



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EVOLUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN UN MODELO MURINO
DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y SU TRATAMIENTO CON
DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)**

TESIS
PARA OPTAR PARA EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
M. EN C. MANUEL OTHONIEL LÓPEZ TORRES

DIRECTOR DE TESIS
DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR
RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*EVOLUCIÓN DE TUBERCULOSIS EN UN MODELO MURINO DE
DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y SU TRATAMIENTO CON
DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)*

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBT), UNAM.

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Dr. Rogelio Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

El autor recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para la realización de sus estudios de Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México con número de becario

ÍNDICE GENERAL

PARTE I TESIS DOCTORAL

CAPITULO I

| | |
|---------------------------------|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS..... | 3 |
| ABREVIATURAS..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| RESUMEN..... | 11 |

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| I. TUBERCULOSIS..... | 14 |
| a. Generalidades | |
| b. Aspectos clínicos y patológicos | |
| c. Epidemiología | |
| d. Etiología | |
| e. Respuesta inmune en la Tuberculosis | |
| f. Modelo murino de Tuberculosis experimental | |
| II. DIABETES MELLITUS (DM)..... | 31 |
| a. Generalidades | |
| b. Epidemiología | |
| c. Clasificación | |
| d. T2D | |
| e. Alteraciones inmunológicas en la DM T2 que conducen a la susceptibilidad a los patógenos | |
| III. INTEGRACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA..... | 36 |
| a. Respuesta a estrés y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal | |
| b. La activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y su contribución en la inmunopatología de la TB. | |
| c. Alteraciones endocrinas en la DM T2 | |
| d. Enzima 11 β -deshidrogenasa de hidroxiesteroide (11- β HSD) | |
| e. Hormona esteroidea suprarrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) | |

| | |
|--|-----------|
| f. 16-alfa-bromoepiandrosterona (BEA) | |
| ANTECEDENTES..... | 46 |
| <i>CAPITULO III</i> | |
| JUSTIFICACIÓN..... | 51 |
| HIPÓTESIS..... | 51 |
| OBJETIVOS..... | 51 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 52 |
| <i>CAPITULO IV</i> | |
| RESULTADOS..... | 64 |
| ESTABLECIMIENTO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN RATONES BALB/C...64 | |
| a) Hiperglicemia e hiperinsulinemia. | |
| b) Esteatosis hepática. | |
| c) Histología pancreática | |
| d) Resistencia a la insulina | |
| e) Tratamiento con hipoglucemiantes orales | |
| EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON <i>M. TB</i> EN UN MODELO DE T2D..... | 71 |
| a) Carga bacteriana | |
| EFFECTO TERAPÉUTICO DE DHEA Y BEA EN EL MODELO DE T2D / TB..... | 77 |
| a) Control glucémico | |
| b) Carga bacteriana pulmón y bazo | |
| c) Sobrevida y daño histológico pulmonar | |
| DISCUSIÓN..... | 82 |
| CONCLUSIONES..... | 84 |
| PERSPECTIVAS..... | 85 |
| LITERATURA CITADA..... | 86 |
| <i>PARTE II PRODUCTOS DE LA TESIS.....</i> | 91 |
| ARTICULO ORIGINAL | |
| ARTICULO DE REVISIÓN | |
| CONGRESOS | |

PARTE 1
TESIS DOCTORAL

EVOLUCIÓN DE TUBERCULOSIS EN UN MODELO MURINO DE DIABETES MELLITUS

TIPO 2 Y SU TRATAMIENTO CON DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

DEDICATORIA

Dedico en especial este trabajo a la persona que conoce todo de mi y aún así a decidido compartir su vida conmigo. Que ha estado en todo el proceso de esta labor que muy pocos comprenden y son parte. **Belem Beltrán Maldonado** llegaste a mi vida y me haz visto y sido parte de mi crecimiento. Te amo y pase lo que pase siempre será así. Cheddar y yo te amamos 😊.

No se como expresar mi gratitud al hombre que me dio la vida, y estoy seguro de que hasta tu vida darías por mi. **Manuel López Cuellar**. Por darme tanto, por confiar en mi y respaldarme en toda decisión. No me alcanzara la vida para pagarte; aunque se que no lo esperas. Te amo padre.

A mi corazón y el de mi familia, a la mujer mas hermosa, sabia y tierna en mi vida. **Esmeralda Torres de la Peña** me has enseñado las lecciones mas valiosas y que siempre voy a atesorar. Te amo por lo que representas en mi y en la vida de todos lo que te rodean.

A mis sobrinas:

Marce te amo, tu vida cambio la mía, gracias por enseñarme a querer y dar sin esperar nada a cambio. Quiero ser un ejemplo para mi bebe, ser parte de tu desarrollo y contribuir a que seas lo que tu quieras. Mi mayor deseo es que seas feliz. **Elisa**, mi chinita. Te amo como no tienes idea. Cada ves que te conozco mas, veo que te pareces mas a mi. Eres muy especial e iluminas todo con tu sonrisa. **Victoria**, amo tu ternura, amo darte un besiti en tu cachecitos. Te he extrañado infinidad de veces, doy gracias a mi hermana que me dejo estar contigo en tu primer año de vida. **Valentina**, aunque no he convivido contigo te amo por que eres hermosa.

Dedico este trabajo a mis hermanos **Daniel e Itzel**, una de las experiencias mas hermosas es haber conocido el amor que experimento y siento por ustedes. Son una luz en mi vida. También a dedico este trabajo a **Cecilia y Alfonso López**; por que los amo como dos hermanos mas y son motivo de felicidad a mi vida, por compartirla la suya con mi familia.

Quiero hacer un homenaje a un amigo muy especial, que, aunque ya no estas con nosotros tu amistad y tus enseñanzas cimbraron y moldearon los que soy hoy en día. **Pablo Morales Morales** siempre te llevo en mis recuerdos. Gracias por creer en mi, me hubiera gustado que estuvieras en este momento.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por lo que soy, pero sobre todo por lo que puedo ser cuando confío en él. Al pasar de los años me doy cuenta de que, aunque no puedo demostrar su presencia la puedo sentir. Que, en las situaciones más complicadas de mi vida, que en el silencio de la mañana percibo su presencia en mi vida. Lo veo en mi familia, amigos y en las tantas personas que han sido parte de mi vida.

A mis dos mejores amigos

Octavio Ramos Espinosa y Mario Zetter Salmon, Gracias por tantas cosas vividas, no cambiaría nada.

A mis amigos de patología experimental

Ilse Mendoza e Iris Paredes que siempre estuvieron conmigo y creyeron en mí. A León Islas, Jackie Lara, Vasti Lozano, Marco Polo, Milena, Paola, Irene, Alejandra, Vari, Alex y Dr. Barrios. Gracias.

Agradezco su apoyo a la Dra. Dulce Mata, en especial en el último año de mi doctorado; fue el mejor. De igual forma agradezco a la Dra. Brenda Marquina por su apoyo en la realización de mis experimentos y por su amistad. De igual forma agradezco a Ere por ser un apoyo para todos los estudiantes en el laboratorio.

CAPITULO I

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”
(Albert Szent-Györgi)*

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Tasa de incidencia de TB en países con al menos 100,000 casos | 14 |
| Figura 2. Respuesta inmune contra TB | 24 |
| Figura 3. Esquema representativo del modelo murino de TB pulmonar experimental | 25 |
| Figura 4. TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c. | 28 |
| Figura 5. Regulación de la secreción de glucocorticoides en respuesta al estrés por el eje hipotalámico-hipófisis -adrenal | 37 |
| Figura 6. Función fisiológica de las dos isoformas de la 11- β HSD. | 40 |
| Figura 7. Estructura química de dehidroepiandrosterona (A) y 16-alpha-Bromoepiandrosterone (HE2000) (B). | 41 |
| Figura 8. Efecto de la activación sostenida del eje HPA y cortisol en el metabolismo que predisponen a la RI y el desarrollo de T2D / TB. | 44 |
| Figura 9. Diagrama del diseño experimental seguido en este trabajo. | 53 |
| Figura 10. Experimento con hipoglucemiantes orales en ratones BALB/c con T2D. | 56 |
| Figura 11. Esquema metodológico del modelo de T2D / TB. | 58 |
| Figura 12. Esquema metodológico del tratamiento con DHEA en el modelo T2D / TB. | 58 |
| Figura 13. Patología metabólica y hepática de ratones diabetes mellitus tipo 2 | 65 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 14. Curso de tuberculosis pulmonar en ratones diabéticos (T2D/TB) y no diabéticos (TB). | 67 |
| Figura 15. Expresión génica y fuentes celulares de glucocorticoides GC y sus enzimas convertidoras en TB activa tardía. | 69 |
| Figura 16. Efecto terapéutico de BEA en ratones TB y T2D / TB. | 72 |
| Figura 17. Efecto de BEA sobre la producción de GC de pulmón y la expresión génica de sus enzimas convertidoras en ratones TB y T2D / TB. | 73 |
| Figura 18. Efecto de BEA en el hígado de ratones T2D / TB | 74 |

Cuadros

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Características principales de la etapa temprana del modelo experimental de TB pulmonar | 26 |
| Cuadro 2. Características principales de la etapa avanzada del modelo experimental de TB pulmonar | 27 |
| Cuadro 3. Composición de la dieta hipercalórica para inducir T2D en ratones BALB/c | 54 |
| Cuadro 4. Composición de la dieta control Chow. | 55 |
| Cuadro 5. Factores de dilución utilizados para cuantificar UFC. | 59 |
| Cuadro 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real | 61 |

ABREVIATURAS

BEA-16-alpha-bromoepiandrosterone

DHEA – Dehydroepiandrosterone

BEA- Bromoepiandrosterona

DM- Diabetes Mellitus

T2D Diabetes Mellitus Tipo 2

TB- Tuberculosis

M tb- *Mycobacterium tuberculosis*

11-βHSD1 – 11 beta hidroxisteroides deshidrogenasa tipo 1

11-βHSD2 - 11 beta hidroxisteroides deshidrogenasa tipo 2

ABSTRACT

In the last three decades, 314 million new cases of Diabetes Mellitus (DM) were reported. This pandemic disease is a well-recognized risk factor for Tuberculosis (TB), with a 3-fold susceptibility rate increase. Although numerous studies have found several immune abnormalities in DM that favors TB development, the immune-endocrine mechanisms of this comorbidity have not been studied. Both diseases are characterized by excessive glucocorticoid production, by the overstimulation of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11- β HSD1). This enzyme has reductase activity for 11-ketosteroids products, catalyzes the conversion of inactive cortisone to active cortisol, and it seems that in DM can increase the production of cortisol in diverse tissues, such as the liver, adipose tissue, striated muscle, and lungs, promoting insulin resistance and suppression of Th-1 response that could contribute to the high susceptibility to TB. Therefore blocking 11- β HSD1 could improve glucose metabolism and increases the protective Th-1 response in TB.

The adrenal steroid hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) physiologically blocks the activity of 11- β HSD1, and diverse analogues have been developed with the same activity but without androgenic effects such as its synthetic analogue 16-alpha-bromoepiandrosterone (BEA, SD Chem).

In this work, we evaluated the effect of DHEA or BEA in a mice model of T2D/TB and TB. BALB/C DM mice were infected with a high dose of *M. tuberculosis* and after two months of infection, we treated the T2D/TB animals with DHEA or BEA.

This treatment produced a significant reduction of hyperglycemia, liver steatosis, pulmonary bacillary loads and pneumonia. Thus, it seems that high 11- β HSD1 activity in DM and TB produce high cortisol production that is deleterious in the comorbidity DM/TB

and using glucocorticoid antagonist hormones such as DHEA or BEA is a beneficial and novel therapy for both diseases.

RESUMEN

En las últimas tres décadas, se reportaron 314 millones de casos nuevos de diabetes mellitus T2D. Esta enfermedad es un factor de riesgo reconocido para la infección con TB, con un aumento de la tasa de susceptibilidad de 3-7 veces. Esto vuelve al binomio diabetes-tuberculosis en una importante problemática de salud pública.

Aunque diversos estudios han encontrado anomalías inmunes en la T2D que favorecen el desarrollo de la TB, no se han estudiado los mecanismos inmunoendocrinos de esta comorbilidad. Ambas enfermedades se caracterizan por una producción excesiva de glucocorticoides, debido principalmente a la sobre estimulación de la 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11- β HSD1). Esta enzima tiene actividad reductasa para productos de 11-cetoesteroides, cataliza la conversión de cortisona inactiva en cortisol activo, en DM puede aumentar la producción de cortisol en diversos tejidos, como el hígado, el tejido adiposo, músculos y pulmones estriados, incrementando la resistencia a la insulina y la supresión de la respuesta de los linfocitos Th-1. En conjunto estas alteraciones podrían contribuir a la susceptibilidad a la infección con tuberculosis. Por lo tanto, el bloqueo de la actividad de 11- β HSD1 podría mejorar el metabolismo de la glucosa en la T2D y favorecer la respuesta protectora Th-1 en TB.

Fisiológicamente, la hormona esteroidea suprarrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) regula negativamente la 11- β HSD1. Diversos análogos de esta hormona se han desarrollado con la misma actividad, pero sin efectos androgénicos como el análogo sintético 16-alfa-bromoepiandrosterona (BEA, SD Chem).

En este trabajo, evaluamos el efecto del tratamiento con BEA en un modelo murino (BALC/c) de T2D después de dos meses de infección con *M. tuberculosis*.

Este tratamiento produjo una reducción significativa de hiperglucemia, esteatosis hepática, carga bacilar (UFC) en pulmón y neumonía. Por lo tanto, parece que la elevada actividad de 11- β HSD1 en T2D y TB produce un incremento de cortisol que es perjudicial en la comorbilidad de T2D/TB y el uso de hormonas antagonistas de glucocorticoides como DHEA o BEA es una terapia beneficiosa y novedosa para ambas enfermedades.

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

I. TUBERCULOSIS

a. Generalidades

TB es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo de la historia, y ha sido causa de enfermedad y muerte durante más de 20,000 años. Fue reconocida y descrita por Hipócrates y Galeno en el Mundo Clásico [1], además en el antiguo Egipto, la India y el Lejano Oriente [2]. Los síntomas que atrajeron la atención fueron los de la TB ósea, donde el daño en las vértebras tuvo como consecuencia escoliosis y la enfermedad de Pott. Además de los síntomas asociados con la TB pulmonar, como fiebre, pérdida de peso y la hemoptisis (tos con sangre). En el Reino Unido, las lesiones tuberculosas de los ganglios linfáticos conocidas como escrófula (linfadenitis cervical), o mal del rey, y lesiones tuberculosas de la piel fueron descritas como Lupus vulgaris o chancro tuberculoso. La paleopatología de restos óseos antiguos, junto con los informes clásicos e históricos, demuestran que la TB se produjo en la prehistoria. Desde un punto de vista histórico evolutivo, existen evidencias de TB espinal desde el neolítico, pero es a partir de la revolución industrial donde la enfermedad adquiere carácter endémico, debido a una mayor aglomeración de la población en las urbes, lo cual facilitó su diseminación [3].

A partir de 1985, comienza a emerger la TB en los países desarrollados. Los factores postulados para explicar esta reemergencia de la enfermedad son varios [4]:

- El compromiso del sistema inmune en los individuos infectados por el VIH, que permite tanto una reactivación de una antigua infección, como un aumento de la susceptibilidad a una nueva infección
- Cambios sociales: aumento del índice de pobreza y hacinamiento

- Falla en los sistemas de control de la salud pública
- Emergencia de bacilos tuberculosos multirresistentes
- Escasa asignación de recursos para la investigación de nuevas drogas, nuevos métodos diagnósticos y vacunas.

b. Aspectos clínicos y patológicos

La infección con *M. tuberculosis* sigue ciertos patrones que se han establecido a partir de los modelos en animales, así como de la observación de la TB humana. Estudios experimentales sugieren que la transmisión se realiza por vía aérea y comienza con la inhalación de aerosoles (gotitas de 1 a 2 micras) que contienen al bacilo y que fueron producidas por un individuo o animal enfermo. Una vez alojado el bacilo en los alveolos, comienza la propagación a otros tejidos, la formación de lesiones y la destrucción del sitio afectado. Al llegar a los pulmones puede diseminarse a todo el organismo (TB miliar) [4].

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

hemoptisis como resultado de la formación de cavitaciones, áreas caseosas y fibrosis, es decir, el proceso infeccioso se vuelve crónico [4].

c. Epidemiología

La TB es la principal causa de muerte por un sólo agente infeccioso, por arriba del Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH). En el año 2018, 10 millones de personas desarrollaron TB, equivalente a 132 casos por cada 100,000 habitantes y 1.3 millones murieron por esta causa [5]. En este mismo año se reportaron 558 000 casos de personas con cepas multifármacoresistente (MDR, por sus siglas en inglés) de los cuales el 8.5% eran extensamente farmacoresistente (XDR, por sus siglas en inglés). Se calcula que un cuarto de la población mundial tiene TB latente (TBL) y en los países no endémicos se estima que el 10% de los individuos con esta condición desarrollarán enfermedad activa por reactivación bacteriana [6]. TB es una enfermedad prevalente en países en desarrollo y en condiciones de pobreza. Circunstancias como la desnutrición, diabetes mellitus e infección por VIH incrementan el riesgo de padecer TB [7].

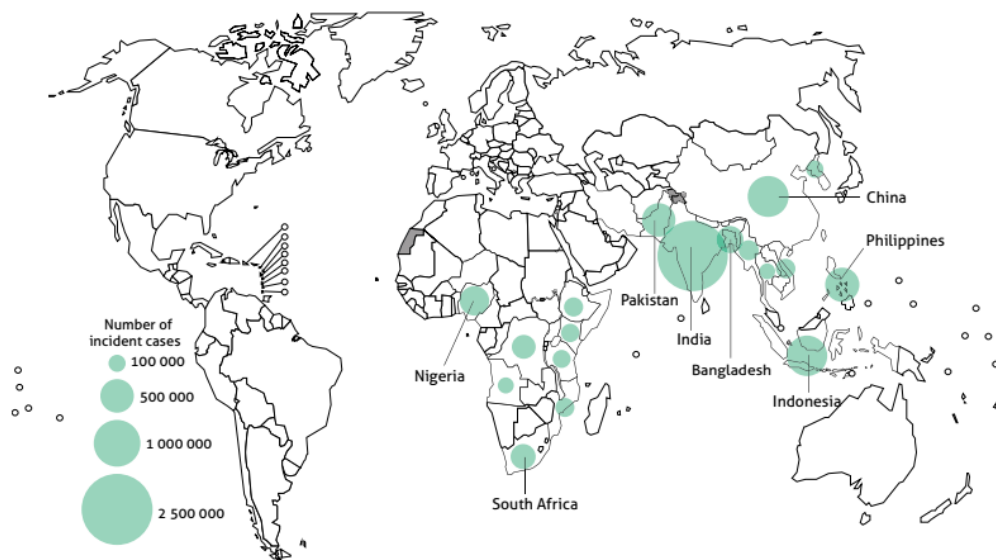


Figura 1. Tasa de incidencia de TB en países con al menos 100,000 casos [5].

d. Etiología

Las micobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han acompañado al hombre a lo largo de su historia. *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* son los agentes etiológicos más frecuentes de las dos enfermedades más conocidas de este género.

Poco tiempo después que Roberto Koch descubriera *M. tuberculosis* en 1882, fueron identificadas otras micobacterias, constituyendo el grupo de las micobacterias atípicas. El hallazgo de estas últimas estuvo vinculado por años a colonización transitoria o contaminación de la muestra clínica, pero es a partir de 1950 que se les ha asignado un rol en determinadas patologías [3].

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5 μm de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otras lento. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). El contenido de bases de guanina más citosina en la molécula de ADN es de 62 a 70 % [8].

La pared celular de las micobacterias está compuesta principalmente por un complejo de tres elementos unidos covalentemente denominado micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (AGP), el cual contiene un alto porcentaje de entrecruzamiento y residuos de ácido murámico glicosilados. Unido a éste, se encuentra el arabinogalactano (AG), un heteropolisacárido complejo constituido por una cadena linear de residuos de D-galactofuranosa y dos o tres cadenas laterales de arabinano. Los ácidos micólicos (MA) se encuentran unidos en los

extremos del arabinano [9]. La capa externa de la pared celular se encuentra constituida por lípidos como el dimicoserosato (PDIM), glicolípidos fenólicos, trehalosa (DAT/PAT) y sulfolípidos. El fosfatidil-myo-inositol (PIM) manósido, la lipomanana y el lipoarabinomanano (LAM) son glicolípidos que se encuentran anclados desde la membrana plasmática y se extienden hacia el exterior de la pared celular. Esta última se encuentra relacionada con la viabilidad de *M. tb* dentro del macrófago [10,11].

La complejidad estructural de la pared celular es la responsable de algunas características únicas de las micobacterias, como la resistencia a agentes químicos y desecación, baja permeabilidad a antibióticos y virulencia [12].

La TB es causada por miembros de un grupo de bacterias estrechamente relacionadas, denominado “Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*” (MTBC por sus siglas en inglés), son bacterias de crecimiento lento, que están estrechamente relacionados a nivel de su ADN y comparten secuencias idénticas en sus genes 16S; pero difieren en términos de fenotipos y preferencia del huésped. El MTBC incluye las cepas que afectan a los humanos: *M. tb*, *M. africanum* y *M. Canetti*. Estas bacterias son parásitos obligados y tienen la capacidad de alterar la respuesta inmune mediada por células del huésped con el fin de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos [8].

e. Factores de riesgo

El riesgo de progresión a infección y enfermedad son dos aspectos diferentes y la comprensión adecuada de estos factores es esencial para planificar las estrategias de control de la TB. El riesgo de infección después de la exposición al bacilo se rige principalmente por factores exógenos y está determinado por una combinación intrínseca de la infecciosidad del caso fuente, la proximidad al contacto y los factores de riesgo sociales y conductuales, como el tabaquismo, el alcohol y la contaminación del aire en interiores. En entornos con mayores

posibilidades de mezcla social (junto con hacinamiento), la transmisión será alta. Del mismo modo, las condiciones que prolongan la duración de la exposición a un paciente infeccioso incluyen factores relacionados con el sistema de salud, como la demora en el diagnóstico. Los factores que aumentan la progresión de la infección a la enfermedad son principalmente endógenos (relacionados con el huésped). Las afecciones que alteran la respuesta inmune aumentan el riesgo de progresión a enfermedad con coinfección por VIH, la más importante de ellas. Sin embargo, a nivel de la población, el impacto de este factor de riesgo podría variar dependiendo de la prevalencia local del VIH. La diabetes, el alcohol, la desnutrición, el humo del tabaco y la contaminación del aire en interiores son factores que afectan a una gran parte de la población y aceleran la progresión a la enfermedad de la tuberculosis [13].

f. Respuesta inmune en Tuberculosis

El pulmón es el sitio principal donde ocurre la infección por *Mtb* y por lo tanto es un órgano crítico, por esta razón, el que se establezca una respuesta inmune no controlada puede tener repercusiones en su función fisiológica de dicho órgano [14].

Respuesta inmune innata en TB

M. tb expresa una serie de moléculas que interactúan con las diferentes células del hospedero e inducen una respuesta inmune lenta y por lo general insuficiente durante la cual el bacilo tiene la oportunidad de proliferar ampliamente [15].

En la defensa contra *M. tb* participan diferentes células como polimorfonucleares (PMNs), natural killers (NKs), linfocitos $\gamma\delta$ ($L\gamma\delta$ s), macrófagos ($M\phi$ s) y células dendríticas (DCs) algunas de las cuales inducen, además, la respuesta inmune adquirida [16].

