyde and ethylene glycol was added. The tubes were placed in a water bath at 60°C for 20 min and then cooled in water for 5 min. Samples were placed and a standard curve was made from a hydroxyproline standard of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each sample was analyzed in triplicate. The absorbance was read at 557 nm in a spectrophotometer. To determine the collagen concentration, the values obtained from hydroxyproline

were multiplied by the dilution factor and then by the constant 7.23.

Mycobacterial Killing Assay in Cell Cultures

Murine Balb/c alveolar macrophages (cell line MH-S, ATCC® CRL-2019) were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells per well) in RPMI medium (Caisson Labs, USA, Cat. RPL03) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco, USA) and pre-stimulated and treated with three different doses: low (10^{-8} M), medium (10^{-7} M), and high (10^{-6} M) doses of DdAVP (Merck, Ger) or CVP (10^{-6} M) for 12 h. The dose of CVP corresponded to the molar higher dose of DdAVP making an equimolar inhibition. Subsequently, cells were infected with Mtb strain H37Rv at an MOI of 1:3 for 1 h. The wells were then washed with RPMI/Amikacin medium to eliminate non-phagocytosed bacteria. Infected cells in wells corresponding to 1 h post-infection time were lysed with 1% SDS and incubated for 10 min, and then 20% bovine serum albumin (BSA) was added to stop reaction. Serial dilutions from an initial volume of 10 μl were made in culture broth (7H9, Middlebrook, USA) and seeded in solid culture medium (7H10). The number of live bacteria was determined by counting colony-forming units (CFUs) as previously described (40). In the 24-h wells, the infected macrophages were supplemented every 12 h with different doses of DdAVP or CVP, and at the end of the experiment, the same procedure of preparation and sowing of bacteria in 7H10 medium was performed. A second experiment was performed in order to study the effects of sustained vasopressinergic stimulus on infected macrophages. 1×10^5 MH-S cells were seeded and infected as mentioned above in 12-well plates, with 1 ml of RPMI medium, and treated with the highest dose of VP and CVP. Culture medium (RPMI) was daily supplemented with VP or CVP at 9:00 h and followed in a kinetic of 72 h. Cells were harvested as described above for CFU count and culture supernatants were collected in 1.5-ml tubes containing 50 μl of protease inhibitor for cytokine detection.

Cytokine Detection

Cytokines IL-6 and TNF α were measured in pools of culture supernatants from control-infected treatment groups and non-infected macrophages employing commercially available ELISA kits according to the manufacturer's instructions (BioLegend Company, CA, USA). Detection limits were 63.0–4,000 pg/ml for IL-6 and 15.6–1,000 pg/ml for TNF α .

Mycobacterial Culture Assays

In order to test the possibility of the effect of AVP directly on mycobacteria, 1×10^5 CFU of *M. tuberculosis* (H37Rv) were seeded on 96-well plates in 200 μl of liquid broth media supplemented with the higher (1×10^6 M) and lower (1×10^{10} M) dose of synthetic AVP (Sigma-Aldrich, Germany) or DdAVP in groups of three for each experimental condition, and incubated in soft helicoidal agitation at 37°C in a CO $_2$ (3%) atmosphere for a 7-day period. At the end of this experiment, 40 μl of [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] (Cell-titer 96) was added to each experimental well, and the transformation of

the resulting formazan was read 4 h before. This compound is turned enzymatically to formazan by electron transport chain of viable mycobacteria (41). Before the MTS assay, 10 μ l was seeded in solid (7H10) medium and counted on day 21 as mentioned above.

Statistical Analysis

All the statistical analysis was performed using GraphPad Prism Software (version 6.0, La Jolla, USA). The data were analyzed using paired *t*-test, one- and two-tailed ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. *P*-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Local Vasopressinergic Activity During Pulmonary Tb

In our TB murine model, there are two phases, an early phase of approximately 21 days in which the Th1-type response in the lung increases progressively and is predominant at the end of this stage, and the progressive phase that starts at day 28 post-infection in which the Th1 cytokine pattern decreases and the Th2-type response emerges in co-existence with extensive inflammatory infiltrate and progressive pneumonia, as well as an increase in the bacillary loads, which leads the animal to death (6).

Previously, it was reported that during active TB, there is a compound in the lung that has the same antidiuretic activity as VP, which suggested a possible ectopic production (12, 13). We studied this in our pulmonary TB model. In mice, during the early phase of the infection, there is a gradual granuloma formation since day 14 that coincides with a progressive increase in VP gene expression in the lungs (Figure 1A). Noteworthy, no VP mRNA was found at the healthy lung. These results well-coincided with an increase in the VP positivity detected by immunohistochemistry on the surface of some pneumocytes and strongly positive in macrophages that were forming part of the granulomas (Figure 1B). As the infection progressed, in the pneumonic areas, numerous macrophages with extensive cytoplasm vacuolization (foamy cells) exhibited strong VP immunostaining (Figure 1C) in co-existence with the high number of VP transcripts and progressive decrease of both VP receptors determined by qPCR that was pronounced in V2R (Figures 1D,E).

Effects of Vasopressinergic Pharmacological Manipulation in the Course of the TB

Due to the above results and the observations described previously on the immunomodulatory effects of VP, we decided to study its possible effects on experimental TB by pharmacological manipulation. To do this, groups of infected mice were treated with the synthetic agonist desmopressin (8-deamino-arginine VP, DdAVP) or the non-peptide antagonist conivaptan hydrochloride (CVP). DdAVP is a potent agonist of the V2 receptors and has a prolonged half-life in comparison with

VP. Treatment with DdAVP during the first month, during the early phase of murine TB, show no effects on histopathology; however, at the end of the infection, a higher number of bacilli was observed in the lungs of these mice in comparison with the controls (Figure 2A). This prompted us to study VP effects during the late infection. In the group of mice treated during the progressive phase of the disease, when the Th2 response and the anti-inflammatory and repair phenomena were predominant (from day 60), a significant increase in the bacillary loads (Figure 2B) and histologically extensive areas of fibrosis in the pulmonary interstitium was observed in mice treated with DdAVP (Figure 2C), which correlated with higher amount of collagen (hydroxyproline) (Figure 2D).

