

00346

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ALTERACIONES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN
DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL
DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LA
TUBERCULOSIS PULMONAR
EXPERIMENTAL MURINA**

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA

MARÍA DE LA LUZ STREBER JIMÉNEZ

Director de tesis: Dr. Rogelio Hernández Pando

Co-tutores: MC Raúl Mancilla Jiménez

MC Vicente Díaz Sánchez

México, D.F.

2000

28.11.14



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi mamá, abuelita y tía, con cariño y agradecimiento por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas que contribuyeron de una u otra forma a mi formación y a la realización de esta tesis:

Dpto. de Patología: Dr. Arturo Angeles, Srta. Eréndira Angeles, QFB Kutzi Arriaga, Sra. Gabriela Cedillo, Sra. María Eugenia Hernández, Sr. Juan Carlos León, Dr. Lenin Pavón, Dr. Héctor Orozco, Dr. Edgardo Reyes, Srta. Irma Verón, Dra. Norma Uribe

Dpto. de Inmunología: QFB Susana Bahena, Dr. Javier Cabiedes

Dpto. de Investigación Experimental y Bioterio: Dr. Rafael Hernández, MVZ Octavio Villanueva

Dpto. de Reproducción: Dr. Vicente Díaz, Dra. Angélica Morales

División de Informática: Lic. Alejandro García, Lic. Josué Uriel González

Fac. de Ciencias: Sr. Rafael Serrano, MenC Guadalupe Zavala

Biblioteca del IFC: C.D. Javier Gallego, QBP Alba Tuena

IIB: MenC Martha Elinos, Dr. Raúl Mancilla

Fac. de Medicina: Biol. Armando Zepeda, Biblioteca J.J. Izquierdo: Sr. Rafael Gómez

Carl Zeiss: Sr. Norberto Reyes

Así como al Dr. Jesús Reynaga del IIB por las sugerencias y recomendaciones estadísticas.

También deseo agradecer que este trabajo de tesis haya obtenido los siguientes premios:

- Diploma de 1er. lugar en el área de Investigación Experimental en el II Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud, Huatulco, Oaxaca, noviembre 20, 1997.
- Diploma de Excelencia Académica por la presentación del trabajo de investigación: "Alteraciones en la estructura y función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal durante la evolución de la tuberculosis pulmonar experimental murina" durante la Reunión de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud 1998, Fac. de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, abril 24, 1998.
- Diploma de 2o. Lugar en el área de Ciencias Básicas por el trabajo de investigación: "Propiedades terapéuticas emergentes de la combinación de glucocorticoides esteroides antiglucocorticoides en la tuberculosis pulmonar experimental murina", presentado en el XVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey, N.L. efectuado en octubre 19 al 23, 1998. Mayo 11, 1999.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN-----	1
ABREVIATURAS-----	3
TABLA DE CONTENIDO-----	4
INTRODUCCION-----	6
HIPOTESIS-----	51
OBJETIVOS-----	51
MATERIAL Y METODOS-----	52
RESULTADOS-----	60
DISCUSION-----	69
CONCLUSIONES-----	75
BIBLIOGRAFIA-----	76
FIGURAS-----	91

RESUMEN

STREBER JIMENEZ MARIA DE LA LUZ Alteraciones de la estructura y función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal durante la evolución de la tuberculosis pulmonar experimental murina (bajo la dirección de. Dr. Rogelio Hernández Pando, M.C. Raúl Mancilla Jiménez, M.C. Vicente Díaz Sánchez)

La respuesta inmunológica protectora en la tuberculosis depende de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) que producen IL-2 e interferón-gama (IFN- γ), en colaboración con células citolíticas y macrófagos activados que secretan IL-1 y TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Cuando la enfermedad progresa las células T tipo 2 (Th2) producen IL-4 e IL-10, creando un balance mixto Th1/Th2, que conduce al agravamiento de la enfermedad. En este trabajo, durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis* se investigó la correlación entre las alteraciones morfológicas y funcionales que sufren los pulmones con las modificaciones al eje HHA para así lograr la manipulación de la respuesta inmunológica protectora mediante la administración exógena de hormonas androgénicas adrenales. Dado que los glucocorticoides estimulan a las células Th2, mientras que los andrógenos adrenales activan a los linfocitos Th1, la administración exógena desde el principio y en forma continua de los andrógenos adrenales prolongará la respuesta patrón de tipo 1, mientras que la administración en forma combinada de andrógenos adrenales y glucocorticoides logrará revertir de un patrón mixto a un patrón tipo 1. Se inoculó intratraquealmente *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a ratones singénicos machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Se sacrificaron en diferentes tiempos. En los pulmones se estudió la histopatología, morfometría y por inmunohistoquímica la localización y producción de IL-1,2,4 y TNF. También se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias bacterianas (UFC). Las adrenales se pesaron y se estudiaron por microscopía de luz y electrónica. En el hipotálamo se determinó la expresión del Factor Estimulante de Corticotrofina por hibridación *in situ* cuantitativa. La enfermedad mostró en su evolución dos fases: aguda y crónica. La aguda correspondió al primer mes post-infección y se caracterizó por presentar infiltrado inflamatorio en el pulmón con formación de granulomas, predominio de actividad tipo 1 y elevada producción de IL-1 y TNF, en coexistencia con hipertrofia adrenal. En comparación, la crónica se inició al mes de infección, se caracterizó por neumonía progresiva asociada a un balance mixto Th1/Th2 y con atrofia acentuada de las adrenales. También se analizó la evolución de la enfermedad en animales tratados con andrógenos adrenales exógenos: Dehidroepiandrosterona (5-androsten-3 β -ol-17-uno, DHEA) y su derivado, Androstenediol (5-androsten-3 β -17 β -diol, AED) administrados en la fase aguda, y en la fase crónica, en combinación con corticosterona. La administración de andrógenos adrenales desde el principio de la infección indujo una disminución de las UFC y un incremento en la sobrevida. Un efecto benéfico similar, se observó en animales en la fase crónica (día 60) y a los que se les transplantaron adrenales de animales sanos o que se les administraron en combinación andrógenos adrenales y glucocorticoides (corticosterona). La administración exógena de las hormonas androgénicas durante la fase aguda de la infección produce un efecto de potenciación y prolongación del patrón de citocinas tipo 1. El tratamiento hormonal en la fase crónica logra una reversión parcial del patrón tipo 2 al de tipo 1. En conclusión, al existir profundas alteraciones del sistema neuroendócrino durante el curso de la tuberculosis pulmonar experimental se altera la respuesta inmune protectora. El estudio de este fenómeno constituye una nueva faceta en la patogenia de la enfermedad y permite la posibilidad de implementar tratamientos novedosos que pudieran ser de utilidad en la terapia de la tuberculosis humana.