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

NKs: Migran al lugar por el cual ingresa el bacilo, después de las PMN, e inician la producción de IFN- γ para activar a los M ϕ s. Participan en el proceso de apoptosis de macrófagos invadidos por el bacilo.

L γ δ s: Reconocen glicolípidos que les son presentados por moléculas CD1, y que los activan haciéndolos citotóxicos. Su número se incrementa notoriamente en pacientes con tuberculina positiva. Se sospecha que participan en la inducción de la apoptosis de los M ϕ s infectados con el bacilo.

M ϕ s: La acción de estas células contra *M. tuberculosis* es compleja. El bacilo se adhiere al M ϕ por medio de diferentes receptores, como los del complemento, CR1, CR2, CR3, y CR4, el receptor para manosa y el TLR-2, entre otros. Una vez dentro del fagosoma, la bacteria emplea diferentes estrategias para evitar los mecanismos de la respuesta inmune innata. Con ellas convierte al M ϕ , en un hábitat ideal dentro del cual “vive tranquilamente”. Paradójicamente la célula encargada de la destrucción del bacilo, el M ϕ , le sirve inicialmente de albergue y protección contra los anticuerpos y linfocitos T activados. El hospedero produce LRG-47 (análoga al óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)), que induce la acidificación de los lisosomas y la fusión de estos al fagosoma para facilitar la destrucción del bacilo. También produce SP110, encargada de controlar la replicación de las micobacterias y define si el M ϕ debe morir por necrosis o por apoptosis. La muerte por necrosis libera bacilos vivos que diseminan la enfermedad, en tanto que en la muerte por apoptosis se liberan antígenos que al ser capturados por las DCs y presentados a los linfocitos T, inician una respuesta inmune adquirida (17, 18).

DCs: Capturan, interiorizan y generan los radicales más antigénicos que son presentados por moléculas HLA. Migran luego a los ganglios linfáticos mediastinales para presentar los

distintos antígenos a los linfocitos T CD4+, que migran al pulmón e inician la producción de IFN γ y TNF α , citocinas que actúan sobre los M ϕ s. Al fagocitar nuevos bacilos estos M ϕ s activados logran iniciar una serie de mecanismos metabólicos encaminados a producir radicales del O $_2$, para destruirlo. Si los bacilos logran salir del M ϕ antes de que este sea activado, invaden otros que estén cerca de la zona afectada, se incrementa el riesgo de diseminación porque pueden escapar al torrente circulatorio generando una bacteriemia que difunde la infección a territorios fuera del pulmón [17].

Respuesta inmune adaptativa en la TB

Linfocitos T CD4+

Son esenciales en la defensa contra *M. tb*. La activación de linfocitos T vírgenes tiene lugar transcurridas varias semanas de la entrada de la micobacteria por vía aérea, y esto ocurre únicamente en los ganglios linfáticos de drenaje a donde el bacilo es llevado por las DCs [17]. Los linfocitos T CD4+ activados en el ganglio migran al pulmón en donde empiezan a acumularse para iniciar un proceso inflamatorio que, por lo general, logra detener la reproducción del bacilo. El IFN γ , generado por los linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y NKs es clave en la activación de los M ϕ s para la destrucción de los bacilos, pero no es suficiente por sí solo, se necesita de la participación del TNF α producido por los M ϕ s, DCs, y linfocitos T que actúa sinérgicamente con el IFN γ para destruir al bacilo [17, 18].

Con el incremento en la producción de IFN γ las DCs responden a la presencia de *M. tuberculosis* con la producción de IL23 e IL12 [17, 18].

Diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ participan en la defensa contra *M. tuberculosis* [17, 18, 19].

Linfocitos Th17: Atraen y activan PMNs, células que cumplen una acción muy limitada en la defensa contra la bacteria. Producen la citocina proinflamatoria IL17.

Linfocitos Th1: Generan citocinas proinflamatorias que activan a los Mφs.

Linfocitos Th2: Producen IL4 e IL5, que ayudan en la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos que, actuando como opsoninas, facilitan la fagocitosis de los bacilos liberados por lisis de células infectadas.

Linfocitos Treg: Pueden ser activados en infecciones prolongadas y frenar la defensa dada por los linfocitos Th1 ocasionando una reactivación de la infección.

Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ participan en el control de la infección por *M. tuberculosis*, pero en menor grado que los linfocitos T CD4⁺. Lo hacen por medio de la producción de granulosinas que son tóxicas para el bacilo. Estos linfocitos son activados en los ganglios por las DCs y por antígenos liberados de la bacteria que pasan del fagosoma al citoplasma de los Mφs, estos antígenos son transportados a la membrana del Mφ para ser presentados por moléculas HLA-1 y CD1 [17, 18, 19].

La respuesta inmune contra *M. tuberculosis* involucra las citocinas IL12, IL18, IFN γ y el TNF α , necesarias para la activación del Mφ. La IL10 tiene una acción perjudicial ya que disminuye el efecto de la IL12 y del TNF α . El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) activa a los Mφs infectados, pero disminuye la acción de los linfocitos T [17, 18, 19].

Los linfocitos T CD4⁺ que son activados en los ganglios linfáticos por las DCs, migran al pulmón y además de activar a los Mφs, inducen la formación de granulomas por medio de IFN- γ y de las IL1 e IL2 [17, 18, 19].

El granuloma tuberculoso en el humano se forma de un núcleo central de células epitelioides y MØ que es rodeado por LT CD4⁺ y más externamente por LT CD8⁺ y finalmente por fibroblastos que forman un halo de fibrosis que llega a calcificarse y crea un área de hipoxia.

Con la hipoxia se induce la muerte de las células colindantes con la formación de zonas necróticas, esto aumenta la cantidad de cáseum, que puede erosionar la capsula fibrosa del granuloma, y escapar a un bronquiolo facilitando la dispersión intrapulmonar de la infección y dando origen a la formación de cavernas, características de la TB avanzada (Figura 1) [17, 18, 19].

Citocinas en la TB

TNF- α e IFN- γ son citocinas cruciales en la respuesta inmune contra TB. Su relevancia en la infección por Mtb ha sido evidenciada por observaciones en pacientes que reciben terapéuticamente anticuerpos monoclonales anti-TNF- α y en individuos con mutaciones en los genes relacionados con IFN- γ y sus vías de señalización [18, 19].

La expresión de TNF- α es inducida tras la estimulación de células fagocíticas con componentes bacterianos y contribuye de forma importante en la activación de M ϕ para la eliminación intracelular de Mtb, además de modular la apoptosis en células infectadas [19]. Esta citocina es una de las principales inductoras de la producción de AMPs (antimicrobial peptides) en células del sistema inmune y epiteliales [20].

TNF- α tiene una función importante para la formación del granuloma y polimorfismos en esta citocina se encuentran vinculados con susceptibilidad al desarrollo de TB. De forma contraria, un exceso en la producción de TNF- α contribuye en la inmunopatología de la enfermedad [19].

TNF α actúa de forma sinérgica con IFN- γ para la activación de M ϕ para el control del crecimiento bacteriano. El IFN- γ potencia la transcripción de genes con actividad moduladora de la respuesta inmune, además de aumentar la capacidad fagocítica y citotóxica de los MO. Adicionalmente induce la expresión de citocinas como IL-12, IL-15, TNF- α , la enzima iNOS y activación del factor de transcripción NF κ B. Al igual que con TNF- α , polimorfismos genéticos en el eje IFN- γ /IL-12 o en los receptores IFNGR1 e IFNGR2, incrementan la susceptibilidad a TB [18, 21, 22].

De gran relevancia son otras citocinas como IL-1 β , la cual es producida por monocitos, M ϕ y DCs [19]. Esta citocina es expresada de forma abundante en pacientes con TB y, en modelos murinos, la deficiencia de esta citocina o su receptor (IL-1R) favorece el crecimiento bacteriano e impide el adecuado mantenimiento del granuloma después de la infección por Mtb [23]. También se ha descrito su papel como inductor de la migración de las células inmunes al sitio de infección, promoviendo la expresión de selectina L y selectina E para iniciar el anclaje de estas células al endotelio.

IL-12 es producida por células fagocíticas tras la infección por Mtb. Tiene un papel importante en la inducción de la producción de IFN- γ . Ratones knockout (KO) para esta citocina y para su receptor (IL-12R) presentan susceptibilidad para infecciones micobacterianas.

Esta respuesta inflamatoria también se encuentra potenciada por acción de moléculas quimioatrayentes, donde la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) e IL-8 juegan un papel importante reclutando células polimorfonucleares (PMN) y monocitos al sitio de infección [24]. En concentraciones suficientes, los AMPs pueden formar un

gradiente de concentración que permite el reclutamiento de distintos tipos celulares al sitio de infección mediante la interacción con receptores de quimiocinas [25, 26].

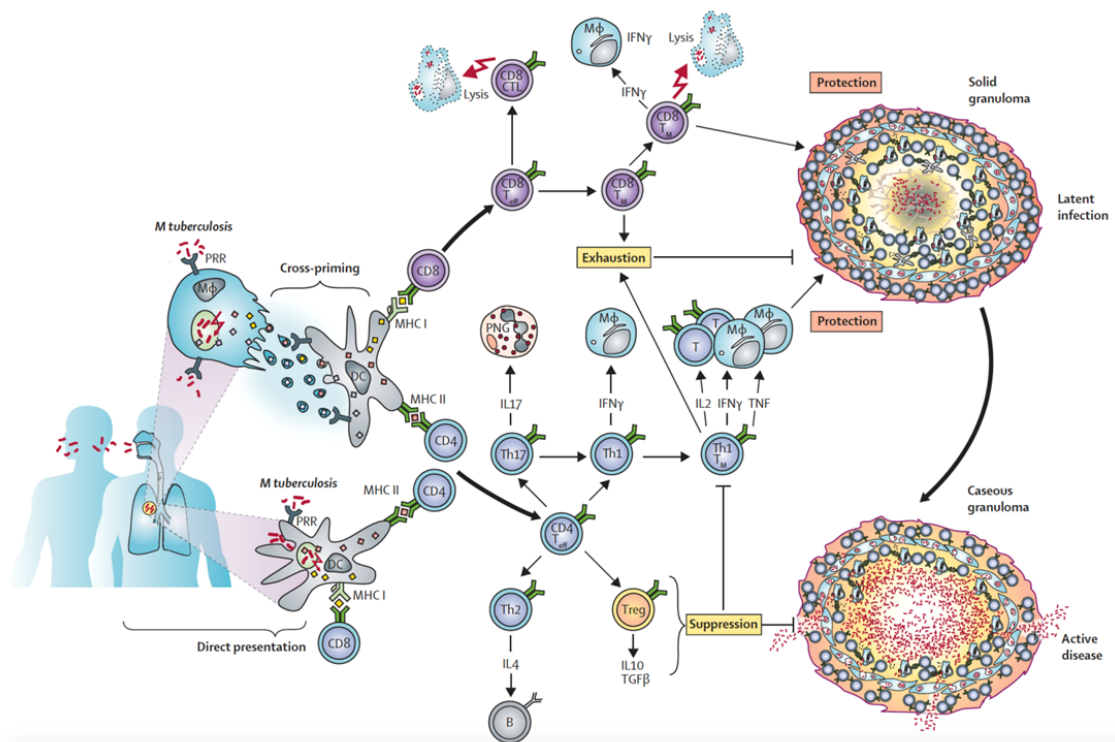
El papel protector de las citocinas antes mencionadas es antagonizado por citocinas antiinflamatorias como IL-10, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) e IL-4. IL-10 es producida por M ϕ después de la fagocitosis, así como por linfocitos T antígeno específicos. Esta citocina disminuye la respuesta proinflamatoria regulando a la baja la expresión de IFN- γ , IL-12 y TNF- α . Interesantemente, ratones deficientes de esta citocina presentan cargas bacterianas bajas tras la infección por Mtb. TGF β contrarresta la inmunidad protectora contra TB mediada por citocinas proinflamatorias. Esta citocina es producida por monocitos y DCs tras la interacción con productos micobacterianos. El LAM de bacterias virulentas induce de forma selectiva la producción de TGF- β , inhibiendo la proliferación celular y disminuyendo la producción de IFN γ . En M ϕ s, esta molécula antagoniza la presentación antigénica, producción de citocinas proinflamatorias y activación celular. TGF- β también es conocida por estar implicada en el daño tisular y fibrosis característica de la TB. En sinergismo con IL-10, TGF- β suprimen la producción de IFN- γ [27].

Los efectos deletéreos de la IL-4 son explicados por la disminución de la expresión de IFN- γ y activación macrofágica. En ratones con TB progresiva y en la reactivación de la TB latente, la expresión de esta citocina se encuentra incrementada de forma considerable [27].

Evasión de la respuesta inmune

M. tuberculosis induce en los M ϕ s modificaciones importantes gracias a cuatro estrategias diferentes de evasión de la respuesta inmunológica del huésped [27]:

- Evitar el paso al citoplasma e impedir la unión de los lisosomas al fagosoma, por la formación de una cubierta rica en triptófano. Esto contribuye a la supervivencia intracelular de Mtb dentro de la célula hospedera.
- Producir dentro del fagosoma lipoarabinomano y P13P fosfatasa, moléculas que interrumpen la maduración del fagosoma y su acción antimicrobiana en contra de la bacteria.
- El bacilo impide la acidificación del fagosoma para disminuir la producción de TNF, IL-1 e iNOS e induce la producción de citocinas regulatorias como IL10 y TGFβ que desvían la respuesta inmune a un ambiente anti-inflamatorio. Esto permite un ambiente propicio para la micobacteria.
- Induce la generación de prostaglandina E2, para reforzar el proceso de desactivación de los Mφs.



Evolución de Tuberculosis en un modelo murino de Diabetes Mellitus tipo 2 y su tratamiento con Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Figura 2. Respuesta inmune contra TB. El cuerpo humano tiene un sistema de defensa que consiste en el sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico adaptativo contra los microorganismos patógenos. La inmunidad a MTB iniciada por el sistema inmunitario innato está mediada por neutrófilos, macrófagos, células NK y células T $\gamma\delta$, mientras que el sistema inmunitario adaptativo está mediado por linfocitos T y células B [28].

g. Modelo murino de Tuberculosis experimental

El modelo experimental de TB pulmonar progresiva (figura 3) desarrollado por el grupo del Dr. Hernández Pando se basa en el uso de ratones genéticamente idénticos (BALB/c) de 6 a 8 semanas de edad, que son infectados vía intratraqueal con una dosis alta (2.5×10^5 UFC) de bacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv [29].

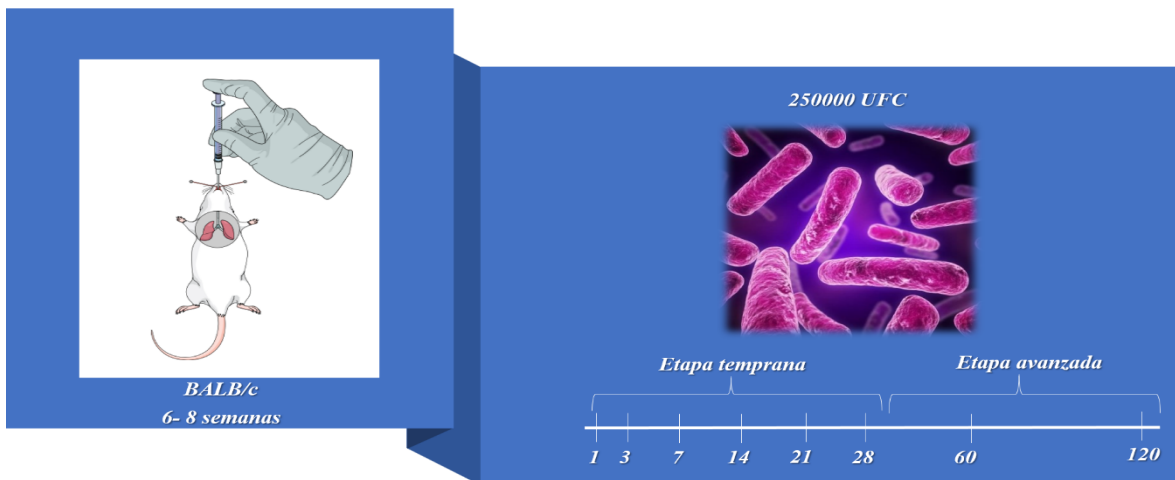


Figura 3. Esquema representativo del modelo murino de TB pulmonar experimental [29].

Este modelo se caracteriza por el establecimiento de dos etapas.

Etapa temprana

La primera fase es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia en pulmón de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, y la formación de granulomas en la segunda semana de infección, constituidos principalmente

por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos, organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos para contener a las bacterias. Dichos granulomas están constituidos principalmente por linfocitos T CD4⁺ productores de citocinas tales como IFN γ e IL2 y macrófagos activados productores de TNF α , IL1 y gran cantidad de iNOS. En el modelo, el día clave que corresponde al clímax de una respuesta protectora es el día 21, cuando los granulomas alcanzan su plena madurez [29].

Cuadro 1. Características principales de la etapa temprana del modelo experimental de TB pulmonar [29].

| | |
|--|---|
| <i>Etapa temprana (1-28 días)</i> | Infiltrado inflamatorio intersticial, perivascular y peribronquial |
| | Formación de granulomas |
| | Predominio de citocinas Th 1 IL1, TNF α , IL2, IL12, IFN γ |

Etapa avanzada

La segunda fase de la enfermedad corresponde a la etapa avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por un gran incremento en el número de bacterias vivas a nivel pulmonar, así como por áreas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial. Durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2), que se caracterizan por producir IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13. En particular, la IL4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos; además, la IL4 al igual que la IL10 y la IL13 son

eficientes antagonistas de las células Th1 y de esta manera se desvía la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad. Los Mφs disminuyen significativamente la producción de TNFα, IL1 e iNOS, e incrementan notablemente su capacidad productora de potentes citocinas anti-inflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el TGFβ y la IL10. El TGFβ es también una eficiente citocina inductora de la proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena, contribuyendo así a generar fibrosis [29].

Existe predominio de células IL2 positivas durante la fase temprana de la enfermedad (14-28 días postinfección), mientras que durante la fase progresiva de la enfermedad (días 60 y 120 postinfección) hay un balance mixto de células productoras de IL2 e IL4 [29].

Cuadro 2. Características principales de la etapa avanzada del modelo experimental de TB pulmonar [29].

| | |
|--|--|
| <i>Etapa avanzada (28-120 días)</i> | Balance Th1/Th2 (mayor IL4) Predominio de células CD8 |
| | Macrófagos desactivados Neumonía, fibrosis y necrosis |
| | Aumento de la carga bacilar. Supresión de la inmunidad celular. Progresión de la enfermedad y muerte |

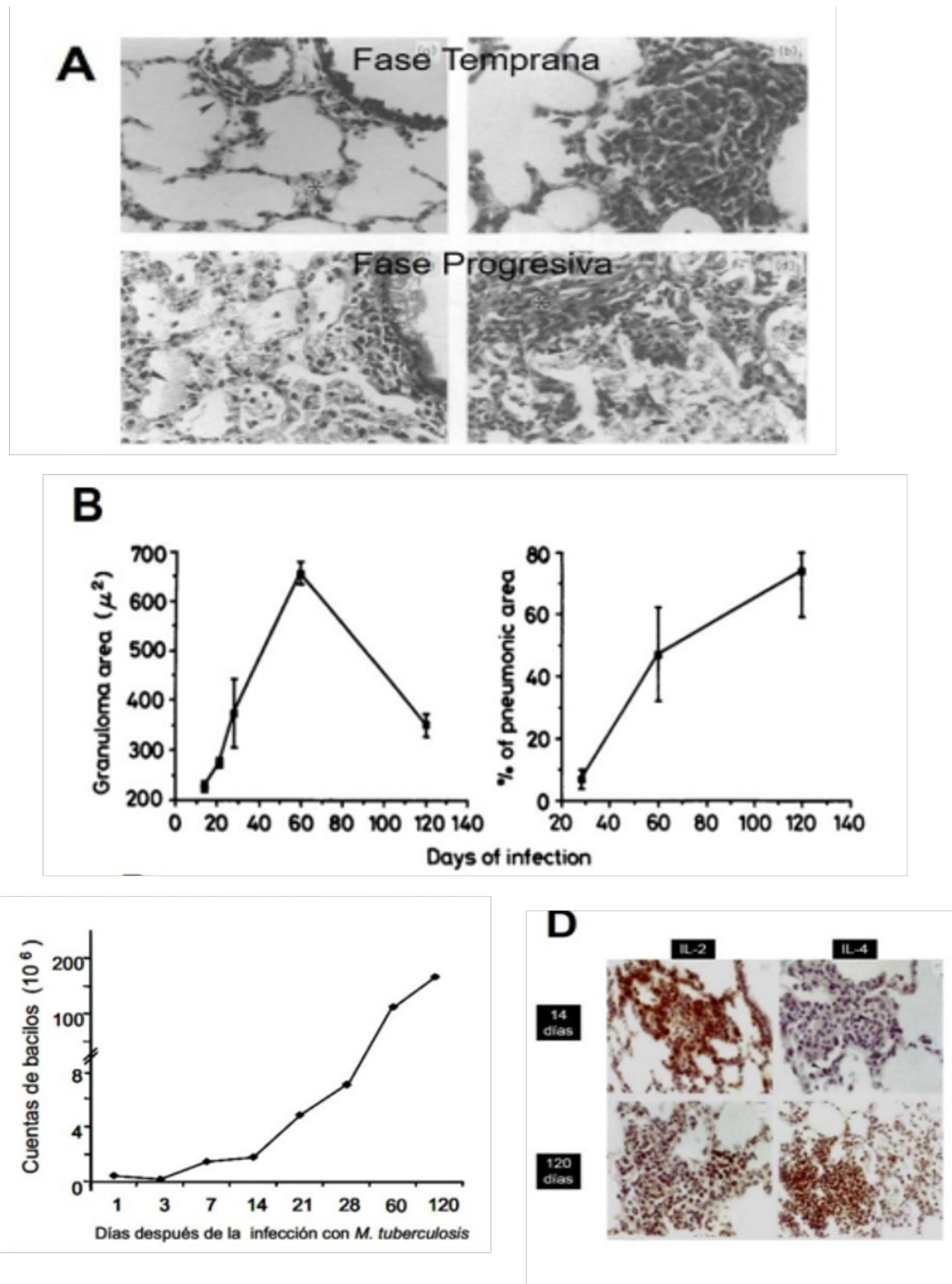


Figura 4. TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c. A) Imagen representativa de la fase temprana o aguda (inflamación y granulomas) y la fase progresiva o crónica (neumonía, necrosis y fibrosis). B) Morfología automatizada del tamaño y de la superficie pulmonar afectada por neumonía a lo largo de la enfermedad y el área de granulomas. C) Carga bacilar (UFC) en homogenizados pulmonares. D) Cinética de producción de IL2 e IL4 en granulomas durante el curso de la enfermedad. [29].

II. DIABETES MELLITUS (DM)

a. Generalidades

La diabetes mellitus clínica es un síndrome crónico de alteraciones metabólicas con hiperglicemia inapropiada, que produce una deficiencia absoluta (Diabetes Mellitus tipo 1) o relativa de la insulina (Diabetes Mellitus tipo 2). También es posible que exista un defecto en la acción de la insulina [30].