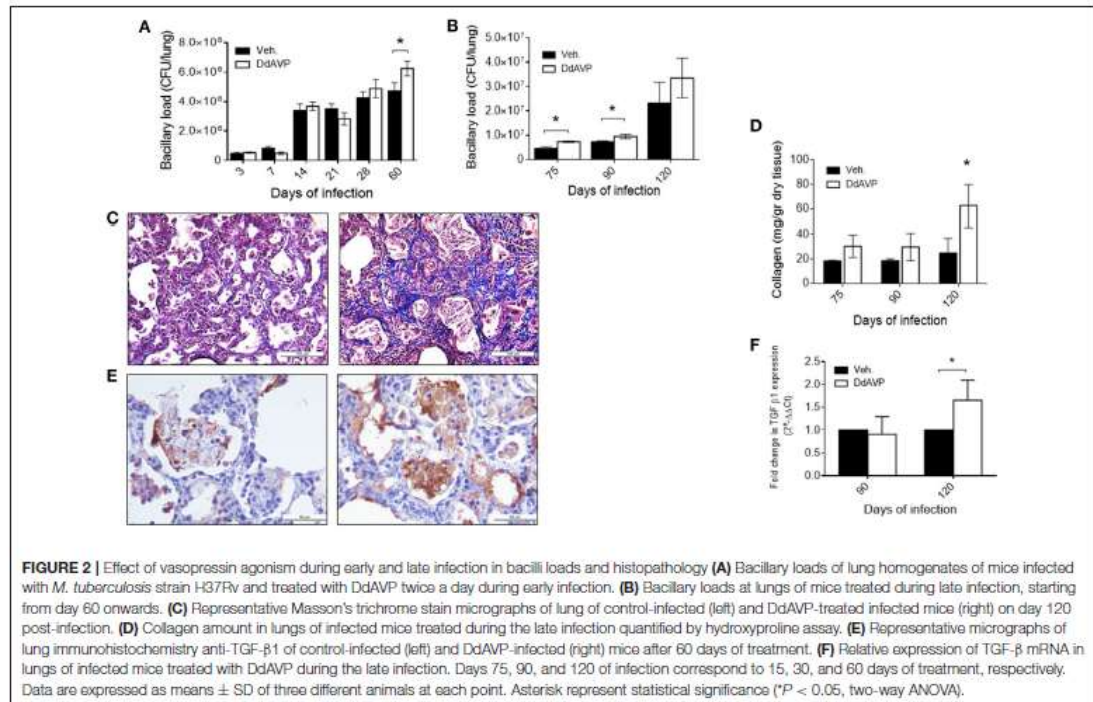
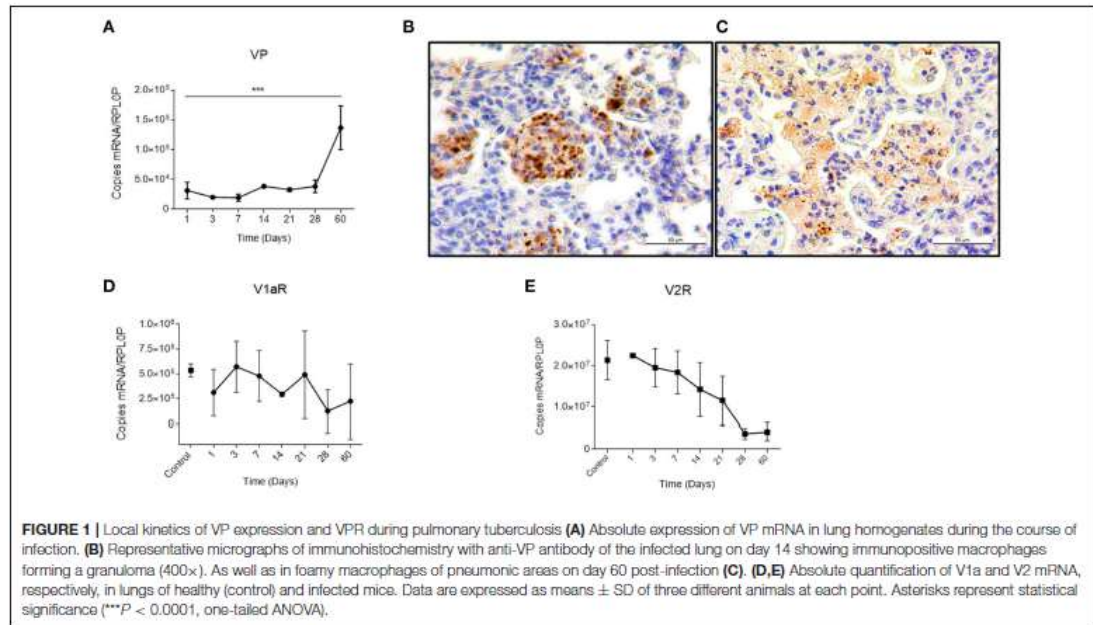
Regarding the possible mechanism of the highly fibrotic response produced by DdAVP administration, we considered the possibility that this could be induced indirectly by increased production of TGF- β , a potent fibrogenic and immunosuppressing cytokine related to poor protection against infection. It has been previously reported that VP promotes collagen synthesis and proliferation of fibroblasts through TGF- β , modifying fibrotic responses (42, 43). In this regard, mice treated with DdAVP showed higher TGF- β immunostaining after 60 days of treatment (Figure 2E, images), which correlated with relative increase in its gene expression (Figure 2F). Thus, it is possible that in advanced TB, VP promotes anti-inflammatory and fibrotic repair by the induction of TGF- β production.