SUMMARY

STREBER JIMENEZ MARIA DE LA LUZ. Structure and function alterations of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis through the evolution of murine experimental pulmonary tuberculosis (Director. Dr. Rogelio Hernández Pando, Co-directors: M.C Raúl Mancilla Jiménez, M.C. Vicente Díaz Sánchez)

Protective immunologic response in tuberculosis depends on the T helper lymphocytes or Type 1 (Th-1) producing IL-2 and Interferon gamma (IFN γ), in cooperation with cytotoxic cells and activated macrophages producing IL-1 and Tumor Necrosis Factor (TNF). When the disease progresses, the T helper cells of class 2 (Th-2) produce IL-4 and 10 increasing their activity and creating a mixed balance (Th-1+Th-2), which leads to the disease's aggravation. In this work, the morphological alterations of the adrenal glands during the course of murine experimental pulmonary tuberculosis were investigated. Since glucocorticoids stimulate Th-2 cells, while the adrenal androgenic steroids activate Th1 lymphocytes, we analyzed the morphological and immunological modifications produced by the exogenous adrenal steroid administration to search if they were reversed from a standard Th-2 to Th-1 type. Live and virulent bacilli were inoculated intra-tracheally (strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) to syngeneic male BALB/c mice 6 to 8 age-weeks-old. The animals were killed in different periods of time. The lung was studied by histopathology, morphometry and immunohistochemistry (IL-1,2,4 and TNF). The bacterial Colony Forming Units (CFU) was determined. The weight of the adrenals was recorded and they were studied with light and electron microscopy. The expression of the Corticotrophin Releasing Factor (CRF) was determined by quantitative hybridization *in-situ* (HIS) in the hypothalamus. The evolution of the disease was analyzed in animals treated with exogenous adrenal steroids dehydroepiandrosterone (5-androsten-3 β -ol-17-uno, DHEA) and androstenediol (5-androsten-3 β -17 β -diol, AED) administered in the early and advanced phase of the disease. The evolution of the disease showed two phases: acute and chronic. The acute phase corresponded to the first month of infection. It was characterized by inflammatory cells infiltration, granulomata, with a predominance of Th-1 and with a high production of IL-1 and TNF, in a co-existence with adrenal hypertrophy. In comparison, the chronic phase began at month of infection, and it was characterized by progressive pneumonia associated with a mixed balance Th-1/Th-2 and adrenal atrophy. The adrenal steroids administration when the infection started, induced a reduced tissue damage, reduction of the CFU and increment of the survival rate. A similar beneficial effect was observed in chronic infected animals which were transplanted with adrenals from healthy animals or with the administration of glucocorticoids (corticosterone) combined with adrenal androgenic steroids. In the acute phase, an effect of magnification and prolongation of Th-1 response is achieved with the exogenous administration of the hormones. In the chronic phase a partial reversion of the standard Th-2 to type Th-1 is achieved. These results contribute to the knowledge of the disease's pathogenesis and it leads to proposing novel treatments which could be useful in the treatment of human tuberculosis.

ABREVIATURAS

a.a. aminoácidos
AED+C Androstenediol más corticosterona
A.M. Aceite Mineral
AMPc monofosfato de adenosin cíclico
A.O. Aceite de Oliva
CIR células inmuno-reactivas
DHEA+C Dehidroepiandrosterona más corticosterona
DHEAS sulfato de dehidroepiandrosterona
DTH Delayed Type Hypersensitivity= prueba de hipersensibilidad tardía
D.O. Densidad Optica
ELISA Enzyme Linked Immuno Assay, ensayo inmunoenzimático
ERK cinasas reguladas por señales extracelulares
FLC Factor Liberador de la Corticotropina
GH growth hormone= hormona del crecimiento
GCS glucocorticoides
HC hormona del crecimiento
H.H.A. eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal
IFN- γ interferón gamma
Ig Inmunoglobulina
IL- Interleucina
MIF factor de la inhibición de la migración de macrófagos
O.H. alcohol, metanol
11 β -HSD 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
PKA protein cinasa A
PKC protein cinasa C
PPD purified protein derivative, derivado proteico purificado
SAPK protein cinasas activadas por estrés
S.C. subcutánea
Th linfocito T cooperador
TNF- α tumor necrosis factor= factor de necrosis tumoral alfa
UFC Unidades Formadoras de Colonias