En las fases crónicas puede asociarse a complicaciones vasculares tanto de pequeño vaso (microangiopatía), como de gran vaso (macroangiopatía o aterosclerosis diabética), siendo los órganos diana, para la primera, la retina, el glomérulo renal y el sistema nervioso periférico, y para la segunda, el sistema cardiovascular. Esto junto a su alta prevalencia e incidencia, hace que sea un proceso de elevada morbimortalidad y supone, además, un verdadero problema sanitario y socioeconómico [31].

b. Epidemiología

La diabetes mellitus es un importante problema de salud en todo el mundo, por ser una de las afecciones no transmisibles más frecuentes, así como por la severidad de sus complicaciones. La diabetes mellitus es una enfermedad ampliamente estudiada que de acuerdo con la Organización mundial de la Salud afecta a 422 millones de personas en todo el mundo. En el 2016 esta enfermedad causó 1,6 millones de muertes y los niveles altos de glucemia fueron la causa de otros 2,2 millones de muertes en 2012 [32].

c. Clasificación

La diabetes se clasifica en cuatro grupos con base en los mecanismos patológicos o etiológicos conocidos:

Diabetes tipo 1: destrucción las células β sobre todo como consecuencia de algún proceso autoinmune que, por lo general, conduce a una deficiencia absoluta de la insulina. Antes llamada juvenil o diabetes mellitus insulino dependiente. Estos pacientes son propensos a padecer cetoacidosis y requieren del reemplazo de insulina. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas pueden aparecer de forma súbita [30].

T2D: puede variar del predominio de una resistencia a la insulina con relativa deficiencia de insulina al predominio de un defecto secretorio con mínima resistencia a la insulina. Es la forma más prevalente de esta enfermedad, antes llamada de la edad madura o diabetes mellitus no insulino dependiente [30].

Diabetes gestacional: La diabetes gestacional se caracteriza por hiperglucemia que aparece durante el embarazo y alcanza valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes. Las mujeres con diabetes gestacional corren mayor riesgo de sufrir complicaciones durante el embarazo y el parto. Además, tanto ellas como sus hijos tienen mayor riesgo de padecer T2D [31].

d. T2D

T2D es un desorden metabólico crónico distinguido por daño en la secreción de insulina [33]. Se caracteriza por hiperglucemia, resistencia a la acción de la insulina a nivel tisular (hígado, músculo y tejido graso) y defecto o insuficiente capacidad secretora de insulina por la célula β pancreática [31].

La etiopatogenia de la T2D es multifactorial, interviniendo factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista fisiopatológico presenta tres alteraciones más o menos constantes:

resistencia a la insulina (RI) a nivel periférico, secreción alterada de insulina en respuesta al estímulo de la glucosa y producción aumentada de glucosa endógena por el hígado. En las formas poligénicas de la enfermedad, que son las más frecuentes, estos factores genéticos, ambientales y fisiopatológicos interactúan entre sí. La alteración de la adaptación de las células β a la situación de RI en determinadas situaciones, en pacientes con predisposición genética para padecerla, precipita la enfermedad [31].

Resistencia a la insulina (RI)

La insulina es una hormona anabólica secretada por las células β del páncreas en respuesta a diversos estímulos, siendo la glucosa el más relevante [34,35]. Su principal función es mantener la homeostasis glicémica y de otros sustratos energéticos [36].

La RI se define como la disminución de la capacidad de la insulina endógena y exógena para ejercer sus acciones biológicas en los tejidos diana, a concentraciones que son eficaces en los sujetos no diabéticos. La RI es causada por mecanismos que interfieren la señalización del receptor de insulina, principalmente en el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1). Los cambios en esta señalización de IRS1, generan modificaciones en la cascada de señalización, principalmente en la fosfoinositol 3-cinasa (PI3-K), que disminuye la traslocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT 4) a la membrana [37].

La inflamación es uno de los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se puede condicionar la RI. La obesidad ha sido asociada a un estado inflamatorio crónico leve a moderado, el que se manifiesta a nivel sistémico por un aumento de los factores inflamatorios y los leucocitos circulantes [38]. A nivel tisular y particularmente en el tejido adiposo, se caracteriza por infiltración de células inmunes. Diversas adipocinas, como la leptina, adiponectina, resistina, TNF- α , y ácidos grasos libres o ácidos grasos no esterificados actúan

como antagonistas al receptor de insulina. La RI, en una primera fase se compensa por hiperinsulinemia, lo cual estimula la utilización periférica de glucosa y disminuye la producción de glucosa hepática; sin embargo, a lo largo del tiempo este mecanismo disminuye debido al deterioro progresiva de la función de las células β , apareciendo de manera gradual diferentes estados de hiperglucemia a pesar del hiperinsulinismo compensador [39].

La progresión desde la tolerancia normal a la glucosa (TNG) hasta la DM, pasando por los estados de alteración de la glucosa en ayunas (AGA) y alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG), es el resultado del deterioro gradual de la función de la célula β [40]. En el momento del diagnóstico de la DM tipo 2 se ha perdido hasta un 50% de la función de dichas células [41].

Obesidad.

Se asocia a la mayor parte de DM tipo 2, y el riesgo de padecerla aumenta en relación con el grado de obesidad y con la distribución de la grasa (obesidad central) por la relación que tiene con la RI. En su patogenia se involucran una serie de factores como los AGL, la leptina (regula la ingesta alimentaria y la RI a nivel muscular), la adiponectina (reduce la RI a través de la oxidación de los AGL), la resistina (se opone a la acción de la insulina), etc [30].

Edad.

La prevalencia de la DM tipo 2 aumenta significativamente con la edad, alcanzando el 10-15% en los mayores de 65 años y el 20% en los mayores de 80 años, y está en relación con la disminución progresiva de la sensibilidad a la insulina [30].

Cambios alimentarios.

En relación con hábitos dietéticos inadecuados como el incremento de un gran número de calorías y el consumo de colesterol, de grasas saturadas y alimentos con elevado índice glucémico [30].

e. Alteraciones inmunológicas en la DM T2 que conducen a la susceptibilidad a los patógenos.

Ciertas enfermedades infecciosas tienen mayor frecuencia y severidad en pacientes con diabetes mellitus, lo cual incrementa sustancialmente las tasas de morbilidad. La DM incrementa el riesgo para bacteremia nosocomial adquirida en la comunidad. La mayor incidencia de infecciones en diabéticos está ocasionada por la hiperglucemia relacionada, lo cual ocasiona una disfunción inmunológica caracterizada por alteraciones de la función de los neutrófilos, actividad antioxidante e inmunidad humoral disminuida [42,43].

Otras complicaciones son micro y macroangiopatía, neuropatía, trastornos en la motilidad urinaria y gastrointestinal, los cuales en conjunto contribuyen a la patogenia de los procesos infecciosos en estos pacientes. Actualmente se piensa que productos finales de la glucosilación avanzada están asociados a inactivación de componentes inmunitarios, contribuyendo a una mayor vulnerabilidad frente a infecciones [42,43].

El exceso de glucosa en la circulación sistémica puede causar un aumento en ROS y las citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6, que a concentraciones suficientemente altas pueden inhibir la función de los macrófagos. Debido al exceso de glucosa, el TGF- β se incrementa a través de la activación de AGE y su receptor RAGE, a través de PKC, que inhibe la fabricación de glutatión (GSH). La forma oxidada de glutatión (GSSG) puede reciclarse si el cuerpo tiene suficiente NADPH utilizando la enzima GSR. Sin embargo, en pacientes diabéticos, NADPH se está utilizando en gran medida en la vía del poliol, lo que lleva a una disminución general de los niveles de GSH y un aumento de ROS, lo que puede alterar los

niveles de citocinas en el cuerpo. Se ha demostrado que el aumento de GSH regula al alza la producción de IFN- γ e IL-12, favoreciendo la respuesta inmune del huésped contra la infección por M. tb [44].

La neuropatía periférica y el sistema inmune alterado se remontan a una vía metabólica común, pero por diferentes razones. Una de las complicaciones de la DM2, la neuropatía periférica, estaba relacionada con la vía del poliol y la acumulación de sorbitol debido a una deficiencia de SDH en el tejido nervioso [44].

Las complicaciones que involucran al sistema inmune no se deben a los productos de la vía Polyol sino a la sobreutilización de NADPH. El agotamiento de NADPH conduce a la incapacidad de GSR para reciclar GSH, causando disminución de GSH, aumento de ROS, diferentes perfiles de citocinas y, en última instancia, compromiso del sistema inmunológico [44].

III. INTEGRACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA

a. Respuesta a estrés y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

El estrés es un proceso de adaptación al entorno; la respuesta fisiológica involucra la liberación de mediadores solubles por parte de los sistemas inmunológico, nervioso y endocrino. Por parte de la respuesta inmune se liberan citocinas y proteínas inflamatorias, y el sistema endocrino contribuye con hormonas como la CRH (hormona liberadora de corticotropina), la ACTH (hormona adrenocorticotrópica), cortisol y DHEA (dehidroepiandrosterona). El sistema nervioso libera neurotransmisores, por ejemplo, serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y acetilcolina (Ach). La variación conjunta en los niveles de los mediadores solubles induce cambios conductuales que son necesarios para afrontar los estímulos estresantes del entorno [45].

De acuerdo con la duración, los estímulos estresantes pueden presentarse de forma aguda o crónica. El estrés agudo induce la secreción de bajos niveles de cortisol circulante durante periodos cortos y, al desaparecer el estímulo estresante, los glucocorticoides (Figura 7) conducen las Interacciones neuro-immuno-endocrinas (INEI) a un estado fisiológico basal. Sin embargo, si el estímulo estresante se mantiene por un periodo prolongado, se convierte en un proceso crónico donde la alta concentración de cortisol circulante afecta el sistema neuroendocrino y la respuesta inmunológica y conllevan a la predisposición a la enfermedad [45].

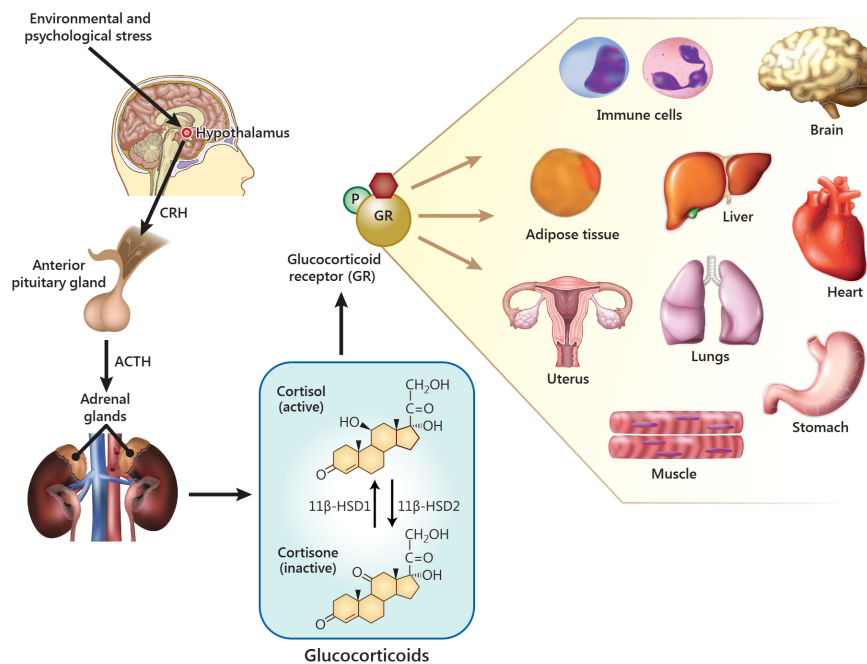


Figura 5. Tras la exposición a estrés ambiental o psicológico, el hipotálamo se estimula para que libere la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Luego, la CRH estimula la glándula pituitaria anterior para que secrete hormona adrenocorticotrófica (ACTH). A su vez, la ACTH se dirige a la corteza de las glándulas suprarrenales para liberar cortisol en el torrente sanguíneo. Una vez en circulación, el cortisol se puede convertir en la forma inactiva, cortisona, por la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2. Por el contrario, la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 convierte la cortisona en cortisol. Los glucocorticoides ejercen sus efectos al unirse a su receptor, el receptor de glucocorticoides (GR). El GR se expresa en prácticamente todos los tipos de células y tejidos. Así, la señalización de GR juega un papel importante en la modulación de un gran número de

funciones biológicas en las células inmunes y en varios órganos y tejidos, incluyendo cerebro, hígado, corazón, pulmones, tejido adiposo, sistema reproductivo, estómago y músculo. [46].

b. Efecto de los glucocorticoides en el Sistema Inmunológico

Los glucocorticoides ejercen sus efectos al unirse a su receptor, el GR. Todos los tipos de células y tejidos expresan GR. Por lo tanto, la señalización de GR juega un papel esencial en la modulación de una gran cantidad de funciones biológicas en las células inmunes y varios órganos y tejidos, incluidos el cerebro, el hígado, el corazón, los pulmones, el tejido adiposo, el sistema reproductivo, el estómago y los músculos [46].

Los glucocorticoides regulan la respuesta inmune tanto a nivel celular. A nivel celular, los glucocorticoides pueden inducir apoptosis de linfocitos T, neutrófilos, basófilos y eosinófilos para reducir la inflamación [47]. Además, modula la producción de citocinas de macrófagos inhibiendo la p38 MAPK [48].

A nivel transcripcional los glucocorticoides reprimen la expresión de citocinas proinflamatorias por las células inmunes. Además, los glucocorticoides pueden suprimir la expresión de moléculas de adhesión, lo que evita el rodamiento, la adhesión y la extravasación de neutrófilos al sitio de la inflamación. Los glucocorticoides también inducen la expresión de anexina-1. La síntesis de anexina-1 promueve una mala adhesión de neutrófilos al endotelio vascular y apoptosis. La exposición crónica a glucocorticoides provoca un cambio en el perfil de expresión génica de macrófagos, promoviendo células hacia el perfil antiinflamatorio. Finalmente, los glucocorticoides actúan sobre las células T al bloquear la producción de citocinas derivadas de Th1 e inducir la muerte celular [46].

c. Efectos metabólicos de los glucocorticoides

La acción principal de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los hidratos de carbono es el aumento de la producción de glucosa mediante el aumento de la gluconeogénesis hepática [49].

Los glucocorticoides también inducen resistencia a insulina, por lo que disminuyen la entrada de glucosa a la célula. Esta inhibición de la captación de glucosa se produce en los adipocitos, las células musculares y los fibroblastos. Además de oponerse a la acción de la insulina, los GCs pueden funcionar en paralelo con la insulina para proteger contra el ayuno prolongado mediante la estimulación del depósito y la producción de glucógeno en el hígado. Ambas hormonas estimulan la actividad de la glucógenosintetasa y disminuyen la glucogenólisis. El exceso de GCs puede producir hiperglucemia, mientras que su déficit puede causar hipoglucemia [50,51].

Los GCC aumentan los niveles de ácidos grasos libres mediante la estimulación de la lipólisis, al disminuir la captación celular de glucosa y la producción de glicerol, que es necesario para la reesterificación de los ácidos grasos. Este aumento de la lipólisis, que ocurre predominantemente en las extremidades, también se estimula a través del incremento permisivo de la acción lipolítica de otros factores como la adrenalina. En el paciente con exceso de GCs, se pierde la grasa de las extremidades, pero aumenta en el tronco (obesidad centrípeta), el cuello y la cara [51].

Por lo general, los GCs ejercen un efecto catabólico sobre el metabolismo proteico. La proteólisis en la grasa, el músculo esquelético, el hueso, el tejido linfoide y conjuntivo aumenta los aminoácidos, que pueden ser utilizados como sustratos en la gluconeogénesis [51].

d. Enzima 11 β -deshidrogenasa de hidroxisteroide (11- β HSD)

La enzima 11 β -deshidrogenasa de hidroxiesteroides es la responsable de la inter-conversión de los glucocorticoides y sus 11 metabolitos. Se han descrito dos isoformas de esta enzima. El tipo 1 posee actividad oxidativa y reductora e inter convierte cortisol activo y cortisona inactiva y requiere NADPH como cofactor. El tipo 2 actúa exclusivamente como oxidasa y convierte cortisol a cortisona y requiere NAD como cofactor. 11- β HSD tipo 2 se distribuye discretamente, con mayor abundancia en el riñón, páncreas y placenta. 11- β HSD tipo 1 se distribuye ubicuamente, principalmente en hígado, tejido adiposo, pulmón y macrófagos [52,53,54].

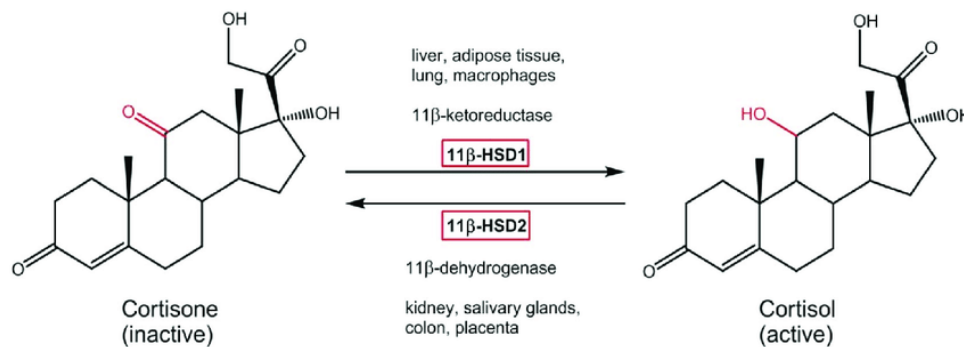


Figura 6. Función de las dos isoformas de la 11- β HSD en la conversión de los esteroides cortisol y cortisona [55].

e. **Hormona esteroidea suprarrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) y 16-alfa-bromoepiandrosterona (BEA)**

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroidea suprarrenal endógena de 19 carbonos abundante y un precursor en la biosíntesis de andrógenos, estrógenos y otros esteroides antiinflamatorios que regulan el sistema inmune. Existe una relación entre el aumento de cortisol y la disminución de DHEA en enfermedades crónicas [56]. Por lo cual se consideran moléculas antagónicas.

Distintos estudios demuestran que la DHEA tiene un efecto protector en distintas enfermedades, como la artritis reumatoide, obesidad, cáncer y diabetes. Se ha observado que la DHEA ejerce una influencia generalizada y no específica sobre el sistema inmune, lo que resulta en un aumento de la resistencia del huésped contra la infección de virus, parásitos y bacterias [57].

En un modelo murino de tuberculosis progresiva, se ha observado el efecto de DHEA como inductor de una respuesta inmune de tipo protector. DHEA promueve la polarización de la respuesta celular hacia el perfil Th1 que esta relacionado con la protección. DHEA aumenta significativamente las citocinas tipo Th1 (IL-2 e IFN- α) y disminuye los niveles de citocina tipo Th2 (IL-4 e IL-10). Además, la DHEA mejora la capacidad fagocítica del macrófago y promueve la producción de óxido nítrico (NO) al aumentar los niveles de expresión de TNF- α [57].

16-alpha-Bromoepiandrosterone (HE2000) es un esteroide sintético que limita la inflamación, mejora la inmunidad protectora y la supervivencia en estudios clínicos de pacientes con infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la malaria y la tuberculosis. HE 2000 también ha mostrado actividad in vitro contra citomegalovirus, polio, hepatitis B y C y virus de la gripe. 16 alpha-Bromoepiandrosterone inhibe la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la proliferación celular [58].

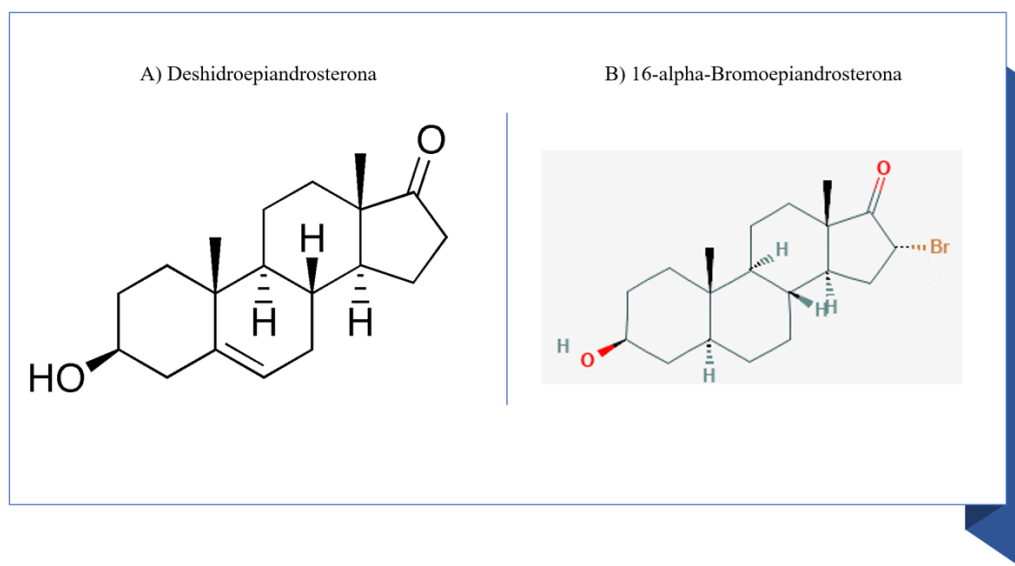


Figura 7. Estructura química de deshidroepiandrosterona (A) y 16- α -Bromoepiandrosterone (HE2000) (B) [58].

f. La activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y su contribución en la inmunopatología de la TB.

En el modelo experimental de TB pulmonar progresiva se ha demostrado que cuando la inmunidad protectora es máxima, al establecerse granulomas maduros constituidos por abundantes linfocitos Th1 y macrófagos (día 21 postinfección), las citocinas macrófagicas proinflamatorias IL1, IL6 y el TNF α que se producen en los pulmones ejercen acciones locales fundamentales en la protección antibacteriana, pero estas citocinas también circulan sistémicamente, estimulando la producción de proteínas hepáticas de fase aguda [59] y activando a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo [60]. Las glándulas suprarrenales duplican su peso incrementando el cortisol plasmático, y se estimula a las células Th2 [60]. Catabolitos no funcionales del cortisol (corticosterona) son reconvertidos en la forma activa de la hormona (cortisol), a través de la actividad de la enzima 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, contribuyendo así a generar una mayor concentración de

cortisol en los pulmones enfermos [61]. Estas mismas anormalidades se han observado en pacientes tuberculosos [61].

g. La activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal en la DM T2

El cuerpo humano posee muchos sistemas efectores para mantener la homeostasis, incluido el eje HPA. El producto final secretor del eje HPA, el cortisol, se mantiene dentro de un rango óptimo a través de la acción de retroalimentación del cortisol que interactúa con los mecanismos de control neural. Eventos o situaciones angustiantes evocan una activación prominente del sistema HPA, y después de una exposición a largo plazo, el eje HPA eventualmente se altera, lo que provocará una interrupción de los sistemas reguladores centrales [62].

Como ya se mencionó, la resistencia a la insulina, definida como una respuesta disminuida a los niveles normales de insulina circulante, es el defecto primario para el desarrollo de DM T2. Existe evidencia convincente que vincula la obesidad visceral con el desarrollo de resistencia a la insulina [62].

La centralización de la grasa corporal es probablemente un efecto del aumento de la secreción de cortisol. El exceso de glucocorticoides promueve la actividad de la lipoproteína lipasa, la enzima principal responsable de la conversión del triglicérido de lipoproteína en ácidos grasos libres (AGL) y la acumulación de triglicéridos en los adipocitos [62].

Además, la acción antilipolítica de la insulina durante el estado hiperinsulinémico predominante provoca una movilización de lípidos, lo que resulta en una mayor acumulación de lípidos [62].

Los AG plasmáticos elevados inhiben el metabolismo de la glucosa muscular e induce hiperinsulinemia. Además, el aumento de la masa de células grasas de la obesidad visceral

puede causar resistencia a la insulina al músculo, tanto al liberar AGL en la circulación general como al infiltrar adipocitos en músculos [62].