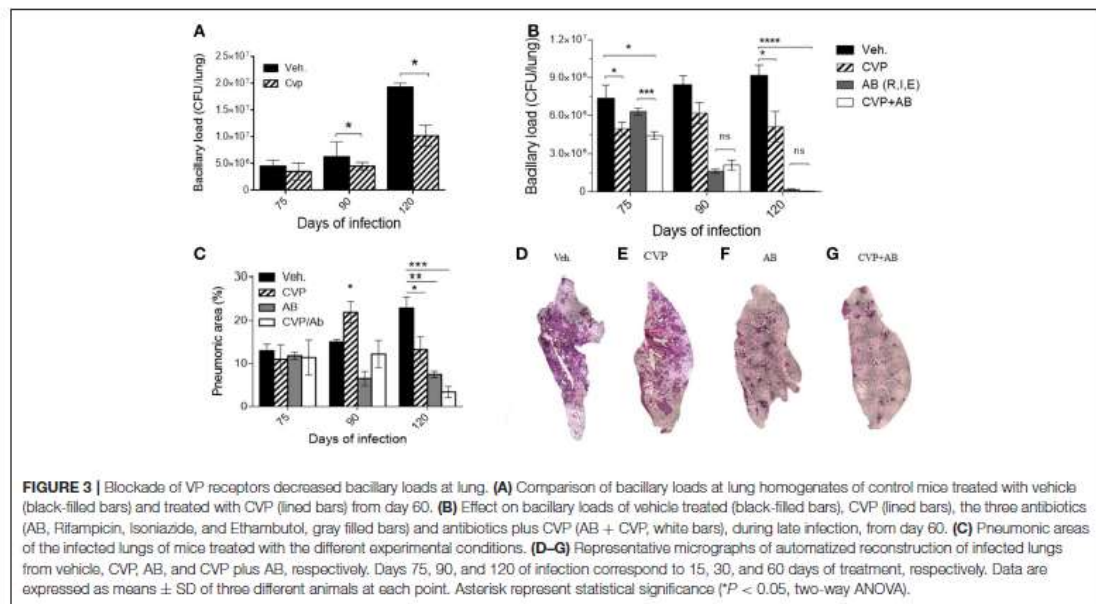
In contrast, in animals treated during the advanced phase of the disease with the competitive non-selective VP antagonist CVP, when the effects of VP agonism were more pronounced, a significant reduction of the bacillary loads was observed (Figure 3A). These results prompted us to test a possible synergistic effect of CVP with conventional antibiotics (rifampin, isoniazid, and ethambutol) on animals in the chronic phase of H37Rv mycobacterial infection.

Although TB can be cured with these antibiotics, the treatment extend at least half a year, which frequently provokes therapeutic abandoning, causing relapse and emergence of drug-resistant bacteria. Therefore, it is necessary to shorten the treatment, and one possibility is the combined treatment antibiotics plus an immune-regulatory agent, such as in this case, CVP, blocking V1a and V2R activity. Mice on the 60th day of infection were treated daily with first-line antibiotics (AB) or AB plus CVP for 2 months. In comparison with animals treated only with antibiotics, mice that received the combined treatment showed a significant decrease in bacillary load at the start of treatment (2 weeks) (Figure 3B). Furthermore, reduced pneumonic areas were noted when animals were synergistically treated with AB plus CVP (Figures 3C–G), suggesting that this treatment may shorten the time of antibiotic therapy and improve clinical manifestations.

VP Inhibits Mycobacterial Clearance by Alveolar Macrophages

The highest VP immunostaining was exhibited by macrophages; hence, the cell line MH-S of murine alveolar macrophages was the most convenient for the *in vitro* experiments, infecting adherent





cells with Mtb and then three different doses of the synthetic agonist DdAVP or the antagonist CVP were added to RPMI medium. After 24 h of infection, repeated administration (at 0, 12, and 24 h) of the highest concentration of DdAVP produced an increase in the number of intracellular bacilli (Figure 4A) in a dose- and time-dependent manner, while CVP produced a significant decrease of bacillary loads when compared with the highest dose of DdAVP, suggesting that a *vasopressinergic tone* modifies the macrophage ability to kill mycobacteria. Moreover, infected macrophages supplemented with AVP (1×10^{-6} M) each for 24 h showed higher intracellular bacilli at days 1 and 3 post-infection (Figure 4B), in co-existence with decreased IL-6 in supernatants, which was totally reversed with CVP treatment (Figure 4C). TNF α , a protective cytokine during early mycobacterial infection, was found reduced with AVP treatment; nevertheless, CVP did not reverse the TNF inhibition mediated by VP completely (Figure 4D), suggesting a different mechanism regarding vasopressinergic modulation over macrophage cytokine production. It is important to mention that VP was not synthesized by cultured alveolar macrophages, as they do not express VP mRNA (Supplementary Figure 2).