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	6
LA TUBERCULOSIS (TB)	6
PATOGENIA DE LA TB	8
Células que participan en la respuesta inmunológica a la TB.....	10
El cambio de Th1 a Th2.....	11
Alteraciones endocrinológicas en la TB.....	12
Fenómeno de Koch.....	13
Anergia.....	14
Latencia.....	14
EL MODELO ANIMAL: EL RATON BALB/c.....	15
EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL.....	16
EL HIPOTÁLAMO	16
I Núcleo Supraóptico (NSO)	18
II Núcleo Paraventricular (NPV).....	18
III. Núcleos neurosecretorios accesorios	19
LA GLANDULA HIPOFISIS.....	20
La Adenohipófisis.....	21
La Neurohipófisis.....	22
LA GLANDULA ADRENAL	23
Adaptaciones Celulares en la Adrenal.....	25
EL SISTEMA RESPIRATORIO EN ROEDORES.....	27
ENDOCRINOLOGÍA Y RITMOS BIOLÓGICOS LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	27
INTERACCIONES INMUNO-NEUROENDOCRINAS.....	29
Relaciones Anatómicas.....	29
Factores de Regulación	30
Comunicación Celular.....	30
Neuropéptidos.....	31
Citocinas	32
Hormona Liberadora de Corticotropina (CRF).....	33
Pro-Opiomelanocortina (POMC).....	33
Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH)	34
Otras hormonas:.....	35
REGULACION DEL EJE HHA DURANTE EL ESTRÉS	35
El papel inmunoregulador de los neurotransmisores	36
El papel inmunoregulador de las citocinas:.....	37
Efectos de IL-1 en el eje HHA.....	38
El papel del CRH.....	39
Efectos de IL-2 en el eje HHA	40
Efectos de IL-6 en el eje HHA	40
Otros mecanismos.....	41
Efectos del estrés:.....	41
LOS ESTEROIDES	42
Los Receptores	43
Los Esteroides y el Sistema Inmune	44
LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA).....	45
Efectos de la DHEA	46
Mecanismos de acción	48
EL ANDROESTENEDIOL (AED)	49
EL CORTISOL	49
LA CORTICOSTERONA	50
HIPOTESIS.....	51
OBJETIVOS.....	51
MATERIAL Y METODOS.....	52
1 Preparacion de la micobacteria.....	52

2 Los animales.....	52
3 Grupos experimentales	53
4 Variables.....	54
A. Sobrevida.....	54
B. Reacción de DTH.....	54
C. Peso Corporal	55
D. Obtención, procesamiento y medición en las glándulas adrenales.....	55
E. Obtención, procesamiento y morfometría en los pulmones	55
F. Técnica de inmunohistoquímica en los pulmones.....	57
G. Determinación de UFC en homogeneizados de pulmones.....	57
H. Técnica de ELISA indirecta para la determinación de anticuerpos específicos subclases de Ig G en ratones contra <i>M. tuberculosis</i>	57
I. Hibridación In Situ en los Encéfalos	58
J. Determinación de la corticosterona en suero.....	58
K. Realización del trasplante de adrenales	59
RESULTADOS.....	60
1. El Porcentaje de Sobrevida.....	60
2. Reacción de DTH.....	61
3. Peso corporal.....	62
4. Alteraciones anatómicas de las adrenales.....	62
5. Morfometría de los pulmones	63
6. Inmunohistoquímica de los pulmones.....	64
7. Determinación de UFC en los pulmones.....	66
8. Expresión de subclases de IgG determinadas por ELISA	66
9. Hibridización in situ en los encéfalos.....	68
10. Determinación de niveles de corticosterona en suero.....	68
11. Trasplante de adrenales	68
DISCUSION.....	69
CONCLUSIONES.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	76
ANEXO.....	87
FIGURAS.....	91

INTRODUCCION

LA TUBERCULOSIS (TB).

El Origen.

La TB era endémica en los animales del período paleolítico antes de que afectara al hombre. Las primeras infecciones del humano casi seguramente se originaron por comer carne infectada o por beber leche contaminada (Bates JH, 1993). La TB es una enfermedad conocida en la antigüedad, como nos lo indica el hallazgo de la Enfermedad de Pott en un esqueleto del neolítico. No se distribuye igual o simultáneamente en todo el mundo (Ellner, 1994).

El estudio genético reciente de las diversas especies de micobacterias proporciona la evidencia de que la evolución de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) se dió desde bacterias saprofíticas de suelo a *M. bovis* la cual ataca a un espectro más amplio de animales inferiores y entonces evolucionó a *M. tuberculosis* con lo que su patogenicidad se limitó en su mayor parte al humano (Stead, 1997).

Epidemiología.

En el pasado decenio del siglo XX, un estimado de 90 millones de casos de TB ocurrieron, resultando en cerca de 30 millones de muertes, la mayor cantidad de mortalidad asignada a cualquier otro patógeno humano. La mayoría de estos casos ocurrieron en los países en desarrollo, pero en el mundo industrializado, después de un siglo de declinación progresiva de la enfermedad, se ha visto un aumento en los casos de TB en años recientes (Young, 1995).