El cortisol interfiere en varios niveles de acción de la insulina. Además, el cortisol inhibe la secreción de insulina de las células β pancreáticas. Algunos estudios, han indicado que los glucocorticoides pueden aumentar el metabolismo de la glucosa hepática. Este efecto diabetogénico de los glucocorticoides se ha caracterizado bien. En el músculo esquelético, el cortisol inhibe la glucógeno sintasa. Los sujetos con resistencia a la insulina tienen un mayor número de receptores de glucocorticoides en el músculo [62].

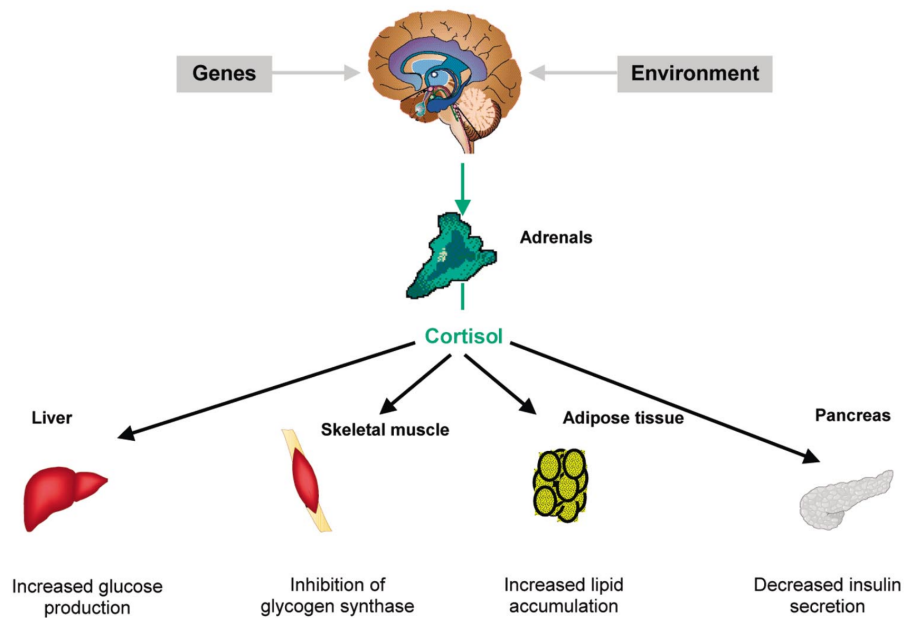


Figura 8. Efecto de la activación sostenida del eje HPA y cortisol en el metabolismo que predisponen a la RI y el desarrollo de T2D [62].

h. Cambios inmunoendocrinos en pacientes con Tuberculosis y Diabetes Mellitus tipo 2.

Como se ha mencionado, la DM T2 y la TB presentan alteraciones endocrinas que se asocian a desordenes inmunoendocrino-metabólicos. Los pacientes que sufren de ambas enfermedades presentan altos niveles de cortisol, estradiol, prolactina y hormona de

crecimiento y una disminución en los niveles de dehidroepiandrosterona (DHEA). A nivel inmunológico los pacientes TB-DMT2 presentan mayor cantidad de IFN γ e IL6 y menor de IL10. Estos datos sugieren que los cambios inmunoendocrinos presentes en pacientes con TB, son exacerbados si se cursa con una enfermedad metabólica adyacente como la DMT2 [57].

ANTECEDENTES

Diabetes Mellitus (DM) es un factor de riesgo para el desarrollo de Tuberculosis pulmonar (TBP), con un incremento en la tasa de susceptibilidad de 3-7 veces en comparación con no diabéticas [63]. La cronicidad y el pobre control glucémico son los factores que más predisponen al desarrollo de TB en pacientes diabéticos [64]. El mecanismo específico por el cual las personas diabéticas son susceptibles a padecer tuberculosis todavía no se ha entendido claramente. Las alteraciones propias de la DM son las que desencadenan la susceptibilidad a padecer TB, por lo que se ha observado que pacientes diabéticos presentan un deterioro inmune que no permite una adecuada respuesta a amenazas por agentes infecciosos; en este sentido las personas con diabetes en su fase crónica tienen una respuesta inmune ineficiente en contra de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) (65, 66). Este es un factor de riesgo importante para el desarrollo no solo de la infección activa, sino de la reactivación de la enfermedad de su fase latente. Además, estudios demuestran que la presencia de DM2 en tuberculosis afecta el tratamiento de ambas por interacción medicamentosa [64].

DM y TB son enfermedades crónicas que coinciden en que en su fase crónica hay un exceso en la producción de glucocorticoides causado por la sobreestimulación de la enzima 11 β -deshidrogenasa de hidroxisteroide tipo 1 (11 β -HSD1), que actúa in vivo como una reductasa dependiente de NADPH para producir cortisol (en humanos) o corticosterona (en roedores) [67]. El Cortisol afecta el curso de ambas enfermedades, en DM esto sucede prioritariamente en la fase crónica de la enfermedad (7-9 años post diagnóstico), donde se ha visto que el incremento notable en los niveles de Cortisol es un agravante al ser el principal glucocorticoide involucrado en el aumento de glucosa en sangre, favoreciendo la gluconeogénesis y la glucogenolisis [68, 69] induciendo un descontrol

glucémico. Por otra parte, el cortisol es un potente inmunosupresor al actuar negativamente sobre el factor de transcripción NF- κ B (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*) el cual está involucrado en la respuesta celular frente a estímulos estresantes, jugando un papel clave en la regulación de la respuesta inmune; ya que induce a la alta la expresión de múltiples citocinas inflamatorias como IL-12, IL-1 β , TNF, INF- γ e IL-2 e induciendo a la baja la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y IL-4, este exceso en los niveles de cortisol en la infección por *M. tb* estimula un cambio del fenotipo de respuesta de tipo Th1 protectora para TB a uno de tipo Th2 inadecuada para controlar la infección [70]. Diversos estudios experimentales han sustentado convincentemente esta relación, por ejemplo los ratones diabéticos infectados con *M. tuberculosis* tienen mayor carga bacilar que los animales control euglicémicos [71], debido a una menor producción de INF- γ e IL-12 [72] con lo cual existe una menor actividad de la inmunidad protectora Th-1 que es esencial para controlar la TB [71]; además los neutrófilos de los diabéticos exhiben menor quimiotaxis y producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno [73].

En el retículo endoplásmico de los adipocitos se expresa la G6PDH para la producción del NADPH necesario para la actividad de 11- β HSD1 [74, 75], por lo que se ha propuesto a la modulación de la G6PDH como una estrategia terapéutica en el síndrome y enfermedades metabólicas para modular el exceso de Cortisol en estos pacientes [76].

Dehidroepiandrosterona (DHEA) es el mayor producto de secreción de la corteza adrenal en el humano y al igual que los estrógenos pueden tener efectos agudos y no genómicos que compensa las acciones vasculares y metabólicas de la insulina. La DHEA es una hormona antagónica de los glucocorticoides, debido a que induce la diferenciación de los linfocitos Th-1 y suprime la activación de las células Th-2 [76]. En un modelo murino se observó que la DHEA o su análogo sintético sin actividad 16BrDHEA tienen una notable actividad terapéutica tanto en la fase temprana

de la infección [77] como en la enfermedad avanzada por lo que la administración de DHEA durante la progresión de la tuberculosis podrá ayudar a reducir el régimen de tratamiento con cuatro antibióticos, lo que genera abandono y en consecuencia emergencia de bacterias drogo-resistentes. En el mismo modelo experimental se demostró que la administración de DHEA sintética causa una reacción sinérgica con los antibióticos, permitiendo acortar el tiempo de tratamiento [77].

En células endoteliales, el tratamiento con DHEA estimula la producción del ON [78, 79], en adipocitos estimula la captación de glucosa [80] y es anti proliferativo en pre-adipocitos [81]. Se mostró que la DHEA reduce el contenido de triglicéridos en plasma de animales con síndrome metabólico [82], y considerando que también aumenta la lipólisis estimulando a la lipasa de triglicéridos (ATGL) y a la sensible a hormonas (HSL) [83] estimulando su liberación en forma de ácidos grasos libres para ser aprovechados por las células. En la TB también las hormonas esteroideas tienen una importante contribución fisiopatológica [84]. Estos resultados concuerdan con estudios clínicos que demostraron que la administración de DHEA reactiva la respuesta inmunológica protectora en pacientes con coinfección TB/HIV [85]. La DHEA tiene la capacidad de corregir diversas alteraciones bioquímicas de la DM2. En este trabajo se estudiará el efecto de la DHEA en el tratamiento de estas dos enfermedades DM2 y TB en un modelo murino (ratones macho de la cepa BALB/c) que combine ambas entidades.

Modelo de Diabetes Mellitus tipo 2 (T2D)

En el presente trabajo se realizó un protocolo para la inducción de T2D en un modelo murino por medio de una dieta hipercalórica y fructosa en el agua de bebida, con el fin de inducir alteraciones metabólicas en los ratones más la administración de una única y baja dosis de Estreptozotocina (STZ), químico que induce toxicidad a las células β -pancreáticas productoras de insulina y de esta

manera generar daño que produzca un déficit en la producción de esta hormona y las alteraciones en los niveles de glucosa plasmática, sin la pérdida de la producción total [87,88].

CAPITULO III

JUSTIFICACIÓN

T2D/TB son enfermedades crónicas de gran importancia en nuestro país y en diversos estudios epidemiológicos se ha observado una importante relación a dichas enfermedades, pues los pacientes con TD2 tienen un riesgo tres veces mayor de sufrir TB que los pacientes no diabéticos, es por lo tanto importante estudiar la relación entre ambas entidades desde el punto de vista inmunoendocrino en modelos experimentales in-vivo, con el objetivo de establecer posibles estrategias terapéuticas que puedan ser útiles para el control de pacientes que sufran ambas enfermedades.

HIPÓTESIS

La administración de BEA durante la infección por TB en presencia T2D revertirá desordenes metabólicos y a su vez estimulará una respuesta inmune efectiva contra *M. tuberculosis*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los glucocorticoides en la relación TD2 y TB además del efecto terapéutico de DHEA como adyuvante en el tratamiento de T2D y TB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Evaluar la evolución de tuberculosis en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 murina.
- 2- Cuantificar las concentraciones de corticosterona en el transcurso de T2D, TB y T2D/TB.
- 3- Determinar la expresión genética, producción proteica y actividad de la enzima *11 β HSD1* en el tejido hepático, muscular, adiposo y pulmonar durante T2D, TB y T2D/TB.
- 4- Determinar efecto DHEA de las alteraciones metabólicas de la T2D, TB y T2D/TB.
- 5- Evaluar el efecto de DHEA en la respuesta inmune de ratones con T2D, TB y T2D/TB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los medios Middlebrook 7H9 y 7H10 y el OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa) se obtuvieron de Beckton-Dickinson (Difco™, USA). El Rneasy® Mini Kit para la extracción de RNA, el Omniscript® Reverse Transcription Kit para la obtención de DNA complementario y el QuantiTect™ SYBR® para RT-PCR se obtuvieron de Qiagen (USA). Los primers de los genes analizados se obtuvieron de Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific (California, USA).

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

Ubicación

La parte experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

Diseño experimental

Con el fin de cumplir los objetivos del presente trabajo se planteó el siguiente esquema metodológico (Figura 12). Como primera etapa del trabajo experimental se realizó el modelo murino de T2D en ratones BALB/c. Posteriormente se realizó el modelo T2D/TB donde se llevaron a cabo los demás experimentos, así como la etapa terapéutica con DHEA.

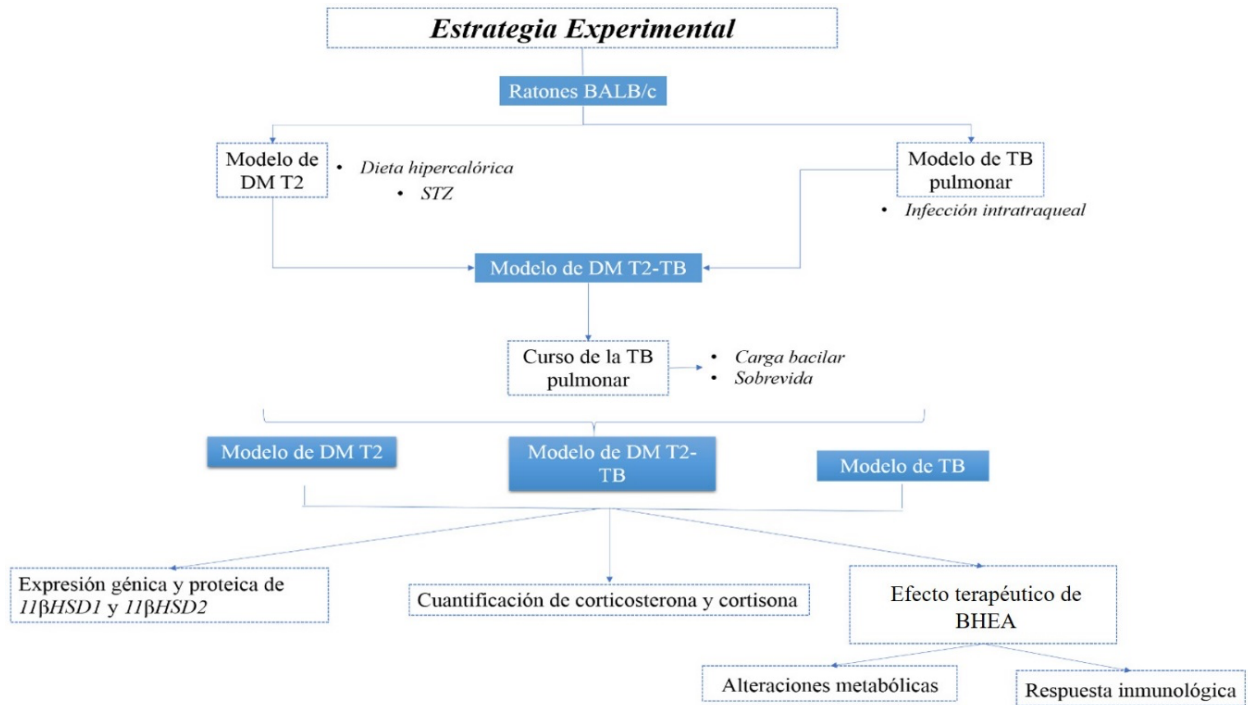


Figura 9. Diagrama del diseño experimental seguido en este trabajo. Los detalles de la metodología se describen en el texto.

MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Dieta hipercalórica

Para establecer el modelo de T2D en ratones BALB/c se utilizaron ratones de 3 semanas de edad a los cuales se les administró una dieta hipercalórica al 45% (Cuadro 3) *ad libitum*. Paralelamente se contó con un grupo control el cual fue alimentado con la dieta comercial Chow (Cuadro 4).

Cuadro 3. Composición de la dieta hipercalórica para inducir T2D en ratones BALB/c.

| Compuesto | Porcentaje | Vol. 1Kg Dieta |
|----------------------------|-------------------|-----------------------|
| Caseína VF | 11% | 115 g |
| Caseína | 11% | 115 g |
| L-cistina clorhidrato | 0.03% | 3 g |
| Minerales | 5% | 50 g |
| Vitaminas AIN-93-XV | 1% | 10 g |
| Colina clorhidrato | 0.017% | 1.7 g |
| Celulosa | 5% | 50 g |
| Almidón de Maíz | 20% | 203.9 g |
| Dextrosa anhidra (Glucosa) | 20% | 207.9 g |
| Aceite de Maíz | 5% | 50 g |
| Manteca | 20% | 200 g |

Cuadro 4. Composición de la dieta control Chow.

| Compuesto | Porcentaje |
|--------------------|-------------------|
| Proteína | 24 % |
| Grasa total | 10.5% |
| Fibra cruda | 5.3 % |
| Almidón | 21.5 % |
| Glucosa | 0.2% |
| Fructosa | 0.2% |
| Sucrosa | 3.4 % |
| Minerales | 6.9% |

Administración de STZ

Después de 2 meses de dieta, se les administró por vía intraperitoneal (i.p.) a una única dosis de Streptozotocina (100 mg/kg), químico que induce toxicidad a las células β -pancreáticas productoras de insulina y de esta manera se generó daño en la producción de esta hormona y las alteraciones en los niveles de glucosa plasmática, sin la pérdida de la producción total. Se cuantificaron los niveles de glucosa en sangre en ratones una semana antes, dos y cuatro semanas después de la administración de STZ. También se midió la concentración de insulina.

Tratamiento con hipoglucemiantes orales

Con el fin de comprobar que el modelo de ratones T2D fuera no dependiente a la insulina se llevo a cabo un experimento con hipoglucemiantes orales. A ratones T2D se les administró Metformina (250 mg/Kg), Glibenclamida (15 mg/Kg) o solución salina. Se medio la glucemia antes de la administración de cada fármaco (pre-dosis) y 27 horas después (Figura 13).

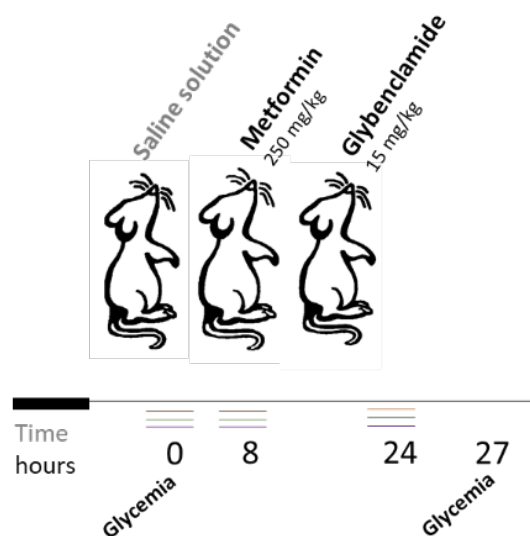


Figura 10. Experimento con hipoglucemiantes orales en ratones Balb/c con T2D.

Caracterización del modelo

Una vez establecido el modelo de T2D se midió el colesterol, triglicéridos e insulina de los animales con T2D. Durante el curso del experimento los animales se pesaron semanalmente. Se realizaron sacrificios los días 3, 7, 28 y se obtuvo el hígado y el páncreas para su estudio histológico.

Modelo murino de TB pulmonar progresiva

El modelo murino de TB pulmonar progresiva ha sido previamente descrito [29]. En este experimento ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane) y se inocularon vía intratraqueal (IT) con 2.5×10^5 UFC de la cepa H37RV en 100 μ L de solución salina. Los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación (presencia de reflejos y contracción muscular); después fueron albergados en grupos de 5 animales en cajas de policarbonato (microaisladores) almacenadas dentro de un sistema de microventilación individual positiva (Allentown). Durante todo el experimento se monitoreó la sobrevida de los animales. Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en una campana de seguridad biológica tipo 3. El uso de animales fue aprobado por el comité de ética del INCMNZS y se desarrolló de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [89].

Preparación de inóculos

Para la infección con *M. tuberculosis*, se utilizó la cepa prototipo H37RV. La cepa se creció en medio 7H9 Middlebrook (Difco) enriquecido con OADC (Becton Dickinson) a 37°C en

agitación constante por aproximadamente 21 días. El crecimiento bacteriano fue monitoreado por densitometría (600 nm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Una vez en esta etapa, las bacterias fueron cosechadas y almacenadas en alícuotas a -70°C. Se prepararon inóculos ajustando a 2.5 X 10⁵ unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 µL de solución salina, los cuales fueron ocupados inmediatamente para la infección.

Modelo murino de T2D/TB

Para establecer el modelo murino de T2D/TB ratones de 3 semanas de edad fueron alimentados con la dieta alta en grasa. A los 90 días iniciado el experimento se les administró una dosis baja de Streptozotocina (100 mg/kg) y 30 días posteriores se infectaron de forma intratraqueal con Mtb. Se conto con tres grupos controles, un grupo sano el cual se alimentó con la dieta Chow, un grupo con solo el modelo de T2D y un grupo de TB (Figura 14). Se realizaron sacrificios los días 14, 21, 28 y 120 post infección para cuantificar la carga bacteriana en los pulmones. Se siguió la sobrevivencia de los animales en todo el experimento. Se cuantificó por inmunohistoquímica en pulmón cortisona y corticosterona.

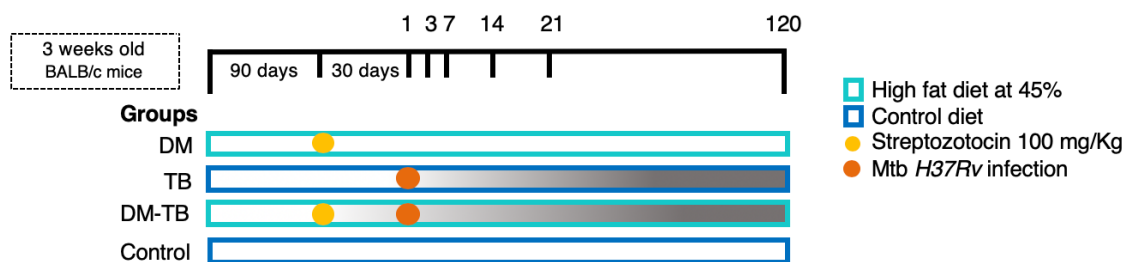


Figura 11. Esquema metodológico de los modelos experimentales empleados. Se muestra una línea del tiempo que parte desde 3 semanas de edad de los animales al inicio del experimento.

Se muestra en los recuadros las dietas empleadas, en azul se representa los grupos alimentados con la dieta de sostén o chow y en verde se muestra los grupos a los que se les administro una dieta hipercalórica para inductor alteración metabólica.

Tratamiento con BEA

Al día 60 post infección se inició el tratamiento a los grupos correspondientes, con un análogo sintético de la BHEA diluida en Aceite de oliva (SIGMA) y a una dosis de 30mg/Kg cada tercer día y se administró por vía subcutánea. Se realizaron sacrificios al día 90 (1 mes de tratamiento) y al día 120 (2 meses de tratamiento) (Figura 15). En cada tiempo de sacrificio se obtuvieron muestras para evaluar la carga bacteriana pulmonar, histología hepática y pulmonar, determinación de citocinas, 11- β HSD1 y 11- β HSD2 por RT-PCR y cuantificación de corticosterona y cortisona en el pulmón por inmunohistoquímica. En el suelo se determinaron los niveles de triglicéridos, colesterol e insulina.

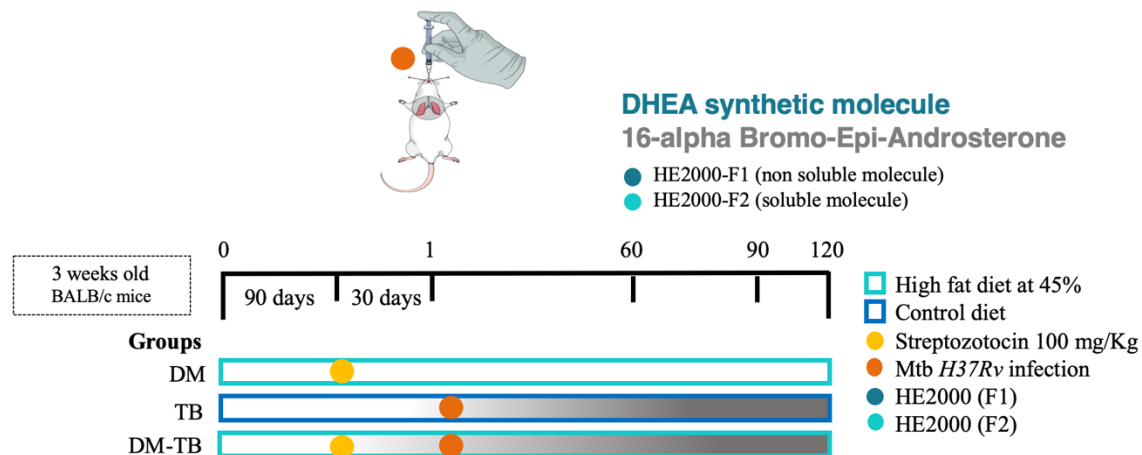


Figura 12. Esquema metodológico del tratamiento con DHEA en el modelo T2D/TB.