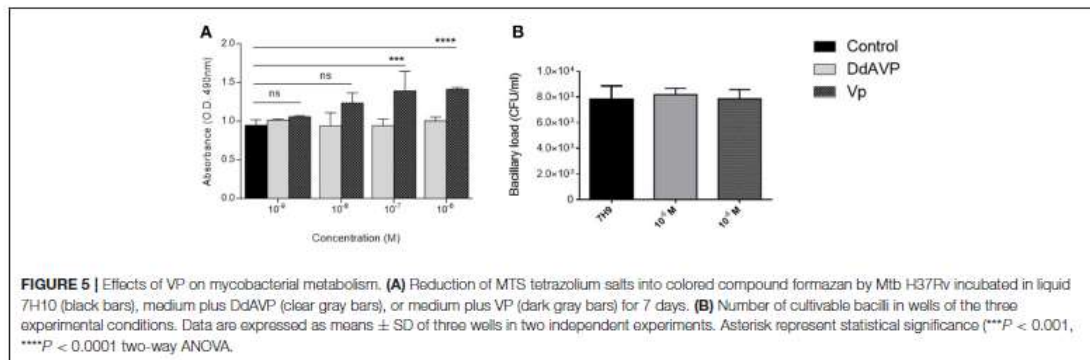
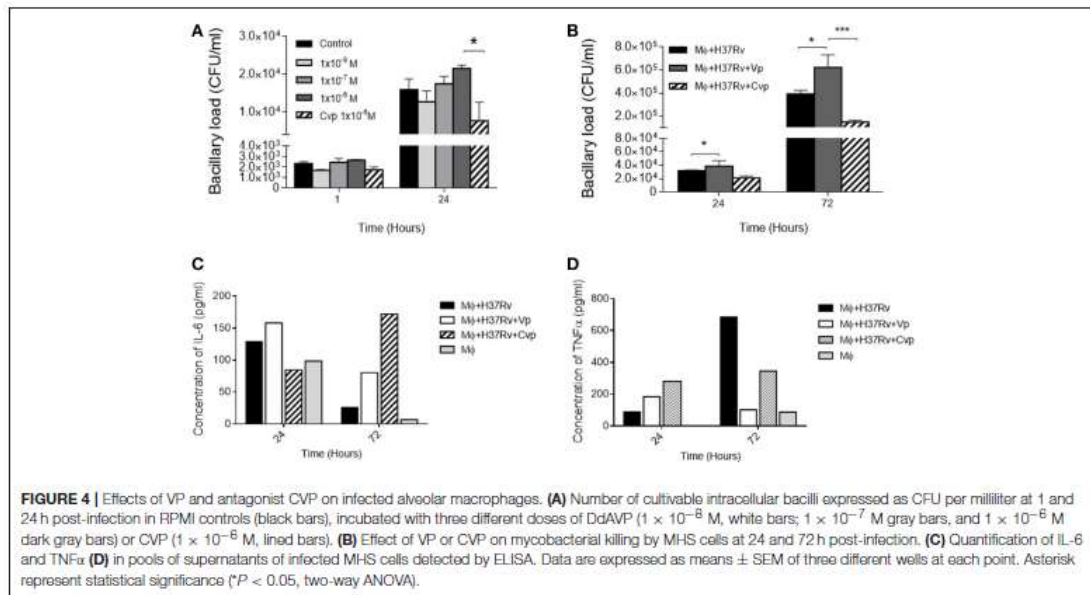
Effect of Vasopressin on *M. tuberculosis*

Another aspect of interest was the possibility that VP could be exerting a direct effect on Mtb. To study this, bacteria were seeded in liquid medium in 96-well plates and incubated with lyophilized VP (Sigma-Aldrich) or DdAVP at different concentrations. As mentioned above, DdAVP is an isomer of VP that has an arginine in position D (unlike the position L in VP), which confers, in addition to a prolonged half-life, a greater affinity for the

V2 receptor; on the other hand, VP has a similar affinity for its three receptors. After 7 days of incubation, the bacteria that were incubated with VP transformed a greater amount of MTT-tetrazolium into formazan, which did not occur when the bacteria were incubated with DdAVP (Figure 5A) or the medium alone. This bacterial reaction is carried out by a reduction reaction of the compound NADH and is non-reversible, so that the intensity of the positivity indirectly indicates higher metabolic activity (or an increased number of bacteria) in Mtb incubated with VP. Unexpectedly, neither AVP nor DdAVP caused a change in the number of cultivable bacilli in the medium (Figure 5B).

DISCUSSION

The results shown here are a new example of the constant communication and superposition of neuroendocrine and immune functions during chronic infectious diseases. During ontogeny, the lung epithelium derives from neuroendocrine cells, and during the adult life for its adequate function, airway epithelium requires the influence of hormones and neuropeptides (44, 45). This also contributes to the distinctive characteristics that confirm the lung as an immune-privileged organ, since tolerance to environmental immunogens of the most diverse nature and origin is necessary; however, the lung is also an organ of entry and lodging of many highly evolved microorganisms, such as Mtb. Thus, the lungs need the contribution of well-balanced immune-neuroendocrine response to eliminate diverse infecting agents and efficient cellular mechanisms that repair and reconstitute the pulmonary tissue



after bacterial aggression. In this regard, VP could be a participating factor in the immunopathogenesis of pulmonary TB, considering that it is a pleiotropic hormone that exerts different effects on epithelial, immune, and fibroblast cells, and contributes to the regulation of different phenomena of resistance to inflammatory stress (31, 37, 46). On the other hand, its effects on phagocytosis, cytokine production, and apoptosis also suggest that vasopressinergic dysfunction could contribute to the pathogenesis of several infectious diseases, including TB. No less important is the association that exists between stress-mediated immunosuppression by VP and its relationship with infectious/inflammatory diseases (47–49), as VP is one of the main mediators of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, especially in periods of chronic stress resulting

in dysregulated cortisol production (25, 50). In fact, various inflammatory diseases exhibit an increased “vasopressinergic tone”; in particular, lung inflammation of different etiologies is accompanied by this hormonal characteristic (51–55).

In the present work, the existence of the so-called antidiuretic principle in pulmonary TB (13) is confirmed and corresponds to VP, as demonstrated by our immunohistochemical results; the intensity and the number of cells positive for VP in lung increased as the disease progressed, correlating with the extension of pneumonia, and interestingly, foamy macrophages that are the prevalent cell type in the pneumonic areas were those that showed the strongest VP immunostaining, which well-correlated with what was reported, that is, that these types of cells are distinctive in the advanced stage of the

disease and are characterized by having a large number of bacteria in their cytoplasm (56). The detection and progressive increase of VP transcripts in infected lungs during infection was seen, suggesting that VP has a significant activity in the infected organ, as there was no VP mRNA expression in the healthy lung.