La epidemiología de TB en los EUA ha cambiado dramáticamente desde 1985, con una incidencia creciente de TB a través de 1992 y con una tendencia ascendente que comenzó en 1993. El aumento en la incidencia de TB se atribuyó a la epidemia del HIV (virus de la inmunodeficiencia humana), aumentado por la inmigración desde países con una alta prevalencia de TB y con la disminución en recursos disponibles a los programas de control de la TB (McCray, 1997). Debido a la re-emergencia de la TB en 1993, la Organización Mundial de la Salud la declaró una emergencia global en salud pública (Porter, 1994).

La TB en los niños es un problema globalmente creciente, aún en muchos países industrializados. Con una incidencia ascendente, se deberá encarar nuevamente el desafío de las presentaciones innumerables de esta enfermedad. La multiresistencia a antibióticos y la coinfección con el HIV produce las complicaciones adicionales actuales. El interés renovado en la TB ha conducido al progreso en la comprensión de los mecanismos antibacterianos, la regulación de la respuesta inmune Th1/ Th2, los factores de virulencia y la potencialidad de desarrollar agentes inmunoterapéuticos para reducir la duración de la terapia antituberculosa. (Costello; 1995).

La tuberculosis en los animales.

La tuberculosis se dá primariamente por la transmisión de la enfermedad respiratoria de la infección dentro de y entre especies, principalmente por la ruta del aerotransporte. El *M. bovis*, la causa de la tuberculosis vacuna, tiene una gama de hospederos excepcionalmente amplia. Las especies susceptibles incluyen al ganado, al humano, primates, cabras, gatos, cerdos, búfalos, zarigüeyas, ciervos y bisontes. Muchas especies son susceptibles, incluyendo al hombre, funcionan como hospederos en donde la infección se mantiene. En los países donde hay transmisión de infección de la fauna silvestre endémica que infecta a poblaciones pecuarias y a otros animales bajo crianza, por lo que la erradicación no es factible y las medidas de control deben aplicarse indefinidamente. Los métodos posibles para delimitar la diseminación de infección desde la fauna silvestre al ganado incluye el uso de vacunas. La infección con *M. bovis* es reconocida como un problema principal en salud pública cuando éste organismo se transmite por la leche de vacas infectadas. Con la introducción de la pasteurización, esto ayudó a eliminar el problema. Hay grupos de personas que trabajan en granjas o en mataderos y son los grupos ocupacionales más probables para desarrollar la enfermedad pulmonar (O'Reilly, 1995).

Situación de la TB en México.

La TB es uno de los problemas de salud pública más importantes en el país. En el año de 1998 se reportaron cerca de 16 000 casos en promedio y se registraron 5 mil muertes (b.- DG Epidemiología, 1998). En el año de 1999 el total de casos acumulados fué de cerca de 18 000 casos (DG Epidemiología, 1999).

En nuestro país la Secretaría de Salud emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la atención primaria de la salud, publicada en el diario oficial del 26 de enero de 1995. (SSA, NOM) Sin embargo la tuberculosis continúa siendo un serio problema de salud pública, tanto en zonas rurales como urbanas, ya que como método diagnóstico en el 80 % de los casos se utiliza la baciloscopia de 3 muestras de espectoración con la tinción de Ziehl Nielsen, además de que los medicamentos utilizados para su tratamiento como son isoniacida, rifampicina, pirazinamida y netambutol no están controlados y no es raro que sean prescritos para otras enfermedades lo que ha originado problemas de resistencia primaria (b.-DG Epidemiología, 1998).

El mayor porcentaje (34.14 %) de casos de TB pulmonar se dá en el grupo de edad de 25 a 44 años (DG Epidemiología, 1997).

La incidencia de TB pulmonar en 1995 con mayor morbilidad se presentó en los estados de Guerrero y Chiapas, con una tasa de 39.7- 51.5 por cada 100 000 habitantes (a.-DG Epidemiología, 1998).

Por su riesgo de infección está clasificada dentro del nivel III de seguridad biológica, ya que es una especie patógena estricta y hay un riesgo elevado de transmisión por vía aérea al experimentador y como consecuencia puede haber una infección severa que puede ser mortal (Fennelly, 1997).

Desde 1882, en todo el mundo, el 24 de marzo se celebra el Día Mundial de la Tuberculosis.

Las micobacterias.

La bacteria *M. tuberculosis* se tiñe uniformemente o en forma irregular, es gram-positiva, se define como un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR), con la tinción de Ziehl-Neelsen, de forma recta o bastones ligeramente curvos, mide 0.3-0.6 μm de ancho y 1-4 μm de largo. Forma ocasionalmente hilos. No es móvil. Es aerobia, de crecimiento lento: su curso de generación in vitro bajo la condición óptima es en 14 a 15 hrs. El crecimiento óptimo es a 37 °C y el pH es de 6.4-7.0. Es estrictamente parasitaria, su forma de transmisión es por el polvo y gotitas respiratorias. La enfermedad es la tuberculosis pulmonar pero puede ser extrapulmonar (Lentner, 1992)

La micobacteria tiende a tener una disposición en cordones, es formadora de colonias rugosas no pigmentadas que tardan de 2 a 8 semanas en crecer, en medio inclinado de Lowenstein-Jensen, productora de niacina y pirazinamidasas, reductora de nitratos y no productora de catalasa ni arilsulfatasa e inhibida por NAP (p-nitro- μ -acetylaminob- β -hydroxi-propiofenona) (Nolte, 1995).