Determinación de la carga bacilar en pulmón por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Tres pulmones (lóbulo derecho) por tiempo de sacrificio se homogenizaron de forma mecánica con perlas de sílice y zirconia en un equipo MP fast prep24 en tubos estériles con 1 mL de solución

PBS-tween 0.05%. Cuatro diluciones (Cuadro 5) y el concentrado de cada homogenizado se sembraron por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco) enriquecido con OADC (Becton Dickinson), las cuales se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. El conteo de colonias se realizó a los 14 y 21 días después de la siembra. El número total de bacterias en cada órgano se obtuvo del producto entre el número total de colonias contadas en cada dilución por su respectivo factor de dilución.

Cuadro 5. Factores de dilución utilizados para cuantificar UFC.

| Dilución | Factor de dilución |
|-------------|--------------------|
| Concentrado | 100 |
| -1 | 1000 |
| -2 | 1*10 ⁴ |
| -3 | 1*10 ⁵ |
| -4 | 1*10 ⁶ |

Análisis de citocinas y enzimas por qRT- PCR

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

El ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (A 260/280) por Nanodrop (Thermo Scientific) y mediante un gel de agarosa se verificó su integridad. Se ocuparon 100 ng de

ARN para la producción de cDNA mediante una reacción de retro-transcripción (RT) siguiendo las indicaciones del kit Omniscript (Qiagen). Con el producto se realizó una PCR de punto final para amplificar el gen constitutivo de la deshidrogenasa gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 60s y extensión final a 72°C por 10 min.

Para la PCR en Tiempo Real (PCR-TR) se utilizó el sistema PCR-TR 7500 (Applied Biosystems), y el kit Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen), incluyendo en cada corrida las curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas de productos de PCR cuantificados de cada uno de los genes, así como un control negativo. Primers específicos (Invitrogen) se diseñaron con el programa BLAST (Pubmed) para TNF α , IFN γ , 11 β -HSD1, 11 β -HSD2 y el gen constitutivo GAPDH (Cuadro 3). El número de copias de cada citocina fue normalizado con un millón de copias de ARNm que codifica para el gen GADPH. La reacción se efectuó con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 s, 60°C por 20 s y 72°C por 35 s.

Cuadro 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real.

| Gene | Iniciador sentido | Iniciador antisentido |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| GAPDH | CATTGTGGAAGGGCTCATGA | GGAAGGCCATGCCAGTGAGC |
| TNFα | TGTGGCTTCGACCTCTACCTC | GCCGAGAAAGGCTGCTTG |
| IFNγ | GGTGACATGAAAATCCTGCAG | CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA |
| 11β-HSD1 | CGTCCTCACAGCAACGGAGA | CAGCTTATCGATGAATCCAGG |
| 11β-HSD2 | CGAACTCGGGGCAACGGCTA | GCGCTTATTAATGAATCCGGG |

Preparación de tejido pulmonar para estudio morfométrico e inmunohistoquímica

Para el estudio histológico, tres pulmones izquierdos fueron previamente perfundidos vía IT con etanol absoluto y almacenados por 24 horas. Se realizaron cortes parasagitales a nivel del hilio pulmonar y los tejidos fueron colocados en cassettes de plástico en un procesador de tejidos Spin Tissue Processor Microm STP 120 (ThermoFisher Scientific). Los cassettes son embebidos en parafina en la estación de inclusión HistoStar Embedding Workstation (ThermoFisher Scientific) y los bloques son cortados en micrótopo (Leica RM2135) en secciones de 4µm y colocados en portaobjetos. Los tejidos son desparafinados y teñidos en un tren de hematoxilina-eosina. El proceso se concluye colocando una gota de resina y un cubreobjetos en el tejido.

El área de neumonía y granulomas fue determinada en micras cuadradas mediante un analizador de imágenes (Q Win Leica, Milton Keynes). Las mediciones fueron tomadas a ciego y los datos fueron reportados como la media y la desviación estándar de 3 ratones diferentes de cada tiempo en 2 experimentos diferentes.

Inmunohistoquímica y cuantificación de células positivas para corticosterona y cortisona

Se obtuvieron cortes de pulmones en laminillas silanizadas (silano al 2% en acetona) con la metodología antes mencionada. Una vez desparafinadas, las laminillas fueron incubadas por 5 minutos en vasos coplin de vidrio con xileno, siguiendo 5 baños en xileno-alcohol (1:1), 5 baños en alcohol absoluto, 5 baños en alcohol al 96% y 5 baños en agua. Para bloquear la peroxidasa

endógena, los tejidos fueron incubados en solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol por 10 minutos.

Las laminillas fueron incubadas 30 minutos en cámara húmeda, y lavadas 5 veces con buffer de lavado (PBS Tween 0.05%). Los tejidos fueron incubados con 100µl de los anticuerpos primarios anticorticosterona y anti-cortisona toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron 5 veces con buffer de lavado. Posteriormente se agregaron 100µl por tejido del complejo AB/HRP (Vectasin) y reveladas con 100µl por tejido de diaminobencidina (DAB)/peróxido de hidrógeno y contrateñidas con hematoxilina.

Análisis estadístico

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

CAPITULO IV

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DEL MODELO MURINO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Para evaluar el establecimiento del modelo murino de T2D en ratones BALB/c se monitoreo el peso de los animales alimentados con la dieta hipercalórico y con la dieta chow, los niveles séricos de triglicéridos y colesterol como característica de dislipidemia, los niveles de glicemia en sangre antes y después de la administración de STZ y finalmente, la no dependencia a la insulina con Metformina y Glybenclamida, para probar que el modelo presente una relativa deficiencia de insulina, con daño moderado en las células β pancreáticas.

I. Peso corporal

Los animales del grupo de dieta hipercalórica mostraron un aumento del 12% en su peso comparado con el grupo control (dieta Chow). El incremento en el peso fue más evidente a partir de la semana 3 de dieta, y este se mantuvo constante hasta en final del experimento (Figura 16A).

II. Niveles séricos de triglicéridos y colesterol

A los tres meses de alimentar a los animales experimentales con la dieta hipercalórica se midió la dislipidemia sérica (aumento de ácidos grasos y colesterol) en los animales. Nuestros resultados mostraron que el grupo experimental presentó un aumento significativo en los niveles de triglicéridos y colesterol en comparación de los animales alimentados con la dieta Chow (Figura 16C-D).

III. Hiperglicemia e hiperinsulinemia

Al evaluar los niveles de glicemia antes de la administración de la STZ se observó que los animales alimentados con la dieta grasa presentaron un pequeño aumento en los niveles de glicemia en comparación con el grupo control alimentado con la dieta Chow. Después de la administración de STZ se observó que los animales que fueron alimentados con la dieta hipercalórica y se les administró la dosis baja de STZ presentaron mayor glicemia en sangre en comparación con los animales que no recibieron STZ y los que fueron alimentados con dieta Chow (Figura 16B).

En la T2D existe hiperinsulinemia, en nuestro modelo murino de T2D observamos un aumento importante la concentración de insulina en comparación del grupo control (Figura 16E).

IV. Esteatosis hepática y resistencia a la Insulina

La resistencia a la insulina produce el aumento de la lipólisis del tejido adiposo, lo cual libera una gran cantidad de ácidos grasos libres (AGL) que se acumulan en el hígado y generan la esteatosis hepática. Debido a esto, con el fin de evaluar la resistencia a la insulina, característica principal de la T2D, analizamos la esteatosis hepática presente en los animales con T2D. Observamos una notable presencia de vacuolas características de la esteatosis hepática que se generan por la acumulación en exceso de triglicéridos en el órgano (Figura 16)

V. Tratamiento con hipoglucemiantes orales

La T2D es un desorden metabólico no insulino dependiente. Para probar que el modelo de Diabetes establecido no dependiera a la insulina se administró Metformina y Glybenclamida en los animales diabéticos y 27 horas después se midió los niveles de glicemia. Los resultados mostraron que los animales tratados con los hipoglucemiantes orales disminuyeron de manera significativa los niveles de glucosa en sangre, en comparación con el grupo que solo recibió solución salina (Figura 16 F).

La T2D se caracteriza principalmente por dislipidemia, obesidad, resistencia a la insulina y producción elevada de glucosa endógena por el hígado con bajo o escaso daño en las células β pancreáticas. Nuestros resultados demuestran que el modelo murino de T2D en ratones BALB/c es eficiente para el estudio de esta enfermedad, ya que desarrolla las características patológicas de este padecimiento y, además, es sensible a hipoglucemiantes orales, es decir no es dependiente de insulina.

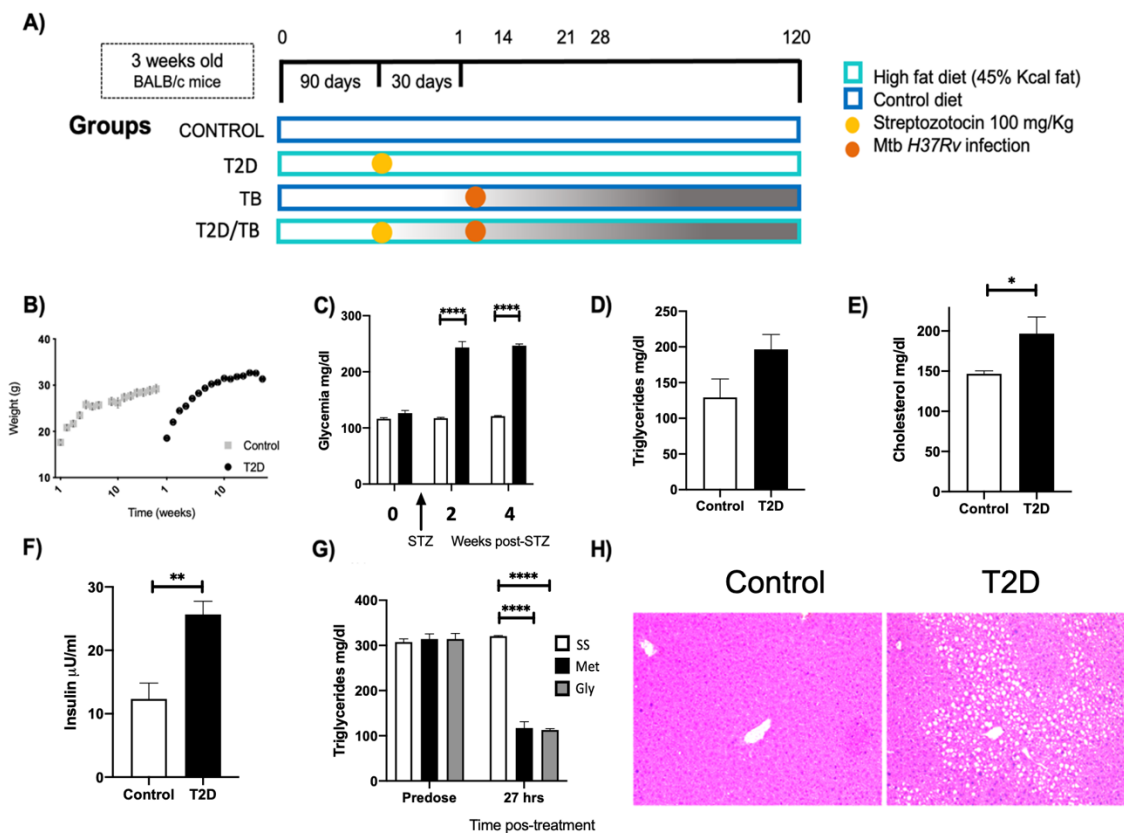


Figura 13. Patología metabólica y hepática de ratones diabetes mellitus tipo 2. B) Peso comparativo entre ratones control y diabetes tipo 2 (T2D). C) Nivel de glucosa en sangre en ratones una semana antes y dos y cuatro semanas después de la administración de STZ por vía intraperitoneal en animales alimentados con alto contenido de grasa tratados con STZ (HFD-STZ) y animales de control de la dieta no tratados. Concentraciones en suero de D) triglicéridos, E) colesterol y F) insulina en grupos control y T2D, después de cuatro meses de alimentación con dieta hipercalórica y un mes de tratamiento con STZ. G) Efecto sobre la glucemia, antes y después de 8 y 24 h. de la

administración oral de metformina (Met) o glibenclamida (Gly). H) Micrografía representativa de la histología hepática normal de un ratón control (panel izquierdo) y una extensa vacuolización citoplasmática de hepatocitos que corresponde a la esteatosis en ratón T2D (panel derecho). Los asteriscos representan significancia estadística (ANOVA de dos vías, $P < 0.05$).

EVOLUCIÓN DE LA TB PULMONAR EN EL MODELO DE T2D

I. Carga bacteriana

Una vez que se estableció el modelo de T2D se evaluó la progresión de TB. Para esto se analizó la carga bacteriana pulmonar de animales T2D/TB en comparación con animales solo TB. Nuestros resultados mostraron que los animales T2D/TB fueron más susceptibles a la infección con Mtb, ya que en los días 14, 21 y 28 post infección se observó un aumento significativo en la carga bacteriana en pulmones de ratones T2D/TB en comparación con ratones TB, con un efecto más marcado al día 120 de infección (Figura 17C)

II. Sobrevida

Por otro lado, se monitoreó la sobrevida de los animales con T2D/TB y los TB durante todo el experimento. Los ratones T2D/TB presentaron una menor sobrevida que los animales TB (Figura 17B), lo cual coincide con la alta carga bacilar en el pulmón de estos animales.

Como hemos mencionado, las alteraciones metabólicas causadas por la T2D aumentan la susceptibilidad a la infección con Mtb, en el presente trabajo observamos que los animales T2D/TB presentaron un agravamiento en la infección reflejado en la carga bacteriana pulmonar y en la sobrevida de los animales.

III. Expresión de TNF- α

Se evaluó la expresión génica de TNF- α como un marcador predictivo de la respuesta inmune protectora. En animales con T2D/TB se observó una expresión significativamente menor de TNF α ,

citocina crucial para el control de la TB, después de 120 días de infección en comparación con el grupo TB (Figura 17D).

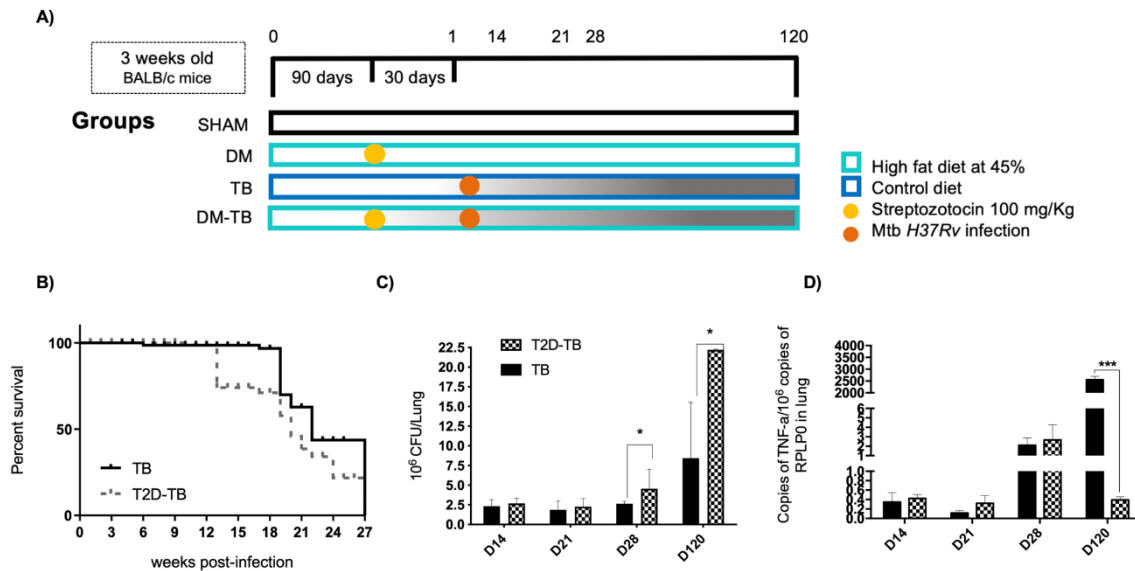


Figura 14. Curso de tuberculosis pulmonar en ratones diabéticos (T2D/TB) y no diabéticos (TB). A) Descripción general de los grupos experimentales. B) Sobrevida de los ratones con TB diabéticos (T2D/TB) y no diabéticos. C) Carga bacilar pulmonar, se sacrificaron cinco ratones por grupo en los puntos de tiempo indicados y se usaron los pulmones derechos para determinar las cargas bacterianas contando unidades formadoras de colonias (UFC). Se observó un aumento significativo de UFC en el grupo T2D / TB después de uno y cuatro meses de infección. D) Expresión de TNF α determinada por RT-PCR en los pulmones de los grupos T2D / TB y TB; se observa una expresión significativamente menor después de 120 días de infección en el primer grupo. El asterisco representa significancia estadística $p < 0.05$.

Cuantificación de corticosterona y cortisona en animales T2D, TB y T2D/TB

I. Corticosterona

En el presente trabajo evaluamos la producción pulmonar de corticosterona por inmunohistoquímica. Nuestros resultados mostraron que los grupos TB y T2D/TB mostraron marca para corticosterona en macrófagos en el epitelio y parénquima pulmonar en la etapa crónica de la

infección con Mtb en comparación con los grupos no infectados (Control o Sham y T2D). Los animales T2D/TB presentaron alta positividad para esta hormona (Figura 18A).

II. Cortisona

Los grupos Control, T2D y TB mostraron marca para cortisona en el parénquima pulmonar y en el epitelio bronquial, mientras que el grupo T2D/TB no mostro marca para cortisona ni en epitelio bronquial, ni en parénquima pulmonar (Figura 18C).

III. Expresión génica y proteica de 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en el tejido pulmonar durante T2D, TB y T2D/TB.

Al analizar la expresión génica de 11- β HSD1 y 11- β HSD2 observamos que en el caso de la enzima tipo 1, esta aumentó significativamente en los grupos TB y T2D/TB en comparación con el grupo SHAM (Figura 18B). Esto coincide con la conversión corticosterona en el pulmón. La 11- β HSD2, contrariamente, disminuye en el grupo T2D/TB, al igual que la expresión proteica de la cortisona en el pulmón (Figura 18D).

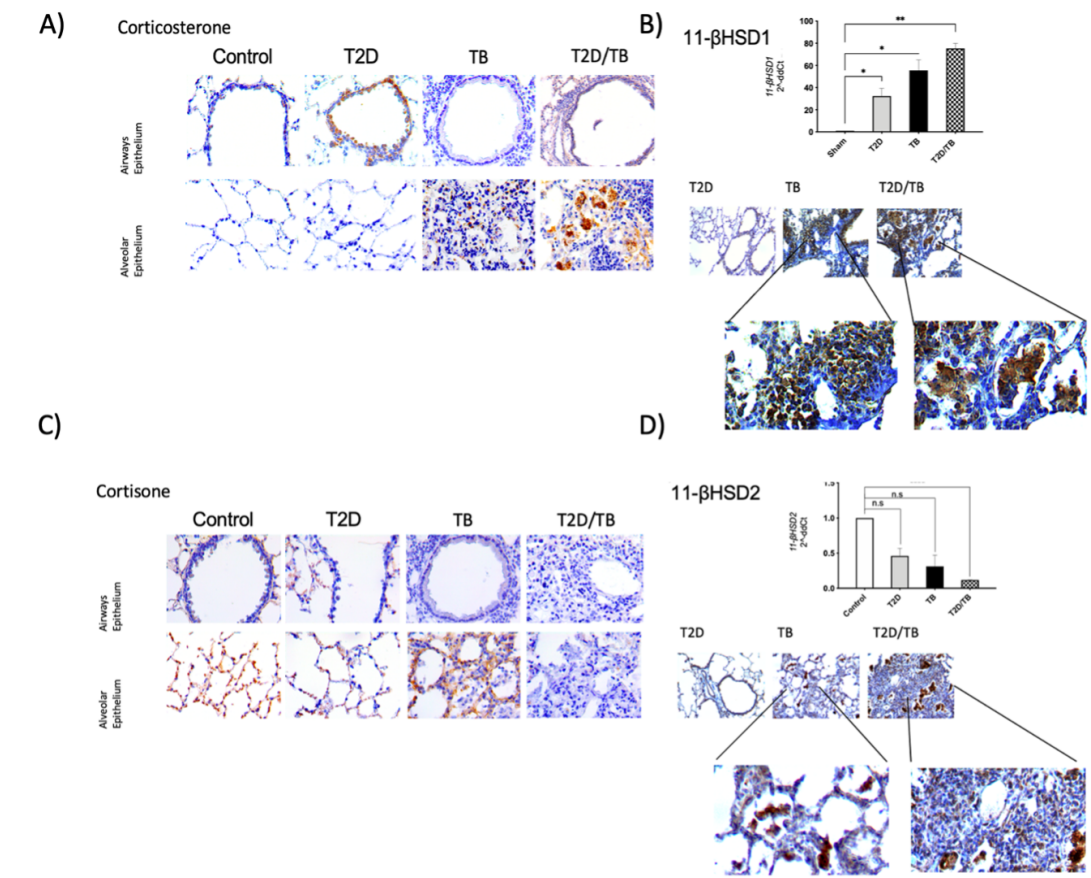


Figura 15. Expresión génica y fuentes celulares de glucocorticoides GC y sus enzimas convertidoras en TB activa tardía. A) Detección de corticosterona por inmunohistoquímica en el epitelio de las vías respiratorias y el epitelio alveolar de los pulmones. Las células epiteliales bronquiales muestran una ligera positividad en el ratón control, mientras que en el ratón T2D numerosas células bronquiales presentan intensa inmunoreactividad. El epitelio bronquial es negativo en TB y T2D/TB; mientras que en las áreas neumónicas numerosos macrófagos muestran una intensa positividad. B) Expresión génica de 11-βHSD1 determinada por RT-PCR en los diferentes grupos experimentales (panel izquierdo), y detección de inmunohistoquímica representativa en ratones T2D, TB y T2D/TB (panel derecho), macrófagos espumosos al vacío en las áreas neumónicas. muestran fuerte inmunotinción de 11-βHSD1. C) Micrografías representativas de detección de cortisona por inmunohistoquímica en células epiteliales bronquiales y alvéolos. El epitelio alveolar muestra inmunotinción positiva en el ratón control, mientras que las células bronquiales son negativas en todas las condiciones experimentales. Los ratones con TB muestran una fuerte inmunotinción en el epitelio alveolar y en células inflamatorias ocasionales, mientras que T2D, TB y T2D/TB son negativos. D) Expresión génica comparativa de 11-βHSD2 y su detección inmunohistoquímica representativa. Los asteriscos representan significancia estadística (**** $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías, y n.s. sin significancia).

EFFECTO TERAPÉUTICO DE BEA EN EL MODELO DE T2D/TB T2

I. Efecto de la BEA en la carga bacilar de pulmón y bazo, expresión de citocinas pulmonares y daño tisular en ratones con TB y T2D/TB

En la parte terapéutica del presente trabajo, se evaluó el efecto de la administración de BEA sobre los grupos de TB y T2D/TB. De cada uno de los grupos experimentales se contó con un grupo control que recibió solo el vehículo. Después del tratamiento se evaluó la carga bacteriana en el pulmón y el bazo (UFC), daño tisular (porcentaje de la superficie pulmonar afectada por neumonía) y la expresión génica de las citocinas TNF- α e IFN- γ (RT-PCR) a un mes y dos meses de tratamiento.