The effects of VP are highly dependent on its concentration, time of action, type of organ, and target cell. Previously, it has been reported that VP disturbances occur in the pathophysiology of inflammatory diseases (24, 39); nevertheless, the anti-inflammatory effect of this hormone in the lungs has also been described, through the inhibition in the production of IL-6 (37). In addition, in heart, liver, and in fibroblasts, VP is an inducer of fibrosis, a mechanism partially dependent on TGF- β (42, 43, 57). To study the possible pathogenic effect in TB, experiments were carried out using vasopressinergic manipulation, with the synthetic agonist DdAVP, because its half-life is longer than VP, and CVP was used as a non-selective antagonist for the V1a and V2 receptors. The obtained results suggest that VP has anti-inflammatory/profibrotic effects, which should be important to reduce excessive inflammation and to promote the healing of irreversible damaged lung tissue in advanced active TB, which could be modulated by the expression of VP receptors that were lower expressed during progressive late disease, a phenomenon that has been reported previously in response to acute inflammation (58). However, it seems that sustained vasopressinergic activity, such as produced by the administration of DdAVP during late disease, has deleterious effects, as suggested by the higher number of live bacteria and the extensive fibrosis in the lungs of mice treated with this agonist compound. This effect can be mediated through the induction of TGF- β production since immunohistochemistry showed a higher number of strong TGF- β positive foamy macrophages surrounded by areas with extensive fibrosis, and higher gene expression of this cytokine was seen in the animals treated with the VP agonist. TGF- β is an important anti-inflammatory and immunosuppressive cytokine that is produced during active TB and has a significant effect in preventing excessive inflammation, but this activity is produced by inhibiting the TB protective Th1 pro-inflammatory response; hence, TGF- β has a deleterious effect in this disease (59). This cytokine also induces fibroblast activation and collagen secretion, being a key factor in the development of fibrosis. Thus, it seems that Mtb "takes advantage" of the physiological response of VP, which promotes anti-inflammation and tissue healing, leading to a non-protective immunity consequently. These functions can also be important to decrease the pulmonary functional capacity because of fibrosis.

The lower bacillary loads produced by the inhibition of VPR activity in advanced TB mice treated with CVP confirm the possible deleterious effect caused by the continuous and local production of VP on advanced infection and open the possibility of using these observations for therapeutic purposes, specifically the use of VP-blocking agents as adjuvants of antibiotic therapy. In that sense, it is interesting that animals with advanced progressive TB treated with first-line antibiotics and the VP receptor antagonist reduced significantly and more rapidly the bacillary loads in lungs than animals treated only

with antibiotics. However, it is important to mention that changes in diuresis and water intake in animals treated with CVP (Supplementary Figure 1) could be interfering with the antibiotic activity; thus, future investigations using selective blockers with no aquaretic activity could be useful. Although TB can be cured by chemotherapy, the treatment usually requires four specific drugs and 6 months of therapy in humans; this long treatment frequently produces significant compliance problems with the consequence of disease recrudescence and the arising of multi-drug resistant (MDR) strains. Thus, the possibility of shortening the conventional treatment is a basic strategy for the control of this disease. Indeed, the frequency of cases of MDR-TB is increasing, and its treatment is even more expensive and demanding, because it requires eight antibiotics administered during a year and a half. We are currently conducting experiments with mice infected with MDR bacteria and treated with second-line antibiotics and CVP, in order to determine if there is synergy and therefore possible shortening in the time of treatment of MDR-TB.

The results in the present study show for the first time the pathogenic importance of VS in experimental pulmonary TB, as far as we know. However, more experiments are needed to define in more detail the contribution of this hormone in the pathogenesis of TB, such as studying whether Mtb produces a VP-like molecule that causes aberrant biological effects that deregulate the mechanisms of the immune system, resulting in favor of the infection as well as the possibility that Mtb could be driving host VP system. Experimental procedures of this work used only male mice, which can be a limiting factor. It will be interesting to know whether female mice develop this vasopressinergic response in lungs, as differences between gender occur in the pathophysiology of TB (60) and also because of the known VP system differences between male and females. Also, it is necessary to study in detail the mechanisms underlying the decrease in bacillary load by blocking its activity *in vivo* or *in vitro*, since they could be caused by a lower rate of phagocytosis, antigen processing, or the inhibition of immunosuppressive effects of VP (mediated by TGF- β). It is also of interest to study if VP, in conjunction with other peptides and neurotransmitters, could be inducing effects directly on Mtb, influencing its virulence, as VP belongs to a huge group of regulatory peptides that have remained in evolution for more than 500 million years, and due to its pleiotropic effects, it is intuitive to think that a complex and well-adapted bacterium could be taking advantage of these host trophic factors. The results shown here with respect to the greater transformation of formazan by mycobacteria when treated with VP suggest this possibility and open discussion about some type of ancestral interaction between VS and Mtb, as this hormone can increase bacterial metabolism. This series of hypothetical possibilities are part of the perspectives of this work.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MZ, AQ-S, and RH-P contributed to the background work and conceived the experiments. MZ performed, organized, and analyzed the results. DM-E, BM-C, and JB-P contributed to the design and supervised experimental work. AQ-S provided DdAVP and CVP.

MZ and RH-P wrote the manuscript. RH-P provided the funds.