PATOGENIA DE LA TB.

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa de curso crónico que afecta profundamente a la respuesta inmunológica (e.- Rook, 1996). La vía de infección más frecuente es la aerógena por lo que la forma más común de TB es la pulmonar, pero también es importante la vía digestiva por la contaminación de la leche y sus derivados y constituye una zoonosis (Bloom, 1994).

Para la infección pulmonar se requieren ciertos factores:

1. La dosis infecciosa es muy baja, comúnmente de 1-5 bacilos tuberculosos.
2. El primer implante puede ocurrir en cualquier parte de los pulmones.
3. La lesión cavitaria, característica de la enfermedad, se ubica frecuentemente en las regiones apicales de los pulmones.
4. Considerando que el implante primario puede ocurrir en cualquier parte pulmonar, para la progresión desde la infección a la enfermedad, los bacilos tuberculosos deben de tener acceso a las regiones vulnerables en el ápice de los pulmones. Por medio de la vía aerógena, se requiere que existan episodios repetidos de infección, así como la probabilidad de un implante que ocurra en las regiones vulnerables (Balasubramanian, 1994).

Las micobacterias como patógenos intracelulares, sobreviven y crecen en los macrófagos del hospedero. Los bacilos entran en el macrófago por medio de varias y distintas moléculas de superficie de la célula, por ejemplo los receptores a manosa. Después de la fagocitosis, el mantener el crecimiento bacteriológico intracelular, depende de la capacidad para evitar la destrucción por el macrófago mediante defensas tales como: enzimas lisosomales, el oxígeno reactivo e intermediarios de nitrógeno reactivo, además de evitar la fusión de los lisosomas (Ragno, 1997).

Después de ser fagocitado el bacilo por los macrófagos alveolares, éste induce a la activación de dichas células con la producción de diversas citocinas como IL-1 y TNF, que inducen a la destrucción directamente del bacilo tuberculoso a través de la generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno e inducen a la activación de los linfocitos T CD4 de clase 1, dichas células son además activadas por la presentación de antígenos micobacterianos por los mismos macrófagos infectados. Las células CD4 de tipo 1 producen a su vez sus propias citocinas como la interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (INF), que activan todavía más a la población macrofágica y promueven la destrucción activa del bacilo y en consecuencia permiten el control temporal de la enfermedad (b.- Rook-GA, 1994). Una de las manifestaciones morfológicas de éstas interacciones celulares es la formación de *granulomas*, éste elemento histológico distintivo de la TB se le considera también como una manifestación histológica de la inmunidad celular, la cual también se expresa en la clásica respuesta de hipersensibilidad cutánea tardía (Iochim, 1983).

El concepto de inmunidad celular surgió con la TB y es la encargada de la protección en la infección, es representada por los macrófagos, linfocitos CD4 de tipo 1, las células citolíticas CD8 y el espectro de citocinas que producen el patrón tipo 1 (c.- Rook; 1994).

Se ha demostrado que la inmunidad humoral, en general, no tiene una participación relevante en la protección (Laal-S; 1997) pero hay una producción de auto-anticuerpos que pueden correlacionar con la gravedad de la enfermedad (Rajalingam; 1996).

Existen diversos factores de origen bacteriano y de la misma respuesta inflamatoria que conducen al desbalance de la respuesta protectora, facilitando con esto la progresión de la enfermedad. Existen moléculas en la pared de *M. tuberculosis* como es el lipoarabinomano que inactivan a los macrófagos (Nolte, 1995) y factores propios de las respuesta inmunológica como la producción excesiva de citocinas linfocíticas del patrón tipo 2 (interleucinas 4 y 10), las cuales antagonizan a las citocinas del patrón tipo 1 y desvían a la respuesta de inmunidad celular a la producción de anticuerpos y por lo tanto a un patrón tipo 2, además de que en este contexto de citocinas macrofágicas protectoras, como el TNF se convierten en factores inductores del daño tisular como es la necrosis y la fibrosis (c.- Hernández-Pando; 1994). Además de que la sobreproducción de citocinas anti-inflamatorias como el factor de transformación del crecimiento β (TGF- β) el cual es un potente inmunosupresor de la inmunidad celular, lleva a que la enfermedad progrese y se vuelva crónica y eventualmente conduzca a la muerte del individuo (b.- Hernandez-Pando; 1997).

Los antecedentes genéticos también juegan un papel muy importante en la enfermedad, pues en el ratón, en el cromosoma 1, el locus Bcg (Ity, Lsh) controla la capacidad del macrófago en los tejidos para restringir la replicación de parásitos intracelulares antigénicamente no relacionados y por lo tanto determina la resistencia natural (BCG- Resistente, dominante) o la susceptibilidad (BCG- Susceptible, recesivo) de los ratones a la infección con patógenos diversos, que incluye varias especies de *Mycobacterium*, *Salmonella typhimurium* y *Leishmania donovani*. El gen Bcg también

se le llaman Nrap, por sus siglas en inglés "natural resistance associated macrophage protein" que es una proteína transportadora (Malo, 1994).