Nuestros resultados mostraron que tanto los grupos T2D/TB como TB, después de uno y dos meses de tratamiento con BEA, presentaron una reducción significativa de las cargas bacilares pulmonares en comparación con sus respectivos controles, ratones no tratados, (Figura 19A).

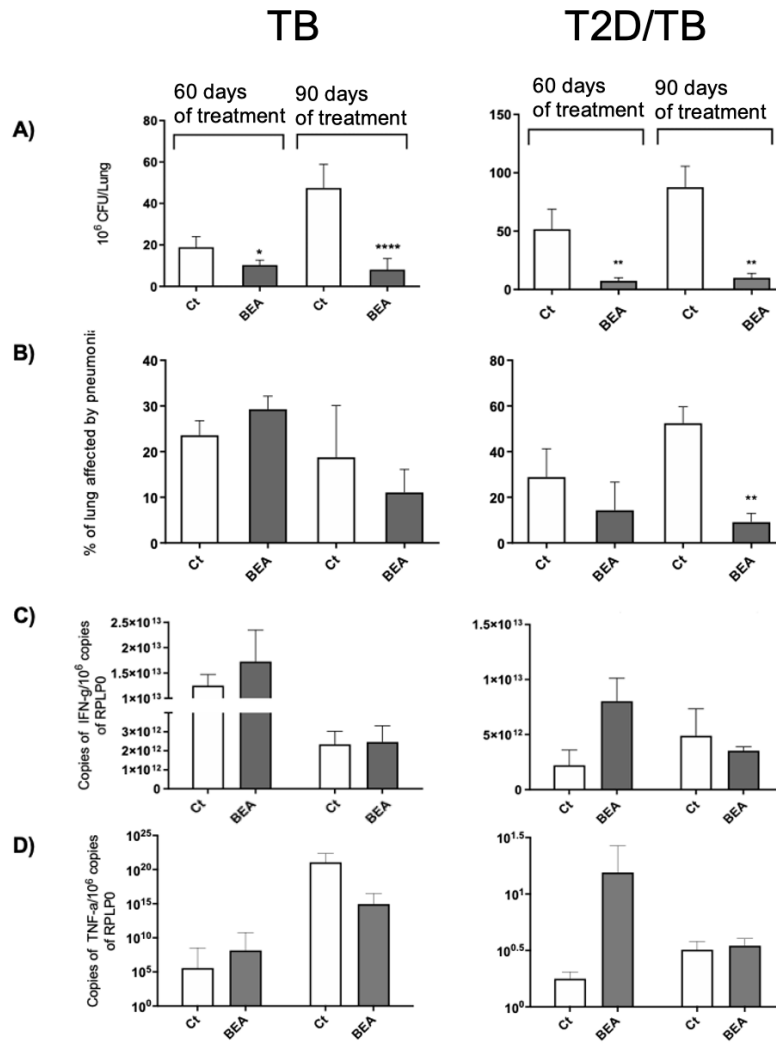
BEA indujo un aumento en la expresión génica de IFN γ y TNF α después de un mes de tratamiento en el grupo T2D/TB, y en ambos grupos después de dos meses de tratamiento (Figura 19 C-D); así como reducción del porcentaje de neumonía (Figura 19B). Curiosamente, el tratamiento con BEA indujo en el bazo una reducción significativa de la carga bacilar y un aumento de peso solo en el grupo T2D/TB después de dos meses de tratamiento (Figura 19F), lo que sugiere hiperplasia del bazo con un mejor control de la diseminación bacilar en este grupo experimental.

II. Efecto de BEA sobre la expresión de 11- β HSD1 y 11- β HSD2, corticosterona y cortisona en pulmón e hígado.

El tratamiento con BEA en los grupos de TB y T2D/TB indujo en el pulmón una expresión significativamente menor de 11- β HSD1 después de uno y dos meses de tratamiento, en comparación con el grupo de control (Figura 20 C). Este efecto fue aún más evidente en el hígado del grupo T2D/TB, que también mostró una disminución importante de la esteatosis y la hiperglucemia (Figura 21C-D).

La expresión génica de 11- β HSD1 (Figura 20C) en el pulmón de los ratones infectados inducida por BEA se relacionó con una disminución significativa de la corticosterona en ratones tratados con BEA en ambos grupos, siendo más significativa en el grupo de TB (Figura 20B). Por el contrario, la expresión de 11- β HSD2 (Figura 20F) después de uno y dos meses de tratamiento con BEA mostró un aumento significativo en el grupo de TB, y la cortisona disminuyó en ambos grupos (Figura 20E). Por lo tanto, BEA es un regulador de la expresión genética de estas enzimas en el pulmón y el hígado, BEA induce a la baja la expresión genética de 11- β HSD1 y ejerce el efecto opuesto sobre 11- β HSD2. En consecuencia, BEA indujo una menor producción de corticosterona y una mayor producción de cortisona inactiva, lo que podría contribuir al control de las cargas bacilares pulmonares y la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ . En el hígado, BEA eliminó esteatosis (Figura 21D), lo que mejora el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Figura 21C) y normaliza la histología hepática y las concentraciones sanguíneas de glucosa. Por lo tanto, BEA mejoró la respuesta inmune y el metabolismo de la comorbilidad T2D/TB, siendo un posible nuevo agente inmunoterapéutico con actividades beneficiosas endocrinas y metabólicas.

Lung



Spleen

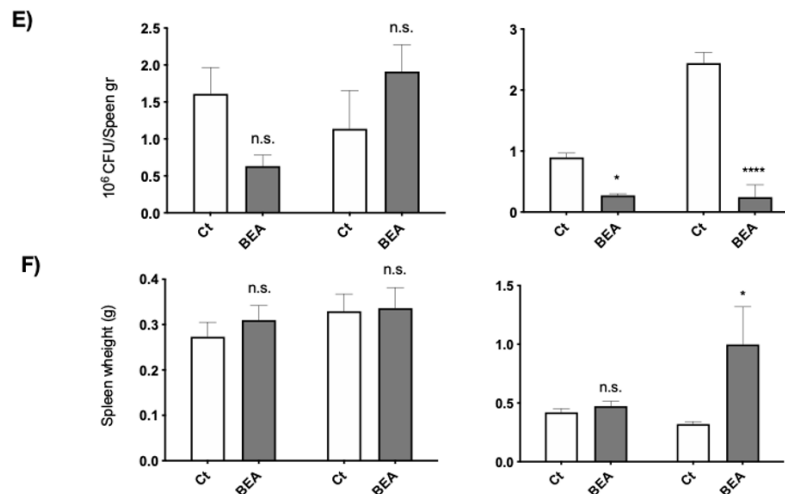


Figura 16. Efecto terapéutico de BEA en ratones TB y T2D / TB. Los grupos de ratones TB y T2D / TB después de 30 y 60 días de infección intratraqueal con Mtb H37Rv fueron tratados durante uno o dos meses con BEA, mientras que el grupo control recibió solo el vehículo. En comparación con los ratones de control, tanto en los grupos de TB como de TB-T2D y particularmente después de 60 días de tratamiento, BEA indujo una disminución significativa de las cargas bacilares pulmonares (A) y daño tisular (neumonía) (B), mientras que el tratamiento BEA indujo una mayor expresión de las citocinas protectoras IFN (C) y TNF (D) después de un mes de tratamiento. En el bazo, el tratamiento con BEA no produjo cambios significativos en el peso y las UFC en los ratones con TB, mientras que en los ratones T2D / TB inducidos después de dos meses de tratamiento, una disminución significativa de las cargas bacilares y un mayor peso (E y F). Los asteriscos representan significación estadística (**** $p < 0,0001$, ANOVA de dos vías y n. ° sin significación).

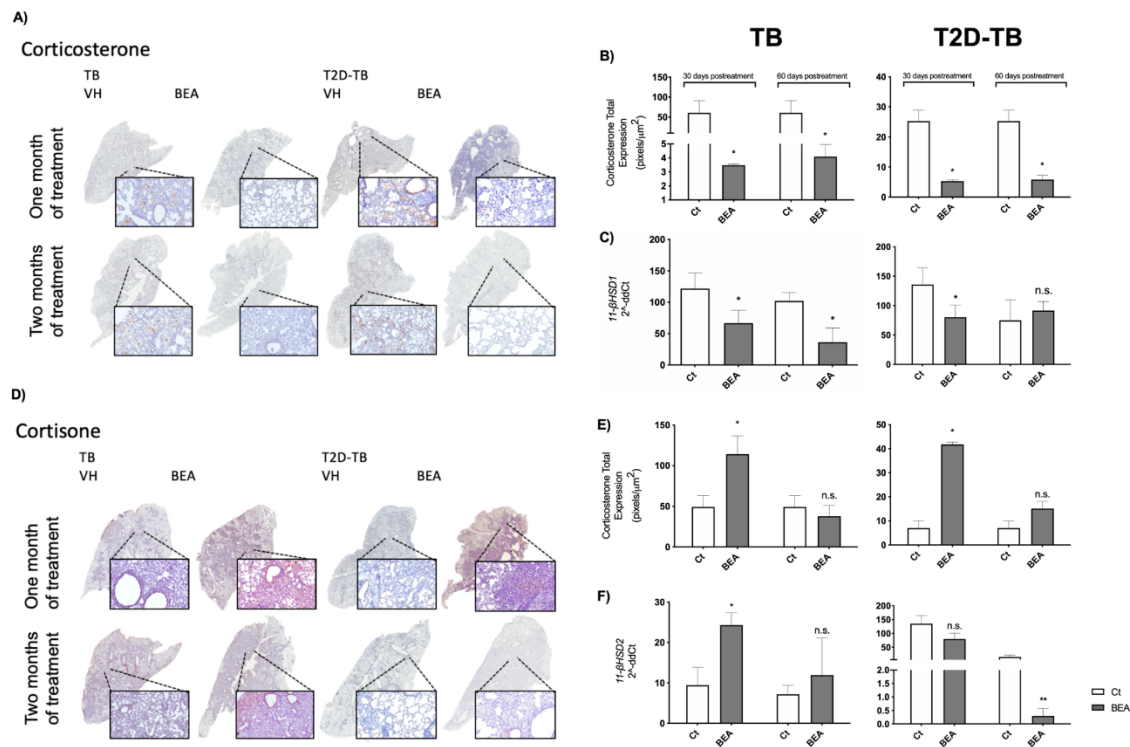


Figura 17. Efecto de BEA sobre la producción de GC de pulmón y la expresión génica de sus enzimas convertidoras en ratones TB y T2D/TB. A) Micrografías representativas de baja potencia y potencia leve de detección de inmunohistoquímica de corticosterona, en ambos grupos después de uno y dos meses de tratamiento con BEA. B) En comparación con el grupo de control, el análisis de patología digital mostró una inmunotinción significativamente menor de corticosterona inducida por el tratamiento con BEA después de un mes y dos meses en ratones con tuberculosis y ratones con tuberculosis T2D. C) Expresión génica de la enzima convertidora de corticosterona 11β-HSD1 después de la baja expresión inducida por el

tratamiento de BEA de estas moléculas en TB y T2D/TB en comparación con animales tratados con vehículo. D) Micrografías representativas de la detección de cortisona por inmunohistoquímica en los pulmones de ratones con TB y T2D tratados con BEA a los uno y dos meses de infección. E) El estudio de patología digital muestra una mayor expresión de cortisona después de un mes de tratamiento en los grupos de TB y T2D / TB. F) C) Expresión génica de la enzima convertidora de corticosterona 11b-HSD2 después del tratamiento con BEA en animales con TB y T2D/TB. Un asterisco representa significancia estadística ($p < 0.05$).

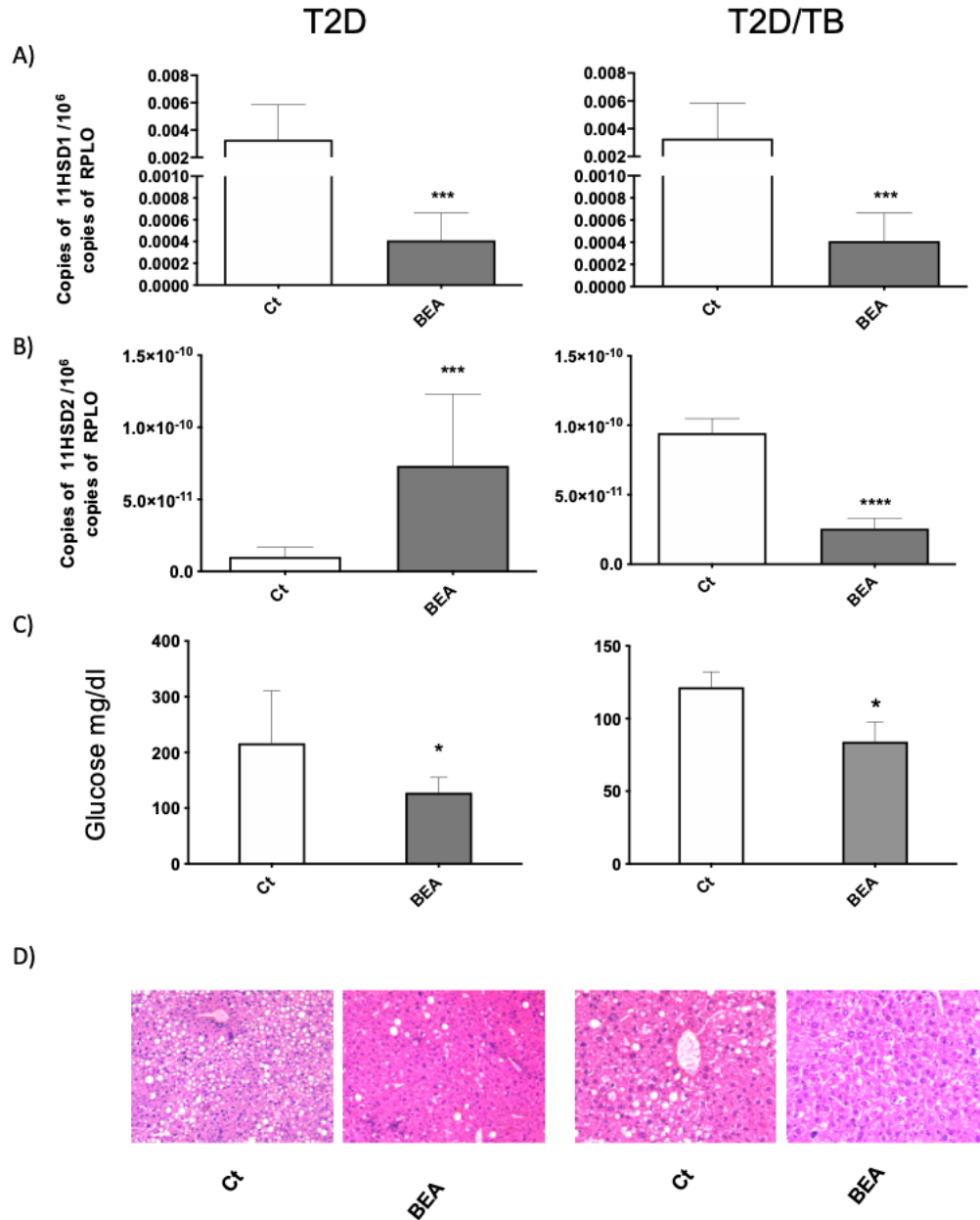


Figura 18. Efecto de BEA en el hígado de ratones T2D / TB. A) Las muestras de hígado de grupos de cinco ratones T2D y T2D/TB tratados con BEA durante un mes y sus respectivos ratones de control que recibieron solo el vehículo se usaron para aislar el ARN total y para determinar la expresión de 11- β HSD1 y 11- β HSD2 por RT-PCR (A y B). D) El tratamiento con BEA también corrigió la hiperglucemia en ratones T2D y T2D/TB. D) El fragmento de tejido hepático de ambos grupos se incluyó en parafina, los tejidos de la sección teñidos con H / E muestran esteatosis en el ratón de control, que se eliminó mediante tratamiento con BEA en ratones T2D y T2D/TB. El asterisco representa significancia estadística (***) $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías, n.s. sin significancia).

DISCUSIÓN

La comorbilidad de TB-T2D ha incrementado de manera importante en los últimos años, por lo que es un área nueva de interés importante. La diabetes tipo 2 es una enfermedad endocrina producida por la secreción anormal y falla en la acción de la insulina, lo que produce hiperglucemia crónica que afecta a múltiples sistemas, incluido el sistema inmune, predisponiendo a infecciones [90, 91]. Se ha observado que T2D genera varias anomalías en mecanismos inmunes necesarios contra Mtb, por lo que empeora el curso de la enfermedad, requiriendo quimioterapia más larga [92, 57]. Nuestros resultados confirman el curso más agresivo de la TB en un modelo experimental de T2D / TB; y por primera vez demostramos que mayor expresión de 11- β HSD1 y la producción de corticosterona durante la enfermedad avanzada tardía en los pulmones y el hígado son un factor patogénico significativo en la TB. El tratamiento con BEA disminuye eficientemente la expresión de 11- β HSD1 y antagoniza la corticosterona produciendo una reducción significativa de las cargas bacilares y la hiperglucemia, lo que sugiere que esta hormona sintética puede contribuir en el tratamiento de esta comorbilidad.

Mtb afecta principalmente a los pulmones y produce inflamación crónica y excesiva, en la cual la inmunidad innata y adaptativa se ve profundamente afectada [93,94]. La infección comienza por la inhalación de gotas de saliva con Mtb que están envueltas por macrófagos alveolares, que son células clave en la eliminación de bacilos y, junto con las células dendríticas, procesan los antígenos Mtb que se presentan a los linfocitos T en los ganglios linfáticos regionales. Los linfocitos migran al pulmón y con los macrófagos y otras células forman estructuras de contención conocidas como granulomas, que son el sello distintivo histopatológico de la tuberculosis [90]. En las primeras etapas de la infección activa, las

respuestas inmunes celulares Th1 son protectoras, ya que $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ y otras citocinas como la IL-12 inducen la activación de los macrófagos, lo que permite el control del crecimiento bacteriano. Sin embargo, durante la enfermedad activa tardía, la inflamación extensa produce un cambio hacia respuestas antiinflamatorias, como el patrón de citocinas Th-2 en el que IL-4, IL-13 y otras citocinas antiinflamatorias como IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) induce un medio inmunosupresor / antiinflamatorio local que resulta en una contención deficiente de la infección y la progresión del daño tisular, conduciendo al huésped a la muerte [95]. Curiosamente, además de esta respuesta inmunológica, hay una respuesta neuroendocrina intensa que crea una red compleja de citocinas, hormonas y neurotransmisores que contribuyen al resultado de la patogénesis de la tuberculosis [57,96,97]. Estas respuestas neuroendocrinas incluyen la producción anormal de varias hormonas, que está mediada en parte por las citocinas liberadas durante la respuesta inmune a Mtb (mediadores proinflamatorios), y también contribuyen a modificar la respuesta del sistema nervioso central (SNC) activando los dos principales sistemas relacionados con estrés, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) [98] y el sistema nervioso simpático (SNS) [92,60].

HPA y GC tienen una contribución importante a la fisiopatología de la TB [99,100]. Se observó en el modelo experimental de TB progresiva en ratones BALB/c, que en el momento de la actividad protectora máxima mediada por la producción de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-1 β y NO (día 21 después de la infección), las citocinas como $TNF-\alpha$ e IL-1 β activan fuertemente el eje HPA, produciendo una alta expresión de CRF en el hipotálamo y la hiperplasia suprarrenal con una alta concentración sérica de corticosterona [101]. Luego, durante la fase crónica o tardía después de 28 días de infección, hay atrofia suprarrenal progresiva y disminución de la corticosterona en el suero en coexistencia con una extensa [101]. Por lo

tanto, parece que hay una alta producción suprarrenal de GC con el objetivo de evitar el daño tisular producido por la inflamación pulmonar excesiva, pero durante la fase tardía de la enfermedad, cuando las glándulas suprarrenales están atróficas, debería haber otra fuente de corticosterona para evitar la inflamación excesiva. Nuestros resultados muestran, por primera vez, que esta fuente extraadrenal de GC son macrófagos, particularmente células espumosas que expresan fuertemente la enzima 11- β HSD tipo 1 y se convierten en una nueva fuente de corticosterona en el pulmón tuberculoso inflamado. Sin embargo, este exceso local de corticosterona también inhibe la actividad de los linfocitos Th1 e induce la diferenciación de los linfocitos Th-2 que favorece la supervivencia bacteriana y la proliferación que causa la muerte de los animales [102]. Por lo tanto, esta actividad antiinflamatoria local mediada por la alta producción de corticosterona durante la TB tardía activa tiene un efecto perjudicial al que pueden oponerse las hormonas antagonistas, como la deshidroepiandrosterona (DHEA). La DHEA es el producto más abundante de la glándula suprarrenal humana después de la pubertad, su producción luego disminuye constantemente con el aumento de la edad. Se ha demostrado que la DHEA tiene propiedades antiglucocorticoides en varios sistemas. Por ejemplo, la DHEA muestra efectos opuestos a los GC en la expresión de enzimas en el hígado [103] sobre la obesidad, y dentro del sistema inmune [14], carga bacilar y disminución del daño tisular al reactivar la respuesta a las citocinas Th-1 [104]. En humanos, un déficit de DHEA en relación con el cortisol puede ser notable en la tuberculosis humana grave [57]. Sin embargo, la DHEA es subóptima para uso humano, en parte porque se metaboliza en esteroides sexuales. 16 α -bromoepiandrosterona (BEA; 16 α -bromo-5 α -androstano-3 β -ol-17-one) es un derivado de esteroides suprarrenales sintéticos que no ingresa a las vías de esteroides sexuales. Nuestros resultados mostraron que cuando los ratones tuberculosos se trataron con BEA a partir del día 60, se produjo una inhibición significativa de la

proliferación bacteriana y una mayor expresión de citocinas protectoras (TNF- α , IFN- γ). Además, cuando se administra como un complemento de la quimioterapia convencional, la BEA mejora la disminución bacteriana [104]. Curiosamente, esta hormona sintética mostró un beneficio terapéutico en pacientes con TB (2), malaria [105] y en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el tratamiento con BEA redujo la incidencia de coinfección de TB en 42.2% y la incidencia acumulada de infecciones oportunistas [106]. En el presente estudio se utilizó una nueva formulación de BEA, una formulación de la misma molécula miscible en agua, su capacidad para disolverse en agua se deriva de un nuevo método de síntesis de la molécula. La miscibilidad del agua evita los problemas asociados con los solventes orgánicos requeridos para administrar la formulación anterior. Los ratones tratados con esta nueva formulación de BEA mostraron resultados similares a los del antiguo análogo sintético, produciendo un aumento significativo de IFN y TNF, en coexistencia con la reducción de las cargas bacilares pulmonares, aumento de la supervivencia [104] y una disminución significativa en la expresión de 11- β HSD1 y corticosterona, mientras que 11- β HSD2 se sobre expresó, así como la corticosterona. Por lo tanto, como se mostró antes de BEA puede inducir la activación directa de células CD1 Th1 y macrófagos por actividad directa, y como se muestra en el presente trabajo mediante la supresión de la producción local de corticosterona en los pulmones.