FUNDING

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT IFC 2015-1 Project number 115). MZ is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 595244 from CONACyT.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00351/full#supplementary-material>

REFERENCES

- WHO. *Global Tuberculosis Report*. WHO (2018).
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Aguilar D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp*. (2009) 57:355–67. doi: 10.1007/s00005-009-0042-9
- Rajaram MVS, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol*. (2014) 26:471–85. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.010
- Malik BZA, Denning GM, Kusner DJ. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med*. (2000) 191:287–302. doi: 10.1084/jem.191.2.287
- Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol*. (2012) 3:411. doi: 10.3389/fimmu.2012.00411
- Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón I, Velasco C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. (1996) 89:26–33.
- Bongiovanni B, Diaz A, D'Attilio L, Santucci N, Didoli G, Lioi S, et al. Changes in the immune and endocrine responses of patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. *Ann N Y Acad Sci*. (2012) 1262:10–5. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06643.x
- Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci*. (2013) 53:77–85. doi: 10.1016/j.mcn.2012.11.002
- Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, Del Rey A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. *Neuroimmunomodulation*. (2009) 16:68–77. doi: 10.1159/000180261
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Honour J, Silva P, Leyva R, Rook GAW. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis: a clue to pathogenesis? *FEMS Immunol Med Microbiol*. (1995) 12:63–72. doi: 10.1111/j.1574-695X.1995.tb00176.x
- Weiss H, Katz S. Hyponatremia resulting from apparently inappropriate secretion of antidiuretic hormone in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. (1965) 92:609–16.
- Lee P, Ho KKY. Hyponatremia in pulmonary TB: evidence of ectopic antidiuretic hormone production. *Chest*. (2010) 137:207–8. doi: 10.1378/chest.09-0405
- Vorherr H, Massry SG, Fallet R, Kaplan I, Kleeman CR. Antidiuretic principle in tuberculous lung tissue of a patient with pulmonary tuberculosis and hyponatremia. *Ann Intern Med*. (1970) 72:383–7. doi: 10.7326/0003-4819-72-3-383
- Van Leeuwen FW, Caffé R, Van Der Sluis PJ, Sluiter AA, Van Der Woude TP, Seidah NG, et al. Propressophysin is present in neurones at multiple sites in Wistar and homozygous Brattleboro rat brain. *Brain Res*. (1986) 379:171–5. doi: 10.1016/0006-8993(86)90272-6
- Keil LC, Severs WB. Reduction in plasma vasopressin levels of dehydrated rats following acute stress. *Endocrinology*. (2015) 100:30–8. doi: 10.1210/endo-100-1-30
- Ma XM, Lightman SL. The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol*. (1998) 510:605–14. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.605bk.x
- Morgenthaler NG, Müller B, Struck J, Bergmann A, Redl H, Christ-Crain M. Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock. *Shock*. (2007) 28:219–26. doi: 10.1097/SHK.0b013e318033e5da
- Taveau C, Chollet C, Waeckel L, Desposito D, Bichet DG, Arthus MF, et al. Vasopressin and hydration play a major role in the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in obese rats. *Diabetologia*. (2015) 58:1081–90. doi: 10.1007/s00125-015-3496-9
- Palin K, Moreau ML, Sauviant J, Orce H, Nadjar A, Duvoud-Guillou A, et al. Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2009) 296:E1289–99. doi: 10.1152/ajpendo.90489.2008
- Raber J, Bloom FE. II-2 induces vasopressin release from the hypothalamus and the amygdala: Role of nitric oxide-mediated signaling. *J Neurosci*. (1994) 14:6187–95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-10-06187.1994
- Maybauer MO, Maybauer DM, Enkhbaatar P, Traber DL. Physiology of the vasopressin receptors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. (2008) 22:253–63. doi: 10.1016/j.bpa.2008.03.003
- Khegai II, Gulyaeva MA, Popova NA, Zakharova LA, Ivanova LN. Immune system in vasopressin-deficient rats during ontogeny. *Bull Exp Biol Med*. (2003) 136:448–50. doi: 10.1023/B:BEBM.0000017089.28428.1c
- Zakharova LA, Karyagina AY, Popova NA, Khegai II, Ivanova ALN. Humoral immune response in ontogeny of the Brattleboro rats with a hereditary defect of vasopressin synthesis. *Doklady Biol Sci*. (2001) 376:70–1. doi: 10.1023/A:1018846514511
- Chowdrey HS, Larsen PJ, Harbuz MS, Jessop DS, Aguilera G, Eckland DJ, et al. Evidence for arginine vasopressin as the primary activator of the HPA axis during adjuvant-induced arthritis. *Br J Pharmacol*. (1995) 116:2417–24. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15089.x
- de Goeij DCE, Jezova D, Tilders FJH. Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res*. (1992) 577:165–8. doi: 10.1016/0006-8993(92)90552-K
- Fodor A, Pinter O, Domokos A, Langnaeck K, Barna I, Engelmann M, et al. Blunted HPA axis response in lactating, vasopressin-deficient Brattleboro rats. *J Endocrinol*. (2013) 219:89–100. doi: 10.1530/JOE-13-0224