Células que participan en la respuesta inmunológica a la TB.

Los linfocitos T juegan un papel dominante en la reacción inmune a las infecciones por micobacterias. La mayoría de los antígenos micobacterianos son reconocidos por Los linfocitos T CD4+ y CD8+ alfa-beta, así como también por Los linfocitos T delta- gamma. Los antígenos reconocidos por Los linfocitos T CD4+ se han estudiado con detalle, con interés particular en las proteínas, lipoproteínas y proteínas de choque térmico. El péptido traza de varias proteínas micobacterianas ha sugerido que muchos de sus epítopes se reconocen permisivamente dentro de un marco del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, tanto en humanos como en el ratón. Este hallazgo alienta para el desarrollo de los vacunas de subunidades y aplicaciones como reactivos diagnósticos (Vordermeier, 1995). Se ha demostrado que el epítipo inmunodominante es el p61-80 de *M. tuberculosis*, es una proteína de 19,000 de peso molecular que se reconoce de manera genéticamente permisiva. El reconocimiento permisivo de p61-80 se dió en 3 haplotipos (H-2B, d y k) en el ratón. En todos los tres haplotipos, las reacciones a p61-80 eran restringidas por el MHC I-A de moléculas clase II (Harris, 1995).

En humanos, se realizó un estudio para comparar el porcentaje de linfocitos T gamma/delta en la sangre periférica de pacientes negativos y pacientes con la infección de *M. tuberculosis* pero positivos a la tuberculina y controles saludables. No se encontró ninguna diferencia en el porcentaje de linfocitos T gamma/delta entre pacientes y controles, sin embargo, cuando los pacientes se dividieron en dos grupos según la reactividad o no a la reacción de piel de Mantoux un porcentaje superior de linfocitos T gamma/delta se encontró en la sangre periférica de pacientes con anergia a la tuberculina que en los controles o pacientes positivos a la tuberculina. El porcentaje alto de células T gamma/delta en los pacientes anérgicos a la tuberculina pueden reflejar un cambio en la reacción inmune hacia una dirección Th2 caracterizada por la producción aumentada de anticuerpos y disminuida de la inmunidad celular (Baliko, 1997).

Se ha observado que la hormona del crecimiento (GW) juega un papel importante en la estimulación in vitro de los macrófagos para la producción más eficiente de H₂O₂, ya que tienen un efecto parecido al del interferón gamma, pero a diferencia de éste, no sinergiza para la producción de TNF con las endotoxinas, además de que no altera la morfología o la adherencia del monocito en la fagocitosis y destrucción del *M. tuberculosis*, por lo que sus efectos sobre los monocitos humanos in vitro parecen limitarse para la liberación de intermediarios del oxígeno reactivo..(Warwick-Davies, 1995).

Las células NK (natural killers), no-T, no-B son los linfocitos inmunes efectores, que se localizan en muchos órganos, incluyendo el hígado, así como también en la circulación. Muchas células contienen gránulos densos reactivos a la *perforina*, pero no

tienen ninguna actividad citolítica convencional contra YAC-1. Expresan constitutivamente el ligando de Fas (FasL) y específicamente matan a las células blanco Fas positivas por fragmentación del ADN. Esta actividad mediada por Fas-FasL es mejorada por el factor inductor de IFN-gamma, una citocina que es producida por las células de Kupffer activadas, pero no es afectada por otras citocinas tales como IL-12, IL-1-beta, y TNF-alfa. Estos hallazgos sugieren que las células NK hepáticas participan en los reacción inmunes como células efectores mediante el sistema Fas-FasL en colaboración con las citocinas de las células Kupffer (Tsutsui; 1996).

También se ha demostrado que todas las cepas micobacterianas crecen más activamente en fibroblastos que en macrófagos de médula ósea ya que los fibroblastos son capaces de segregar mediadores que estimulan la infección por micobacterias patógenas. Estos resultados se han discutido desde el punto de vista de los interacciones micobacterias- fibroblasto y su papel final en la modulación inmune de la reacción del hospedero a micobacterias invasoras (Rastogi; 1992).

El cambio de Th1 a Th2.

Las citocinas como grupo de mediadores polipéptidos, juegan una gran variedad de papeles reguladores en mecanismos de defensa de hospedero y en la homeostasis. Sus efectos (que pueden ser supresores o estimuladores) se basan en la proliferación celular, diferenciación, activación y motilidad. Además, las citocinas pueden ejercer efectos citodestructivos sobre agentes infecciosos o sobre células tumorales, o directamente por la activación de células con potencial citodestructivo. Cualquier citocina puede tener muchos efectos biológicos diferentes, sin embargo, dos citocinas distintas pueden tener actividades similares o idénticas. Las citocinas pueden clasificarse en base a su célula de origen, su espectro de actividad, la categoría de actividad de su influencia, las células que son sus blancos, o sobre hallazgos específicos de su ligando-receptor. El modo de acción de muchas de las citocinas involucra sucesos típicos de traducción de señales, tales como la fosforilación de proteínas. No obstante, su papel en procesos patológicos ha proveído del conocimiento fisiopatológico de enfermedades autoinmunes y alérgicas, así como también de una gran variedad de desórdenes sistémicos (Cohen;1996).