La obesidad se asocia comúnmente con T2D y otras manifestaciones del síndrome metabólico [103, 93]. El síndrome metabólico está integrado por la obesidad, la hiperlipidemia y la diabetes tipo 2, que está relacionado con la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado [103, 94]. En la obesidad y la diabetes tipo 2, los GC son factores patogénicos importantes porque son antagonistas de la acción de la insulina al afectar la absorción de glucosa, mejorar la lipólisis y la gluconeogénesis hepática

y promover la proteólisis. Además, los GC inhiben directamente la secreción pancreática de insulina, aumentan la secreción de glucosa al inhibir la gluconeogénesis en el hígado y se oponen a otras acciones metabólicas, como la señalización de insulina y la captación de glucosa al inhibir la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática [107]. Nuestros resultados muestran que, en comparación con los animales sanos de control, los ratones con T2D sin infección por Mtb mostraron una mayor expresión de 11- β HSD1 y una fuerte inmunotinción de corticosterona en células epiteliales bronquiales y en hepatocitos. El tratamiento con BEA disminuyó esta expresión de enzima y hormona en pulmón e hígado, corrigiendo la concentración de glucosa en sangre. Por lo tanto, BEA mejoró las anomalías metabólicas significativas, siendo la supresión de la expresión del gen 11- β HSD1 uno de los mecanismos. Estos resultados están de acuerdo con publicaciones anteriores y extienden nueva información, como el aumento de la producción de corticosterona en el epitelio de las vías respiratorias de los individuos con diabetes tipo 2, lo que podría ser un factor para una mayor predisposición a las infecciones respiratorias. Una de estas infecciones es la tuberculosis. Nuestros resultados mostraron en ratones T2D / TB mayores cargas bacilares pulmonares y daño tisular (neumonía), que en ratones TB; así como una menor expresión de IFN y TNF, en coexistencia con una mayor expresión de 11- β HSD1 y una fuerte inmunotinción a corticosterona en el infiltrado intraalveolar inflamatorio pulmonar, particularmente en macrófagos espumosos. Por lo tanto, parece que la mayor producción pulmonar de corticosterona mediada por 11- β HSD1 es un factor que empeora el curso de la tuberculosis en la diabetes tipo 2, y este podría ser un nuevo objetivo terapéutico. En este sentido, nuestros resultados sugieren que BEA puede bloquear 11- β HSD1 en el pulmón y en el hígado, convirtiéndose en un tratamiento eficiente para esta comorbilidad.

Los ensayos para el uso de BEA en el tratamiento de la tuberculosis humana, T2D y la comorbilidad T2D / TB ahora están justificados.

CONCLUSIÓN

El estudio de la comorbilidad T2D/TB desde el punto de vista inmunoendocrino es de suma importancia para comprender los antecedentes de este binomio, así como para proponer mejores estrategias para el control de esta comorbilidad. Los GC activos representan un factor negativo en el desarrollo de ambas entidades, con un efecto negativo sobre el metabolismo de la glucosa y el desarrollo de una respuesta inmune no protectora. El tratamiento con BEA representa una estrategia novedosa como adyuvante en el tratamiento de TB sola y en comorbilidad con T2D. Por estas razones, es de suma importancia continuar con el estudio de la BEA a través de su escalada a estudios clínicos para ser utilizados en pacientes.

LITERATURA CITADA

1. Xarchas, K. C., & Bourandas, J. (2003). Injuries and diseases of the spine in the ancient times. *Spine*, 28(13), 1481–1484. <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000067113.15385.8D>
2. MORSE D. (1961). Prehistoric tuberculosis in America. *The American review of respiratory disease*, 83, 489–504. <https://doi.org/10.1164/arrd.1961.83.4.489>
3. Minnikin, D. E., Lee, O. Y.-C., Pitts, M., Baird, M. S., & Besra, G. S. (2010). Essentials in the use of mycolic acid biomarkers for tuberculosis detection: response to “High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection” by Mark et al., 2010. *Journal of Archaeological Science*, 37(10), 2407–2412. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.05.001>
4. Ferraz, J. C., Melo, F. B., Albuquerque, M. F., Montenegro, S. M., & Abath, F. G. (2006). Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 39(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006001100002>
5. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/global-tuberculosis-report-2019>
6. Kaufmann S. H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nature reviews. Immunology*, 1(1), 20–30. <https://doi.org/10.1038/35095558>
7. Ai, J. W., Ruan, Q. L., Liu, Q. H., & Zhang, W. H. (2016). Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging microbes & infections*, 5(2), e10. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.10>
8. Reyes, A., Sandoval, A., Cubillos-Ruiz, A., Varley, K. E., Hernández-Neuta, I., Samper, S., Martín, C., García, M. J., Ritacco, V., López, L., Robledo, J., Zambrano, M. M., Mitra, R. D., & Del Portillo, P. (2012). IS-seq: a novel high throughput survey

- of in vivo IS6110 transposition in multiple Mycobacterium tuberculosis genomes. *BMC genomics*, 13, 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-249>
9. Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a021113. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>
 10. Jankute, M., Cox, J. A., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual review of microbiology*, 69, 405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
 11. Kaur, D., Guerin, M. E., Skovierová, H., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2009). Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. *Advances in applied microbiology*, 69, 23–78. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69002-X)
 12. Caminero Luna, J. A. (2016). Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Revista Clínica Española*, 216(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.005>
 13. Narasimhan, P., Wood, J., Macintyre, C. R., & Mathai, D. (2013). Risk factors for tuberculosis. *Pulmonary medicine*, 2013, 828939. <https://doi.org/10.1155/2013/828939>
 14. Cooper, A. M., Mayer-Barber, K. D., & Sher, A. (2011). Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal immunology*, 4(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.13>
 15. Dheda, K., Schwander, S. K., Zhu, B., van Zyl-Smit, R. N., & Zhang, Y. (2010). The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 15(3), 433–450. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01739.x>
 16. Russell D. G. (2001). Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(8), 569–577. <https://doi.org/10.1038/35085034>
 17. Nicod L. P. (2007). Immunology of tuberculosis. *Swiss medical weekly*, 137(25-26), 357–362.
 18. Pacheco, A. G., Cardoso, C. C., & Moraes, M. O. (2008). IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis

- susceptibility: a meta-analysis study. *Human genetics*, 123(5), 477–484. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0497-5>
19. Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual review of pathology*, 7, 353–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
20. Birchler, T., Seibl, R., Büchner, K., Loeliger, S., Seger, R., Hossle, J. P., Aguzzi, A., & Lauener, R. P. (2001). Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *European journal of immunology*, 31(11), 3131–3137. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200111\)31:11<3131::aid-immu3131>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200111)31:11<3131::aid-immu3131>3.0.co;2-g)
21. Casanova, J. L., & Abel, L. (2002). Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annual review of immunology*, 20, 581–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851>
22. Flynn, J. A. L. (2006). Lessons from experimental Mycobacterium tuberculosis infections. *Microbes and Infection*, 8(4), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.033>
23. Juffermans, N. P., Florquin, S., Camoglio, L., Verbon, A., Kolk, A. H., Speelman, P., van Deventer, S. J., & van Der Poll, T. (2000). Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 182(3), 902–908. <https://doi.org/10.1086/315771>
24. Ferrero, E., Biswas, P., Vettoretto, K., Ferrarini, M., Uguccioni, M., Piali, L., Leone, B. E., Moser, B., Rugarli, C., & Pardi, R. (2003). Macrophages exposed to Mycobacterium tuberculosis release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology*, 108(3), 365–374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01600.x>
25. De Yang, Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., & Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1069–1074. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1069>

26. Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J., & Hehlhans, T. (2010). Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(12), 6688–6694. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903984>
27. Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., & van der Meer, J. W. M. (2002). Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(2), 294–309. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.294-309.2002>
28. Kaufmann, S. H., Hussey, G., & Lambert, P. H. (2010). New vaccines for tuberculosis. *Lancet (London, England)*, *375*(9731), 2110–2119. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60393-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60393-5)
29. Hernández-Pando, R., Orozcoe, H., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Alcocer, J. M., & 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.
30. Corbatón Anchuelo, A., Cuervo Pinto, R., & Serrano Ríos, M. (2004). Diabetes mellitus. Concepto, clasificación y mecanismos etiopatogénicos. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *9*(16), 963–970. [https://doi.org/10.1016/s0211-3449\(04\)70144-7](https://doi.org/10.1016/s0211-3449(04)70144-7)
31. Gonzalez Sarmiento, E., Hinojosa Mena-Bernal, M. C., & Inglada Galiana, L. (2008). Diabetes mellitus tipo 1 y 2: etiopatogenia, formas de comienzo, manifestaciones clínicas, historia natural. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *10*(17), 1091–1101. [https://doi.org/10.1016/s0211-3449\(08\)73212-0](https://doi.org/10.1016/s0211-3449(08)73212-0)
32. *Diabetes*. (2020, June 8). Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
33. Lillioja, S., Mott, D. M., Howard, B. V., Bennett, P. H., Yki-Järvinen, H., Freymond, D., Nyomba, B. L., Zurlo, F., Swinburn, B., & Bogardus, C. (1988). Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *The New England journal of medicine*, *318*(19), 1217–1225. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805123181901>

34. Orci L. (1985). The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. *Diabetologia*, 28(8), 528–546. <https://doi.org/10.1007/BF00281987>
35. Itoh, N., & Okamoto, H. (1980). Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature*, 283(5742), 100–102. <https://doi.org/10.1038/283100a0>
36. Fernando Carrasco, N., José Eduardo Galgani, F., & Marcela Reyes, J. (2013). Síndrome de resistencia a la insulina. estudio y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(5), 827–837. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70230-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70230-x)
37. Cabezas-Cerrato, J., & Araújo, D. (2003). Resistencia a la acción de la insulina. Evolución histórica del concepto. Técnicas para el estudio in vivo en humanos. *Endocrinología y Nutrición*, 50(10), 396–406. [https://doi.org/10.1016/s1575-0922\(03\)74565-3](https://doi.org/10.1016/s1575-0922(03)74565-3)
38. Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T., Mohanty, P., & Dandona, P. (2004). Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, 110(12), 1564–1571. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142055.53122.FA>
39. Hotamisligil G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
40. Kahn S. E. (2000). The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The American journal of medicine*, 108 Suppl 6a, 2S–8S. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00336-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00336-3)
41. Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., & Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*, 104(6), 787–794. <https://doi.org/10.1172/JCI7231>
42. Machado-Villarroel, L., Montano-Candia, M., & Dimakis-Ramírez, D. A. (2017). Diabetes mellitus y su impacto en la etiopatogenia de la sepsis. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 15(3), 207–215. <https://doi.org/10.35366/74391>
43. Casqueiro, J., Casqueiro, J., & Alves, C. (2012). Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16 Suppl 1(Suppl1), S27–S36. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.94253>

44. Ferlita, S., Yegiazaryan, A., Noori, N., Lal, G., Nguyen, T., To, K., & Venketaraman, V. (2019). Type 2 Diabetes Mellitus and Altered Immune System Leading to Susceptibility to Pathogens, Especially *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical medicine*, 8(12), 2219. <https://doi.org/10.3390/jcm8122219>
45. Lenin, P., Ph D, P. L., Jiménez, M. D. C., & Garcés, M. E. (2020). *Inmunología Molecular, Celular Y Traslacional (Spanish Edition)* (2nd ed.). LWW.
46. Cruz-Topete, D., & Cidlowski, J. A. (2015). One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), 20–32. <https://doi.org/10.1159/000362724>
47. Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, behavior, and immunity*, 21(3), 259–272. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.006>
48. Bhattacharyya, S., Brown, D. E., Brewer, J. A., Vogt, S. K., & Muglia, L. J. (2007). Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood*, 109(10), 4313–4319. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-048215>
49. Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5549), 2166–2170. <https://doi.org/10.1126/science.1066285>
50. Blum, A., & Maser, E. (2003). Enzymology and molecular biology of glucocorticoid metabolism in humans. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 75, 173–216. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(03\)75006-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(03)75006-5)
51. Adcock, I. M., & Mumby, S. (2017). Glucocorticoids. *Handbook of experimental pharmacology*, 237, 171–196. https://doi.org/10.1007/164_2016_98
52. Maser, E., Völker, B., & Friebertshäuser, J. (2002). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry*, 41(7), 2459–2465. <https://doi.org/10.1021/bi015803t>
53. Tomlinson, J. W., Walker, E. A., Bujalska, I. J., Draper, N., Lavery, G. G., Cooper, M. S., Hewison, M., & Stewart, P. M. (2004). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase

- type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine reviews*, 25(5), 831–866. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0031>
54. White, P. C., Mune, T., & Agarwal, A. K. (1997). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine reviews*, 18(1), 135–156. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0288>
55. Hintzpeter, J., Stapelfeld, C., Loerz, C., Martin, H. J., & Maser, E. (2014). Green tea and one of its constituents, Epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *PloS one*, 9(1), e84468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084468>
56. Sun, K., Yang, K., & Challis, J. R. G. (1997). Differential Regulation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and 2 by Nitric Oxide in Cultured Human Placental Trophoblast and Chorionic Cell Preparation*. *Endocrinology*, 138(11), 4912–4920. <https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5544>
57. Fernández, R., Díaz, A., D'Attilio, L., Bongiovanni, B., Santucci, N., Bertola, D., Besedovsky, H., Del Rey, A., Bay, M. L., & Bottasso, O. (2016). An adverse immune-endocrine profile in patients with tuberculosis and type 2 diabetes. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 101, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.09.001>
58. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 71613, 16alpha-Bromoepiandrosterone. Retrieved February 1, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16alpha-Bromoepiandrosterone>.
59. Hernández-Pando, R., Arriaga, A. K., Panduro, C. A., Orozco, E. H., Larriva-Sahd, J., & Madrid-Marina, V. (1998). The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. *Experimental and molecular pathology*, 65(1), 25–36. <https://doi.org/10.1006/exmp.1998.2224>
60. Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Honour, J., Silva, P., Leyva, R., & Rook, G. A. (1995). Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis?. *FEMS immunology and medical microbiology*, 12(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00176.x>
61. Rook, G., Baker, R., Walker, B., Honour, J., Jessop, D., Hernandez-Pando, R., Arriaga, K., Shaw, R., Zumla, A., & Lightman, S. (2000). Local regulation of

- glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 913–922. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05457.x>
62. Rosmond R. (2003). Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes?. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 9(2), RA35–RA39.
63. Jeon, C. Y., & Murray, M. B. (2008). Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS medicine*, 5(7), e152. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050152>
64. Restrepo, B, I & Schlesinger S, L. Impact of diabetes on the natural history of tuberculosis. *Diabetes Research and Clinical Practice* 106 (2014) 191–199.
65. Martinez, N., & Kornfeld, H. (2014). Diabetes and immunity to tuberculosis. *European journal of immunology*, 44(3), 617–626. <https://doi.org/10.1002/eji.201344301>
66. Kumar, N. P., Sridhar, R., Banurekha, V. V., Jawahar, M. S., Nutman, T. B., & Babu, S. (2013). Expansion of pathogen-specific T-helper 1 and T-helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus. *The Journal of infectious diseases*, 208(5), 739–748. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit241>
67. Wang, Y., Nakagawa, Y., Liu, L., Wang, W., Ren, X., Anghel, A., Lutfy, K., Friedman, T. C., & Liu, Y. (2011). Tissue-specific dysregulation of hexose-6-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate transporter production in db/db mice as a model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 54(2), 440–450. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1956-9>
68. Chiodini, I., Adda, G., Scillitani, A., Coletti, F., Morelli, V., Di Lembo, S., Epaminonda, P., Masserini, B., Beck-Peccoz, P., Orsi, E., Ambrosi, B., & Arosio, M. (2007). Cortisol secretion in patients with type 2 diabetes: relationship with chronic complications. *Diabetes care*, 30(1), 83–88. <https://doi.org/10.2337/dc06-1267>
69. Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C., & Holman, R. R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35):

- prospective observational study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7258), 405–412. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.405>
70. Jefferies W. M. (1991). Cortisol and immunity. *Medical hypotheses*, 34(3), 198–208. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(91\)90212-h](https://doi.org/10.1016/0306-9877(91)90212-h)
71. Martens, G. W., Arikian, M. C., Lee, J., Ren, F., Greiner, D., & Kornfeld, H. (2007). Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 37(5), 518–524. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0478OC>
72. Yamashiro, S., Kawakami, K., Uezu, K., Kinjo, T., Miyagi, K., Nakamura, K., & Saito, A. (2005). Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and experimental immunology*, 139(1), 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02677.x>
73. Rayfield, E. J., Ault, M. J., Keusch, G. T., Brothers, M. J., Nechemias, C., & Smith, H. (1982). Infection and diabetes: the case for glucose control. *The American journal of medicine*, 72(3), 439–450. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90511-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90511-3)
74. McCormick, K. L., Wang, X., & Mick, G. J. (2006). Evidence that the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD1) is regulated by pentose pathway flux. Studies in rat adipocytes and microsomes. *The Journal of biological chemistry*, 281(1), 341–347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506026200>
75. Park, J., Choe, S. S., Choi, A. H., Kim, K. H., Yoon, M. J., Suganami, T., Ogawa, Y., & Kim, J. B. (2006). Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes*, 55(11), 2939–2949. <https://doi.org/10.2337/db05-1570>
76. Stevenson, C. R., Forouhi, N. G., Roglic, G., Williams, B. G., Lauer, J. A., Dye, C., & Unwin, N. (2007). Diabetes and tuberculosis: the impact of the diabetes epidemic on tuberculosis incidence. *BMC public health*, 7, 234. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-234>
77. Hernández-Pando, R., Aguilar-Leon, D., Orozco, H., Serrano, A., Ahlem, C., Trauger, R., Schramm, B., Reading, C., Frincke, J., & Rook, G. A. (2005). 16alpha-Bromoepiandrosterone restores T helper cell type 1 activity and accelerates chemotherapy-induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary

- tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 191(2), 299–306. <https://doi.org/10.1086/426453>
78. Rook, G. A., Hernandez-Pando, R., & Lightman, S. L. (1994). Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunology today*, 15(7), 301–303. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90075-2)
79. Liu, D., & Dillon, J. S. (2002). Dehydroepiandrosterone Activates Endothelial Cell Nitric-oxide Synthase by a Specific Plasma Membrane Receptor Coupled to Gαi2,3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21379–21388. <https://doi.org/10.1074/jbc.m200491200>
80. Formoso, G., Chen, H., Kim, J. A., Montagnani, M., Consoli, A., & Quon, M. J. (2006). Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in vascular endothelium. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(5), 1153–1163. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0266>
81. Perrini, S., Natalicchio, A., Laviola, L., Belsanti, G., Montrone, C., Cignarelli, A., Minielli, V., Grano, M., De Pergola, G., Giorgino, R., & Giorgino, F. (2004). Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes*, 53(1), 41–52. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.1.41>
82. Fujioka, K., Kajita, K., Wu, Z., Hanamoto, T., Ikeda, T., Mori, I., Okada, H., Yamauchi, M., Uno, Y., Morita, H., Nagano, I., Takahashi, Y., & Ishizuka, T. (2012). Dehydroepiandrosterone reduces preadipocyte proliferation via androgen receptor. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 302(6), E694–E704. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00112.2011>
83. Peredo, H. A., Mayer, M., Faya, I. R., Puyó, A. M., & Carranza, A. (2008). Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents the prostanoid imbalance in mesenteric bed of fructose-induced hypertensive rats. *European journal of nutrition*, 47(7), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0734-7>

84. Karbowska, J., & Kochan, Z. (2012). Fat-reducing effects of dehydroepiandrosterone involve upregulation of ATGL and HSL expression, and stimulation of lipolysis in adipose tissue. *Steroids*, 77(13), 1359–1365. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.08.002>
85. Marks, P. A., & Banks, J. (1960). INHIBITION OF MAMMALIAN GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE BY STEROIDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(4), 447–452. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.4.447>
86. *IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019*. (n.d.). International Diabetes Federation. <https://www.diabetesatlas.org/en/>
87. Luo, J., Quan, J., Tsai, J., Hobensack, C. K., Sullivan, C., Hector, R., & Reaven, G. M. (1998). Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*, 47(6), 663–668. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(98\)90027-0](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(98)90027-0)
88. de la Garza-Rodea, A. S., Knaän-Shanzer, S., den Hartigh, J. D., Verhaegen, A. P., & van Bekkum, D. W. (2010). Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 49(1), 40–44.
89. *Documentos*. (n.d.). NOM-062-ZOO-1999. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=743>
90. Boillat-Blanco, N., Tumbo, A. N., Perreau, M., Amelio, P., Ramaiya, K. L., Mganga, M., Schindler, C., Gagneux, S., Reither, K., Probst-Hensch, N., Pantaleo, G., Daubenberger, C., & Portevin, D. (2018). Hyperglycaemia is inversely correlated with live *M. bovis* BCG-specific CD4⁺ T cell responses in Tanzanian adults with latent or active tuberculosis. *Immunity, inflammation and disease*, 6(2), 345–353. <https://doi.org/10.1002/iid3.222>
91. Hodgson, K., Morris, J., Bridson, T., Govan, B., Rush, C., & Ketheesan, N. (2015). Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology*, 144(2), 171–185. <https://doi.org/10.1111/imm.12394>

92. Rey, A. D., Mahuad, C. V., Bozza, V. V., Bogue, C., Farroni, M. A., Bay, M. L., Bottasso, O. A., & Besedovsky, H. O. (2007). Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain, behavior, and immunity*, *21*(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.06.005>
93. Ehlers, S., & Schaible, U. E. (2013). The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in immunology*, *3*, 411. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>
94. Meenakshi, P., Ramya, S., Lavanya, J., Vijayalakshmi, V., & Sumanlatha, G. (2016). Effect of IFN- γ , IL-12 and IL-10 cytokine production and mRNA expression in tuberculosis patients with diabetes mellitus and their household contacts. *Cytokine*, *81*, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.009>
95. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, *3*(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
96. Talabér, G., Jondal, M., & Okret, S. (2013). Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology*, *380*(1-2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.007>
97. Hernandez-Pando, R., Orozco, H., & Aguilar, D. (2009). Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *57*(5), 355–367. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0042-9>
98. Hernandez-Pando, R., Orozco, H., & Aguilar, D. (2009). Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *57*(5), 355–367. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0042-9>
99. Barrios-Payán, J., Revuelta, A., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Villanueva, E. B., Gutiérrez, M. E., Pérez-Sánchez, G., Pavón, L., & Hernandez-Pando, R. (2016). The contribution of the sympathetic nervous system to the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *Journal of neuroimmunology*, *298*, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.07.012>
100. Irwin M. R. (2008). Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery. *Brain, behavior, and immunity*, *22*(2), 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.07.013>













101. Bongiovanni, B., Díaz, A., D'Attilio, L., Santucci, N., Dídoli, G., Lioi, S., Nannini, L. J., Gardeñez, W., Bogue, C., Besedovsky, H., del Rey, A., Bottasso, O., & Bay, M. L. (2012). Changes in the immune and endocrine responses of patients with pulmonary tuberculosis undergoing specific treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1262, 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06643.x>
102. Pandolfi, J., Baz, P., Fernández, P., Discianni Lupi, A., Payaslián, F., Billordo, L. A., Fainboim, L., & Arruvito, L. (2013). Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by Dexamethasone. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 149(3), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.09.008>
103. Ayelign, B., Negash, M., Genetu, M., Wondmagegn, T., & Shibabaw, T. (2019). Immunological Impacts of Diabetes on the Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology research*, 2019, 6196532. <https://doi.org/10.1155/2019/6196532>
104. Rook, G. A., & Hernandez-Pando, R. (1997). Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids and antiglycorticoids. *Psychoneuroendocrinology*, 22 Suppl 1, S109–S113. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(97\)00014-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(97)00014-0)
105. Hernandez-Pando, R., De La Luz Streber, M., Orozco, H., Arriaga, K., Pavon, L., Al-Nakhli, S. A., & Rook, G. A. (1998). The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology*, 95(2), 234–241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00601.x>
106. Leenstra, T., ter Kuile, F. O., Kariuki, S. K., Nixon, C. P., Oloo, A. J., Kager, P. A., & Kurtis, J. D. (2003). Dehydroepiandrosterone sulfate levels associated with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya. *The Journal of infectious diseases*, 188(2), 297–304. <https://doi.org/10.1086/376508>
107. Shukla, R., Basu, A. K., Mandal, B., Mukhopadhyay, P., Maity, A., Chakraborty, S., & Devrabhai, P. K. (2019). 11 β Hydroxysteroid dehydrogenase - 1 activity in type 2 diabetes mellitus: a comparative study. *BMC endocrine disorders*, 19(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0344-9>