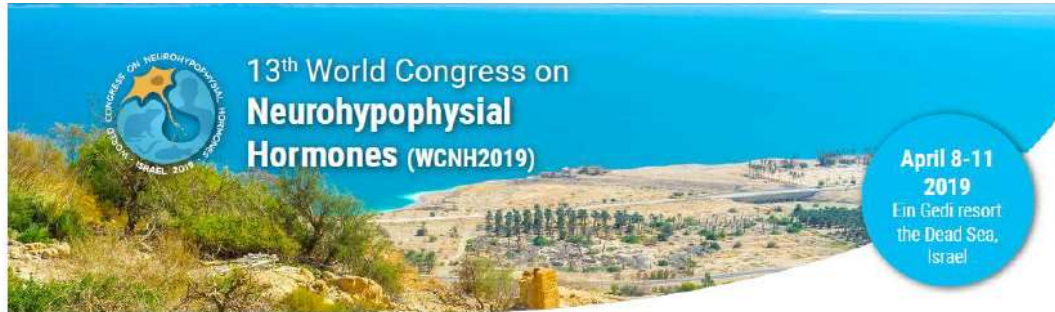
27. Herman JP, Tasker JG. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front Endocrinol.* (2016) 7:1–10. doi: 10.3389/fendo.2016.00137
28. Chang YY, Yang CH, Wang SC, Kao MC, Tsai PS, Huang CJ. Vasopressin inhibits endotoxin binding in activated macrophages. *J Surg Res.* (2015) 197:412–8. doi: 10.1016/j.jss.2015.04.042
29. Jan WC, Kao MC, Yang CH, Chang YY, Huang CJ. Phosphoinositide 3-kinase is involved in mediating the anti-inflammation effects of vasopressin. *Inflammation.* (2017) 40:435–41. doi: 10.1007/s10753-016-0489-x
30. Sigal F. Multiple effects of arginine vasopressin on prostaglandin E2 synthesis in fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* (2004) 485:53–9. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.11.049
31. Ekman R, Gobom J, Persson R, Mecocci P, Nilsson CL. Arginine vasopressin in the cytoplasm and nuclear fraction of lymphocytes from healthy donors and patients with depression or schizophrenia. *Peptides.* (2001) 22:67–72. doi: 10.1016/S0196-9781(00)00357-0
32. Johnson HM, Torres BA. A novel arginine vasopressin-binding peptide that blocks arginine vasopressin modulation of immune function. *J Immunol.* (1988) 141:2420–3.
33. Torres BA, Johnson HM. Arginine vasopressin (AVP) replacement of helper cell requirement in IFN-gamma production. Evidence for a novel AVP receptor on mouse lymphocytes. *J Immunol.* (1988) 140:2179–83.
34. Campos-Rodríguez R, Quintanar-Stephano A, Jarillo-Luna RA, Oliver-Aguilón G, Ventura-Juárez J, Rivera-Aguilar V, et al. Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in rats. *Infect Immun.* (2006) 74:1883–9. doi: 10.1128/IAI.74.3.1883-1889.2006
35. Hu SB, Zhao ZS, Yhap C, Grinberg A, Huang SP, Westphal H, et al. Vasopressin receptor 1a-mediated negative regulation of B cell receptor signaling. *J Neuroimmunol.* (2003) 135:72–81. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00442-3
36. Chassin C, Hornef MW, Bens M, Lotz M, Goujon J-M, Vimont S, et al. Hormonal control of the renal immune response and antibacterial host defense by arginine vasopressin. *J Exp Med.* (2007) 204:2837–52. doi: 10.1084/jem.20071032
37. Boyd JH, Holmes CL, Wang Y, Roberts H, Walley KR. Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R. *Resuscitation.* (2008) 79:325–31. doi: 10.1016/j.resuscitation.2008.07.006
38. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc.* (2008) 3:1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
39. Quintanar-Stephano A, Organista-Esparza A, Chavira-Ramirez R, Kovacs K, Berci L. Effects of neurointermediate pituitary lobectomy and desmopressin on acute experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Neuroimmunomodulation.* (2012) 19:148–57. doi: 10.1159/000330578
40. Bongiovanni B, Mata-espinoza D, Attilio LD, Leon-contreras JC, Marquez-velasco R, Bottasso O, et al. Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* (2015) 95:562–9. doi: 10.1016/j.tube.2015.05.011
41. Hundie GB, Woldemeskel D, Gessesse A. Evaluation of direct colorimetric MTT assay for rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* (2016) 11:1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0169188
42. Quintanar-Stephano A, Ventura-Juárez J, Sánchez-Alemán E, Aldaba-Muruato LR, Cervantes-García D, Gonzalez-Blas D, et al. Liver cirrhosis reversion is improved in hamsters with a neurointermediate pituitary lobectomy. *Exp Toxicol Pathol.* (2016) 69:496–503. doi: 10.1016/j.etp.2017.04.006
43. Tabara A, Tsukada J, Tomura Y, Yatsu T, Shibasaki M. Vasopressin increases type IV collagen production through the induction of transforming growth factor-beta secretion in rat mesangial cells. *Pharmacol Res.* (2008) 57:142–50. doi: 10.1016/j.phrs.2008.01.003
44. Branchfield K, Nantie L, Verheyden JM, Sui P, Wienhold MD, Sun X. Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science.* (2015) 351:707–10. doi: 10.1126/science.1257969
45. Van Lommel A. Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): Chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatr Respir Rev.* (2001) 2:171–6. doi: 10.1053/prvr.2000.0126
46. Brown I, Chen M. Vasopressin signal transduction in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol.* (1990) 258:L301–7. doi: 10.1152/ajplung.1990.258.6.L301
47. Elenkov IJ, Chrousos GPG. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab.* (1999) 10:359–68. doi: 10.1016/S1043-2760(99)00188-5
48. Marsland AL, Bachen EA, Cohen S, Rabin B, Manuck SB. Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. *Physiol Behav.* (2002) 77:711–6. doi: 10.1016/S0031-9384(02)00923-X
49. Martínez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis.* (2013) 207:1253–61. doi: 10.1093/infdis/jit037
50. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* (2004) 25:132–49. doi: 10.1016/j.yfrnc.2004.09.001
51. Bevilacqua M. Hyponatraemia in AIDS. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* (1994) 8:837–48. doi: 10.1016/S0950-351X(05)80304-0
52. Hoorn EJ, van Wolfswinkel ME, Hesselink DA, de Rijke YB, Koolewijn R, van Hellemond JJ, et al. Hyponatraemia in imported malaria: the pathophysiological role of vasopressin. *Malar J.* (2012) 11:26. doi: 10.1186/1475-2875-11-26
53. Hou L, Zhu L, Zhang M, Zhang X, Zhang G, Liu Z, et al. Participation of antidiuretic hormone (ADH) in asthma exacerbations induced by psychological stress via PKA/PKC signal pathway in airway-related vagal preganglionic neurons (AVPNs). *Cell Physiol Biochem.* (2017) 41:2230–41. doi: 10.1159/000475638
54. Park SJ, Shin J. I. Inflammation and hyponatremia: an underrecognized condition? *Korean J Pediatr.* (2013) 56:519–22. doi: 10.3345/kjp.2013.56.12.519
55. Rivers RPA, Forsling ML, Olver RP. Inappropriate secretion of antidiuretic hormone in infants with respiratory infections. *Arch Dis Child.* (1981) 56:358–63. doi: 10.1136/adc.56.5.358
56. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1a, tumour necrosis factor-a and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* (1997) 90:607–17.
57. Yan-Ping H, Lian-You Z, Qiang-Sun Z, Shao-Wei L, Xiao-Yan Z, Xiao-Long L, et al. Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblasts: involvement of PKC-erk1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* (2008) 52:72–81. doi: 10.1097/FJC.0b013e31817136b8
58. Grinevich V, Knepper MA, Verbalis J, Reyes I, Aguilera G. Acute endotoxemia in rats induces down-regulation of V2 vasopressin receptors and aquaporin-2 content in the kidney medulla. *Kidney Int.* (2004) 65:54–62. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00378.x
59. Hernández-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado HA, Aguilar-León D, Vilchis-Landeros MM, Mata-Espinoza DA, et al. A combination of a transforming growth factor-β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* (2006) 144:264–72. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03049.x
60. Bini EI, Mata Espinoza D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AE, et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE.* (2014) 9:e93831. doi: 10.1371/journal.pone.0093831