Dentro de la respuesta humana a la infección con *M. tuberculosis* los componentes claves de ésta reacción son las citocinas y otros componentes de la inmunidad celular, predominantemente Los linfocitos T y los macrófagos. Aunque las relaciones entre los componentes de la reacción inmune son complejas, las citocinas tales como TNF-alfa e IL-1 beta sirven para reclutar más linfocitos, generalmente del fenotipo Th (h, helper= ayudante o cooperador), que entonces produce sustancias tales como el factor activador de macrófagos, además los macrófagos activados por IFN-gamma pueden lisar mejor a las micobacterias intracelulares y de esta forma controlar la infección. El papel de otras citocinas, tal como IL-6 e IL-8, es menos claro, sin embargo hay evidencias de que cuando una reacción Th2 es super-impuesta sobre una reacción TH1 pre-existente, el sitio inflamatorio llega a ser exquisitamente sensible a las citocinas, produciéndose daño por necrosis. Este cambio de Th1 a Th2 puede

darse por sutiles cambios endocrinológicos que alteran la reacción a *M. tuberculosis* (d.- Rook; 1994).

Se ha despertado mucho interés en los factores que controlan el perfil de citocinas de los linfocitos T cooperadores (Th), y la atención se ha enfocado en la retroalimentación desde las citocinas en sí mismas, ya que en general, las citocinas Th1 promueven la actividad tipo 1 e inhiben la actividad Th2 y viceversa. Por lo tanto ambas reacciones Th1 y Th2 deberían ser estables, sin embargo, in vivo, muchas reacciones comienzan predominantemente como Th1 y posteriormente surge el cambio a Th2. El por qué sucede ésto parece ser la clave para entender la patogenia de diversas enfermedades de curso crónico (d.- Rook; 1994).

Alteraciones endocrinológicas en la TB.

Las interacciones entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino existen gracias al diálogo permanente que existe entre éstos sistemas a través de las hormonas, neuropéptidos y citocinas en condiciones fisiológicas y patológicas, como es en el caso de enfermedades infecciosas crónicas (Savino, 1995).

Se han observado dichas alteraciones en la TB, ya que el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA) se encuentra alterado en los tuberculosos, pues presentan niveles séricos de cortisol elevados, llevando a la pérdida del ciclo circadiano normal, además de una falta de respuesta a la hormona ACTH, que es la que regula la secreción de hormonas por parte de la adrenal (Ellis, 1986). En la infección activa, las glándulas están aumentadas de tamaño, mientras que en una TB avanzada el resultado son glándulas atróficas (Barnes, 1989). Dependiendo de la severidad de la enfermedad se ha encontrado una prevalencia del 0 al 55% de hipoadrenalismo, lo que tiene un impacto en la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Contrasta con esto la prevalencia del 90% de los pacientes con el síndrome eutiroideo y el 72% de hipogonadismo hipogonadotrofo en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa (Post, 1994).

En los humanos, la pérdida del ritmo diurno de secreción de cortisol, ocasiona una mayor ocupación de los receptores a mineralo y glucocorticoides, por lo que los linfocitos T, que expresan casi exclusivamente receptores a glucocorticoides, están bajo la influencia del cortisol y por lo tanto en un estado de supresión durante 24 hrs. Por otro lado, la disminución en los niveles séricos de DHEA en los humanos a partir de los 30 años de edad es un factor que también se asocia con el problema de la reactivación de la enfermedad (h.- Rook, 1997).

En el modelo experimental murino de TB pulmonar, cuando los ratones se infectaron con la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* por la ruta intratraqueal, se encontró que al registrar el peso de las adrenales, éste se modificaba conforme avanzaban los días de infección, ya que había un aumento de peso, hacia el día 14 y 21; posteriormente el peso disminuye, llegando a una disminución aún por debajo del peso inicial, hacia el día 120, lo que hizo pensar que al igual que en los pacientes tuberculosos, los ratones sufrían un desbalance endocrinológico. Los resultados sugirieron que los patrones de liberación de citocinas provocados por la infección, eran

la causa de los cambios adrenales. A pesar de que las adrenales no mostraron infección, todas las capas de la corteza adrenal se afectaron, pero la médula era normal. Los estudios al microscopio electrónico mostraron células en apoptosis. La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en el cojinete plantar, mostró diferencias en su sensibilidad al TNF- α . Al inyectar el TNF en los sitios de DTH durante la fase de la hipertrofia adrenal, no se observó ningún incremento en la inflamación a las 48 h. Sin embargo las inyecciones similares de TNF en la fase de atrofia adrenal resultó en una inflamación al doble en los sitios de DTH. Estos resultados sugieren que el modelo de la liberación de citocinas provocada por la infección, modulaba los cambios adrenales, quizás en la sinergia con productos derivados de las mismas micobacterias (a.-Hernández-Pando; 1995).

Fenómeno de Koch.

Robert Koch (1845-1910), describió por primera vez el agente causante de la TB en 1882, y en 1891 describió la fina línea que existe entre la protección y la patología en la TB (Ehlers, 1994). Él describió, que 4 a 6 semanas después del establecimiento de la infección en cobayos, el desafío intradérmico con el organismo entero o el cultivo filtrado resultaba en necrosis, localmente y en la lesión tuberculosa. Fenómenos similares ocurren en el humano. La prueba de la tuberculina es frecuentemente necrótica en quienes son, o han sido, tuberculosos, esto no ocurre cuando los pacientes tienen tuberculosis cutánea. (g.- Rook, 1996).