PARTE 2

PRODUCTOS DE LA TESIS

ARTICULOS ORIGINALES

16 α -Bromoepiandrosterone as a new candidate for experimental diabetes–tuberculosis co-morbidity treatment

Manuel Othoniel López-Torres ¹ | Brenda Marquina-Castillo ¹ | Octavio Ramos-Espinosa ¹ | Dulce Mata-Espinosa ¹ | Jorge A. Barrios-Payan ¹ | Guillermina Baay-Guzman ² | Sara Huerta Yopez ² | Estela Bini ¹ | Ivan Torre-Villalvazo ³ | Nimbe Torres ³ | Armando Tovar ³ | William Chamberlin⁴ | Yu Ge⁴ | Andrea Carranza⁵ | Rogelio Hernández-Pando ¹

¹Experimental Pathology Section, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

²Oncological Diseases Research Unit, Hospital Infantil de Mexico 'Federico Gomez', Mexico City, Mexico

³Physiology of Nutrition Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

⁴Protibea Therapeutics LLC, Naples, Florida, USA

⁵CONICET – Universidad de Buenos Aires, Instituto Alberto C. Taquini de Investigaciones en Medicina Traslacional (IATIMET, Buenos Aires, Argentina)

Correspondence

Rogelio Hernández Pando, Experimental Pathology Section, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.
Email: rogelio.hernandezp@incmnsz.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, CONACyT, Grant/Award Number: 433346 and FC2015-1/115

Summary

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from a single bacterial infectious agent and is one of the most relevant issues of public health. Another pandemic disease is type II diabetes mellitus (T2D) that is estimated to affect half a billion people in the world. T2D is directly associated with obesity and a sedentary lifestyle and is frequently associated with immunosuppression. Immune dysfunction induced by hyperglycemia increases infection frequency and severity. Thus, in developing countries the T2D/TB co-morbidity is frequent and represents one of the most significant challenges for the health-care systems. Several immunoendocrine abnormalities are occurring during the chronic phase of both diseases, such as high extra-adrenal production of active glucocorticoids (GCs) by the activity of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11- β HSD1). 11- β HSD1 catalyzes the conversion of inactive cortisone to active cortisol or corticosterone in lungs and liver, while 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11- β HSD2) has the opposite effect. Active GCs have been related to insulin resistance and suppression of Th1 responses, which are deleterious factors in both T2D and TB. The anabolic adrenal hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) exerts antagonistic effects on GC signaling in immune cells and metabolic tissues; however, its anabolic effects prohibit its use to treat immunoendocrine diseases. 16 α -bromoepiandrosterone (BEA) is a water miscible synthetic sterol related to DHEA that lacks an anabolic effect while amplifying the immune and metabolic properties with important potential therapeutic uses. In this work, we compared the expression of 11- β HSD1 and the therapeutic efficacy of BEA in diabetic mice infected with tuberculosis (TB) (T2D/TB) with respect to non-diabetic TB-infected mice (TB). T2D was induced by feeding mice with a high-fat diet and administering a single low-dose of streptozotocin. After 4 weeks of T2D establishment, mice were infected intratracheally with a high-dose of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Then, mice were treated with BEA three times a week by subcutaneous and intratracheal routes. Infection with TB increased the expression of 11- β HSD1 and corticosterone in the lungs and liver of both T2D/TB and TB mice; however, T2D/TB mice developed a more severe lung disease than TB mice. In comparison with untreated animals, BEA decreased GC and 11- β HSD1 expression while increasing 11- β HSD2 expression. These molecular

ARTICLE OPEN



BCG and BCGΔBCG1419c protect type 2 diabetic mice against tuberculosis via different participation of T and B lymphocytes, dendritic cells and pro-inflammatory cytokines

Cristian Alfredo Segura-Cerda^{1,2,5}, Brenda Marquina-Castillo^{3,5}, Vasti Lozano-Ordaz³, Dulce Mata-Espinoza³, Jorge Alberto Barrios-Payán³, Manuel O. López-Torres³, Michel de Jesús Aceves-Sánchez², Helle Bielefeldt-Ohmann⁴, Rogelio Hernández-Pando³ and Mario Alberto Flores-Valdez^{1,2}✉

Comorbidity between Tuberculosis (TB) and type 2 diabetes (T2D) is one of the greatest contributors to the spread of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in low- and middle-income countries. T2D compromises key steps of immune responses against *M. tuberculosis* and it might affect the protection afforded by vaccine candidates against TB. We compared the protection and immune response afforded by the BCGΔBCG1419c vaccine candidate versus that of wild-type BCG in mice with T2D. Vaccination with both BCGΔBCG1419c, BCG or infection with *M. tuberculosis* reduced weight loss, hyperglycemia, and insulin resistance during T2D progression, suggesting that metabolic changes affecting these parameters were affected by mycobacteria. For control of acute TB, and compared with non-vaccinated controls, BCG showed a dominant T CD4⁺ response whereas BCGΔBCG1419c showed a dominant T CD8⁺/B lymphocyte response. Moreover, BCG maintained an increased response in lung cells via IFN- γ , TNF- α , and IL-4, while BCGΔBCG1419c increased IFN- γ but reduced IL-4 production. As for chronic TB, and compared with non-vaccinated controls, both BCG strains had a predominant presence of T CD4⁺ lymphocytes. In counterpart, BCGΔBCG1419c led to increased presence of dendritic cells and an increased production of IL-1 β . Overall, while BCG effectively reduced pneumonia in acute infection, it failed to reduce it in chronic infection, whereas we hypothesize that increased production of IL-1 β induced by BCGΔBCG1419c contributed to reduced pneumonia and alveolitis in chronic TB. Our results show that BCG and BCGΔBCG1419c protect T2D mice against TB via different participation of T and B lymphocytes, dendritic cells, and pro-inflammatory cytokines.

npj Vaccines (2020)5:21; <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0169-6>

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains as the first cause of death by a single infectious agent worldwide, as in 2018, TB caused 1.6 millions deaths and 10 million new cases¹. Recent meta-analysis reported that T2D patients have a twofold to fivefold higher risk to develop TB compared with patients without T2D^{2,3}. T2D coexist in 16% of the newly diagnosed TB cases, and it is estimated that 4.1% of T2D patients will eventually develop TB⁴. Current T2D prevalence rounds 425 million cases, and may increase to 629 million people in 2045⁵.

T2D generates a series of changes that compromises the host response against *M. tuberculosis*, as recently reviewed by some authors^{6,7}, including altered capacity to present antigens by macrophages⁸, activation of monocytes⁹, and chemoattraction of immune cells to lung during infection¹⁰. Furthermore, T2D favors more severe manifestations of TB as compared with those occurring in patients without T2D¹¹, including extended lung damage especially at chronic stages of the comorbidity^{12,13}. Despite this, the evaluation of new treatments or preventive measures against TB in the context of T2D constitutes a poorly explored area¹⁴, with no report available as of today about the efficacy of protection of any vaccine candidate against TB in the context of T2D.

The BCGΔBCG1419c mutant strain, a BCG Pasteur derivative, has been shown to reduce lung pathology at the chronic stage in two

murine models of TB^{12,15}, and also reduced reactivation after immunosuppression induced by corticosterone administration in a mouse model of latent TB infection (LTBI)¹². Furthermore, BCGΔBCG1419c reduced lung damage at 6 months post reactivation from latent lymphatic TB¹⁶.

We hypothesized that given the capacity of BCGΔBCG1419c to reduce lung pathology in nondiabetic mice, it could be more effective than BCG to afford protection against *M. tuberculosis* in T2D conditions, and evaluated its efficacy at acute (2 months), and chronic (4 months) infection with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice with T2D. We went further on to characterize the contribution of immune cells and key cytokines involved in TB protection and pathology.

RESULTS

Vaccination with BCGΔBCG1419c reduces insulin resistance and body weight loss post infection as compared with BCG in T2D mice

T2D is characterized by the progressive development of insulin resistance and a reduced β -cell function¹⁷. To evaluate whether we established a T2D model in high-fat diet (HFD) plus streptozotocin (STZ)-treated mice (Fig. 1a), we monitored body

¹Doctorado en Farmacología, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, Col. Independencia Oriente, 44340 Guadalajara, Jalisco, Mexico. ²Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México. ³Laboratorio de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez sección 16, Tlalpan, Ciudad de México, México. ⁴School of Chemistry & Molecular Biosciences, University of Queensland St. Lucia Campus, St Lucia, QLD 4072, Australia. ⁵These authors contributed equally: Cristian Alfredo Segura-Cerda, Brenda Marquina-Castillo. ✉email: rhpandopando@hotmail.com; floresv@ciatej.mx



Article

Experimental Pulmonary Tuberculosis in the Absence of Detectable Brain Infection Induces Neuroinflammation and Behavioural Abnormalities in Male BALB/c Mice

Jacqueline V. Lara-Espinosa ¹, Ricardo A. Santana-Martínez ², Perla D. Maldonado ³, Mario Zetter ¹, Enrique Becerril-Villanueva ⁴, Gilberto Pérez-Sánchez ⁴, Lenin Pavón ⁴, Dulce Mata-Espinosa ¹, Jorge Barrios-Payán ¹, Manuel O. López-Torres ¹, Brenda Marquina-Castillo ^{1,*} and Rogelio Hernández-Pando ^{1,*}

¹ Sección de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, CDMX 14080, Mexico; jvle_29031991@comunidad.unam.mx (J.V.L.-E.); zetter.salmon@gmail.com (M.Z.); dulmat@yahoo.com.mx (D.M.-E.); qcjbp77@yahoo.com.mx (J.B.-P.); lopeztorresmanuel88@gmail.com (M.O.L.-T.)

² Laboratorio de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico; rsantana@ifc.unam.mx

³ Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, CDMX 14269, Mexico; maldonado.perla@gmail.com

⁴ Departamento de Psicoimmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, CDMX 14370, Mexico; lusenbeve@yahoo.com (E.B.-V.); gipersanchez@hotmail.com (G.P.-S.); lkuriaki@imp.edu.mx (L.P.)

* Correspondence: brenda.marquinac@incmnsz.mx (B.M.-C.); rhdezpando@hotmail.com (R.H.-P.)

Received: 16 October 2020; Accepted: 11 December 2020; Published: 13 December 2020



Abstract: Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease in which prolonged, non-resolutive inflammation of the lung may lead to metabolic and neuroendocrine dysfunction. Previous studies have reported that individuals coursing pulmonary TB experience cognitive or behavioural changes; however, the pathogenic substrate of such manifestations have remained unknown. Here, using a mouse model of progressive pulmonary TB, we report that, even in the absence of brain infection, TB is associated with marked increased synthesis of both inflammatory and anti-inflammatory cytokines in discrete brain areas such as the hypothalamus, the hippocampal formation and cerebellum accompanied by substantial changes in the synthesis of neurotransmitters. Moreover, histopathological findings of neurodegeneration and neuronal death were found as infection progressed with activation of p38, JNK and reduction in the BDNF levels. Finally, we perform behavioural analysis in infected mice throughout the infection, and our data show that the cytokine and neurochemical changes were associated with a marked onset of cognitive impairment as well as depressive- and anxiety-like behaviour. Altogether, our results suggest that besides pulmonary damage, TB is accompanied by an extensive neuroinflammatory and neurodegenerative state which explains some of the behavioural abnormalities found in TB patients.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; neuroinflammation; behaviour abnormalities

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) [1] and is considered a global priority due to the high number of new diagnoses and its 1.2 million deaths annually [2]. TB is associated with an increased risk of medical comorbidities contributing to a

ARTICLE

Immunotherapeutic effect of adenovirus encoding antimicrobial peptides in experimental pulmonary tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa¹ | Dulce Mata-Espinosa¹ | Alejandro Francisco-Cruz² |
 Manuel Othoniel López-Torres¹ | Sujhey Hernández-Bazán¹ | Jorge Barrios-Payán¹ |
 Brenda Marquina-Castillo¹ | Marta Carretero^{3,4} | Marcela del Río^{3,4} |
 Rogelio Hernández-Pando¹

¹Experimental Pathology Section, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

²Department of Translational Molecular Pathology, Division of Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

³Epithelial Damage, Repair and Tissue Engineering, Ciemat-Fundación Marcelino Botín, Complutense University, Madrid, Spain

⁴IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

Correspondence

Rogelio Hernández-Pando, Experimental Pathology Section, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.
 Email: rhdezpando@hotmail.com

Abstract

As components of the innate immune response, antimicrobial peptides (AMPs) efficiently contribute to infection control and maintenance of a latent state in pulmonary tuberculosis (TB). As a therapeutic strategy, the administration of recombinant AMPs could be limited by enzymatic degradation and high production costs. Likewise, strategies based on the induction of AMPs have generated controversial results. In this study, 2 recombinant type-5 adenoviruses (Ad) expressing the human β -defensin 3 (H β D3) or cathelicidin (LL37) were assessed in a murine pulmonary TB model. Mice infected with either a high dose of a drug-sensitive (H37Rv) or a multidrug-resistant (MDR) strain of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) were treated with a single administration of AdH β D3, AdLL37, AdGFP (control vector expressing a green fluorescent protein), or saline solution (SS). Lungs were obtained to determine the bacterial burden, histologic damage, and cytokine expression at different time points. Mice treated with AdH β D3 or AdLL37 showed significantly lower bacterial load and pneumonia, and higher proinflammatory cytokine expression than the control groups AdGFP and SS. A synergistic therapeutic effect could be observed when first- or second-line antibiotics (ABs) were administered with adenoviral therapy in animals infected with H37Rv or MDR strains, respectively. Adenovirus-delivered AMPs administration constitutes a promising adjuvant therapy for current anti-TB drugs by enhancing a protective immune response and potentially reducing current AB regimes' duration.

KEYWORDS

adenovirus, antimicrobial peptides, immunopathology, immunotherapy, tuberculosis

1 | INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains a public health issue and represents the first cause of death by a single microorganism. In 2018, there were an esti-

mated 10 million individuals that developed TB and 1.5 million deaths during that year.¹ TB's current treatment consists of a 4-drug regime for a period of a minimum of 6 months.² Besides the chronicity, other concerns of anti-TB therapy are antibiotic (AB) side effects and adherence of subjects to the entire scheme. Due to the above, 16%–49% of patients fail to complete their treatments.¹ Moreover, the identification of drug-resistant strains (MDR) of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) represents a tremendous challenge for physicians and patients. The World Health Organization (WHO) recommendations for MDR-TB patients include the use of additional drugs with higher toxicity and for substantially more extended periods.² In individuals with high-risk

Abbreviations: ABs, antibiotics; Ad, type 5 adenovirus; AdGFP, adenovirus encoding the green fluorescent protein; AdH β D3, adenovirus encoding the human beta defensin 3; AdLL37, adenovirus encoding the human cathelicidin; AMPs, antimicrobial peptides; DS-TB, drug-sensitive tuberculosis; H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv; HEK293, human embryonic kidney 293 cell line; H β D3, human beta defensin 3; INH, isoniazid; LL37, human cathelicidin; MDR, multidrug-resistant; *Mtb*, *Mycobacterium tuberculosis*; OADC, oleic albumin dextrose catalase; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; SS, saline solution; TB, tuberculosis.

ARTICULO DE REVISIÓN

The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa^a, León Islas-Weinstein^a, Marco Polo Peralta-Álvarez^{a,b}, Manuel Othoniel López-Torres^a and Rogelio Hernández-Pando^a

^aSection of Experimental Pathology, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México; ^bLaboratory of Immunochemistry, Department of Immunology, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City, México

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis (TB) is the first cause of mortality by a single infectious agent in the world, causing more than one million deaths worldwide as reported by the World Health Organization (WHO). For the optimal control of TB infection, a protective immune response that limits bacterial spread without causing damage to the host is essential. Although most healthy individuals are capable of generating protective responses, patients who suffer pulmonary TB commonly present a defective immune function.

Areas covered: We intend to highlight the potential of novel immunotherapeutic strategies that enhance and promote effective immune responses. The following methodology was undertaken for establishing a literature search: the authors used PubMed to search for 'Pulmonary Tuberculosis' and keywords that denoted the novel immunotherapeutic strategies discussed in length in the text including antibodies, antimicrobial peptides, cell therapy, cytokines and gene therapy.

Expert commentary: The current therapeutic regimens for this disease are complex and involve the prolonged use of multiple antibiotics with diverse side effects that lead to therapeutic failure and bacterial resistance. The standard appliance of immunotherapy and its deployment to vulnerable populations will require coordinated work and may serve as a powerful tool to combat the ensuing threat of TB.

ARTICLE HISTORY

Received 8 January 2018
Accepted 22 March 2018

KEYWORDS

Antibodies; antimicrobial peptides; cell therapy; cytokines; gene therapy; pulmonary tuberculosis

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that has a wide variety of clinical scenarios, of which pulmonary TB is the most frequent. In 2016, 10.4 million new cases of active TB and 1.3 million deaths were reported [1]. Hence it is one of the 10 leading causes of death in developing countries and the leading cause of death in patients coinfecting with HIV [2]. In response to this problem, several measures have been implemented by the WHO, which contributed to produce a slow decrease in the incidence of TB since 1990 (1.5% per year) and a reduction of 47% in total mortality [3]. However, the global elimination of TB in the coming decades seems implausible. One of the most important reasons of this problem is the multiple limitations of current pharmacological treatment, although it is effective against most cases of drug-sensitive TB; the need for its prolonged use and high toxicity [4,5] as well as the socio-economic conditions of the patients have resulted in a constant abandonment of treatment and the emergence of multidrug-resistant TB (MDR-TB) strains [6,7]. Despite the recent development of some useful drugs for TB caused by MDR strains, cases of resistance to these new medications have already been reported [8–10]. The discovery and application of immunotherapies to improve the protective immune response in infectious diseases remains a promising field and pulmonary

TB is not the exception [11–13]. In this review, we intend to highlight the different types of immunotherapy based on experimental results obtained basically in murine models of pulmonary TB, that we consider that have a high potential for its later evaluation and use to prevent reactivation in persons with latent infection or to shorten chemotherapy in patients with active TB.

2. The immune response in TB

The immune response in pulmonary TB, a fine-tuned interaction of diverse innate and adaptive immune cells and molecules, is shaped by genetic and environmental factors of the bacteria and the host.

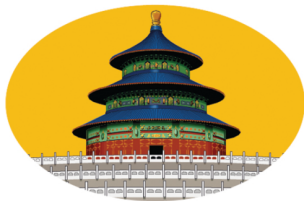
Mtb is generally transmitted through small inhaled particles coughed from an individual with active pulmonary TB. These particles enter the airways, where they can reach bronchial and alveolar epithelial cells that generate protective immune responses against Mtb infection mainly through the production of antimicrobial peptides (AMPs) (surfactant lipid monolayer, defensins), and through priming of other subsets of specialized innate immune cells including mucosal-associated invariant T cells (MAIT), natural killer (NK) T cells, and $\gamma\delta$ lymphocytes [14,15]. The recruitment of dendritic cells (DCs) to the site of infection and the later priming of naïve T cells

CONGRESOS

ISSN 0014-2980 · EJIMAF 49 (Supplement S3) · Vol.49 · Supplement S3 · October 2019

European Journal of
Immunology

Supplement S3



IUIS 2019
BEIJING

17th International Congress of Immunology

October 19–23, 2019 | Beijing, China

O208

The immune-endocrine relationship between diabetes and tuberculosis comorbidity: deleterious high production of cortisol and its correction by dehydroepiandrosterone

López Torres M.O., Marquina Castillo B.N., Ramos Espinosa O., Mata Espinosa D.A., Barrios Payan J.A., Chamberline W., Ge Y., Hernández Pando R.E.

Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán, Patología Experimental, Ciudad de México, Mexico

Diabetes is a well recognized like a risk factor for Tuberculosis (TB), with a 3-fold susceptibility rate increase. Although diverse studies have found several immune abnormalities in DM that favor TB development, the immune-endocrine mechanisms of this comorbidity have not been studied. Both diseases are characterized by excessive glucocorticoid production, apparently by the overstimulation of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11- β HSD1). This enzyme has reductase activity for 11-ketosteroids products, favors the conversion of inactive cortisone to active cortisol, and it seems that in DM the high activity of 11- β HSD1 can increase cortisol production favoring insulin resistance and suppression of Th-1 response that could contribute to the high susceptibility of TB, also suggesting that blocking this enzyme could improve glucose metabolism and favors the protective Th-1 response in TB. This 11- β HSD1 blocking activity is exhibited by the adrenal steroid hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) or its synthetic analog 16-alpha-bromoepiandrosterone (BEA, SD Chem), which is a modified androstane hormone without androgenic effects. In this work, this effect was studied using a BALB/c mouse model of DM-2 and TB, treating DM mice with BEA after two months of intratracheal infection with a high dose of *M. tuberculosis* reference strain H37Rv. This treatment produced significant reduction of hyperglycemia, liver steatosis, pulmonary bacillary loads and pneumonia. Thus, it seems that high 11- β HSD1 activity in DM and TB produce high cortisol production that is deleterious in the comorbidity DM/TB, and using glucocorticoid antagonist hormones such as DHEA or BEA is a beneficial and novel therapy for both diseases.



**IMMUNO
MEXICO 2018**

**ALAI
SMI**

Cancun 2018

Latin American Immunologists Fighting Disease

 **frontiers** Abstract Book

Evolución de Tuberculosis en un modelo murino de Diabetes Mellitus tipo 2 y su tratamiento con Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Effect of DHEA in diabetes type 2 & tuberculosis comorbidity

Manuel Othoniel López Torres¹, Brenda Marquina-Castillo¹, Dulce Adriana Mata¹, Jorge Alberto Barrios-Payan¹, Maria Andrea Carranza², Rogelio Hernandez Pando¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

²Institute of Cardiological Research, School of Medicine, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

lopeztorresmanuel88@gmail.com; brenda.marquina@gmail.com; dulmat@yahoo.com.mx; qcjbp77@yahoo.com.mx; carranza.ma@gmail.com; rhdezpando@hotmail.com

Keywords: cortisol, diabetes type 2, immunotherapy, tuberculosis (TB), DHEA deficiency

In the last three decades, 314 million new cases of Diabetes Mellitus (DM) were reported. This pandemic disease is a well-recognized risk factor for Tuberculosis (TB) with a 3-fold susceptibility rate increase.

Although studies have found several relations between TB and DM, the specific mechanisms and factors that make diabetic patients more susceptible to developing TB are not yet fully understood. Both diseases are characterized by excessive glucocorticoid production and the overstimulation of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11- β HSD1). This enzyme has reductase activity for 11-ketosteroids products and favors their conversion to cortisol. Steroid hormones, such as dehydroepiandrosterone (DHEA) or its synthetic analog 16-alpha-bromoepiandrosterone (HE2000), which is a modified androstane adrenal hormone without androgenic effects, display immune restoration activity in several infectious and metabolic diseases. Thus, hypercortisolism and decreased DHEA production could contribute to immune suppression in TB-DM individuals. Therefore, we assessed the effect of HE2000 in TB progression in the presence of DM2 in an experimental murine model.

Our results showed that HE2000 diminished bacterial load in lungs in comparison with vehicle control. However, the half-life of the animals was reduced. These results suggest that steroids play a key role in downregulating the immune response and their modulation during comorbid diabetes contributes a reduced immune response that is less effective in controlling bacterial replication within the lungs. The results suggest that HE200 is a potential candidate as an immune adjuvant with standard antibiotic therapy in the disease.