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

Copyright © 2019 Zetter, Barrios-Payán, Mata-Espinoza, Marquina-Castillo, Quintanar-Stephano and Hernández-Pando. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

12.2 Presentaciones relevantes del trabajo en congresos.

Presentación en el XIII World Congress of Neurohypophysial Hormones en modalidad de “Poster Blitz” (presentación corta) y discusión de hallazgos en poster durante el congreso.



Certificate of Participation

We hereby confirm the participation of

Mr. Mario Zetter,

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

We thank you for attending the conference.

Poster 7

Involvement of Vasopressin in the pathogenesis of pulmonary Tuberculosis

Mario Zetter¹, Rogelio Hernández-Pando¹, Andrés Quintanar-Stephano², Brenda Marquina¹, Dulce Mata-Espinosa¹, Jorge Barrios Payán¹

¹Experimental Pathology Section, Department of Pathology, Instituto Nacional de ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; ²Physiology and Pharmacology Department, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México

Tuberculosis (TB) is a highly complex infectious disease caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Host response is initially directed to bacilli elimination from the lung, however, it can turn pathogenic. Immune-neuroendocrine interactions due to Mtb aggression and persistence are intrinsically associated with pathophysiology and disease outcome, and although poorly understood, neuroendocrine modulation could allow an improvement of conventional anti-TB chemotherapy. Vasopressin (Vp), a neurohypophysial hormone with immunomodulatory effects, is abnormally high in patients with pulmonary TB. In this study a BALB/c mice model of progressive pulmonary TB was used to determine the kinetics of Vp production, cellular source and its role in disease progression. Our results showed a progressive increase of Vp synthesis in the hypothalamus during early infection, while during late active disease a significant decrease was observed. In contrast, in the lung, a progressive increase of Vp gene expression in the chronic infection was seen, being macrophages the most important source. In order to study the Vp contribution to the immunopathogenesis of pulmonary TB, pharmacologic manipulation was done using antagonist (conivaptan) and agonist (desmopressin) of Vp. Pharmacologic agonism of Vp receptors resulted in increased bacillary burdens and fibrosis, while blockade of Vp receptors reduced bacterial loads. Accordingly, treatment of infected alveolar macrophages with Vp in cell cultures resulted in a higher number of intracellular Mtb and impaired cytokine production. Thus, it seems that Vp is ectopically produced in the tuberculous lungs, being macrophages its most important source; high and sustained production of Vp during active late disease has an anti-inflammatory and tissue reparative activities, which could be deleterious; and its pharmacologic suppression reactivate protective immunity and can contribute to shortening conventional chemotherapy being a new form of immune-endocrine therapy.

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



RegPep2018

Biennial
Meeting

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

Certificate

recognizing

Mario Zetter

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

Lee E. Eiden

Limei Zhang

Co-Chairs **RegPep2018**



Presentación Oral (Workshop Lecture), Congreso de la Sociedad Mexicana de Inmunología, Congreso de la Asociación latinoamericana de Inmunología, 2018, Cancún, México.



XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI
Latin American Immunologists Fighting Disease
May 14 -18, 2018

Certificate

This is to confirm that
Mario Alberto Zetter Salmón

For the lecture at the Workshop
The contribution of Vasopressin to pulmonary tuberculosis Immunopathology

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

May 14 -18, 2018
Cancún, Quintana Roo


Dr. Leopoldo Santos Argumedo
ALAI President


Dr. Humberto Lenz
ALAI Secretary


Dr. Rosana Pelayo
SMI President


Dr. Gustavo Pedraza
SMI Secretary

Contribution of vasopressin to pulmonary tuberculosis immunopathology

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

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

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

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

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

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

Conflict of Interest

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

References

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

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmissionViewDetails.aspx?stage=100&articleid=359052&submissionid=371039>

1/2

Presentación de póster en el XXII Congreso Nacional de Inmunología,
Zacatecas, México, 2016