La reacción necrotizante, conocida como "Fenómeno de Koch", protegía a los cobayos contra el desafío intradérmico con organismos vivos porque la necrosis local ocasiona desprendimiento del tejido infectado. Sin embargo, una necrosis similar en sitios profundos, como la columna vertebral o los pulmones, fracasa para eliminar las bacterias, con resultados desastrosos. Este tratamiento por lo tanto se abandonó (g.- Rook, 1996). La misma reacción era también ocasionada por la inyección del filtrado de cultivo del bacilo tuberculoso, una preparación que se llamó "tuberculina antigua". El fenómeno de Koch y la "tuberculina antigua" podría bien haber llegado a ser una curiosidad histórica si no hubiera sido por los vastos estudios del médico austríaco Clemens von Pirquet sobre el uso de las reacciones "alérgicas" a la tuberculina como medio de detectar a quienes habían sido infectados por el bacilo tuberculoso. Él introdujo el término *alergia*, de *allos*= otro y *ergon*= trabajo, en referencia a cualquier reacción inmune dañina. Él también usó la palabra *anergia* (sin trabajo) para describir una pérdida de reactividad inmune y sugerir que la inmunosupresión puede ser un proceso activo (Bothamley, 1991).

En éste fenómeno, es probable que la necrosis sea mediada por parte de las citocinas, particularmente TNF y que ocurra por tres razones: primero, porque la M. tuberculosis evoca una inmunoregulación anormal caracterizada por una elevación de las IgG agalácticas, que parece asociarse a una desregulación en la liberación de citocinas. En segundo, la M. tuberculosis en sí mismo provoca la liberación de ciertas citocinas. En tercero, el papel protector normal del TNF es deformado dentro del

ambiente de citocinas evocadas por la *M. tuberculosis*, ya que se vuelve una citocina tóxica a los tejidos del hospedero (a.- Rook, 1991).

El fenómeno de Koch aumenta la susceptibilidad a la enfermedad en cobayos, así como lo hace *M. vaccae* 10⁹ en ratones, pero los resultados no apoyan que correlacione la reacción de Th2 que conduzca a la toxicidad del TNF. El factor pertinente no puede ser una de las citocinas Th2 convencionales sino algunos factores no identificados que tienden a ser activados en las reacciones Th2 (e.- Rook, 1996). La anormalidad inmunoreguladora puede ser susceptible de corrección por inmunoterapia. Muchos estudios en ratones y en pacientes tuberculosos y voluntarios demostraron que usando una cepa de *M. vaccae*, a cierta concentración, podría ser protectora por la capacidad para regular el fenómeno de Koch (Stanford, 1991).

Anergia.

La anergia es un fenómeno pobremente entendido, ya que no todos los individuos con TB activa reaccionan a la prueba de PPD en la piel. La falta de respuesta en la piel o anergia puede desarrollarse después de la prueba inicial de la tuberculina con los progresos de la infección de la TB. La anergia puede relacionarse con el alcance de la enfermedad porque los pacientes con TB miliar son más probables a tener anergia que los pacientes con la enfermedad pulmonar. En general, se desarrolla la reactividad que reaparece cuando la TB se trata exitosamente. La base para el estado anérgico en la TB no se entiende completamente. La distribución de células T CD4+ a los sitios de enfermedad activa puede jugar un papel, ya que éstas células son sequestradas en el pulmón o en otros sitios de inflamación, pero no están disponibles para el sitio de instilación del PPD y así que ninguna reacción de prueba en la piel se desarrolla. Otro componente de la anergia es la presencia de células supresoras en la sangre periférica. Se encuentran circulando complejos inmunes de la micobacteria y células, con prostaglandinas y componentes de la pared que pueden involucrarse también en la afinidad del linfocito T al PPD para bloquear los receptores al antígeno que estimula a las poblaciones celulares supresoras (Toossi, 1996).

Latencia.

Existe la evidencia circunstancial amplia desde la observación de la historia natural de la tuberculosis en el humano y animales experimentales que la *M. tuberculosis* es capaz de adaptarse a períodos prolongados de latencia en los tejidos. Los bacilos latentes son resistentes a ser eliminados por los agentes antimicobacterianos. Una evaluación sistemática del mecanismo de latencia, y de los intentos por abrogar la latencia requerirá que se entiendan mejor los sucesos fisiológicos que asisten hacia el cambio a la latencia. Hay probablemente dos o más etapas en el cambio de *M. tuberculosis* desde la regeneración activa a la latencia como los bacilos en cultivos no agitados en un sedimento donde el gradiente de O₂ se limita severamente. Un paso involucra un cambio desde el rápido a la regeneración lenta. El otro involucra un paso completo de regeneración, pero no la muerte. Presumiblemente este último paso incluye la terminación de una ronda de síntesis de ADN. El cambio en

la reanudación de la ventilación incluye por lo menos tres pasos secuenciales discretos: la producción de ARN, la división posterior de la célula sincronizada y finalmente, la iniciación de una nueva ronda de síntesis de ADN. Se han descrito tres marcadores del proceso de cambio de *M. tuberculosis* a la latencia, específicamente los cambios en la tolerancia a la anaerobiosis, la producción de un antígeno único y la producción aumentada 10 veces de deshidrogenasa de glicina. Los marcadores adicionales representados en el cambio del proceso quedan aún por descubrirse y la determinación de sus funciones específicas deberían de proveer los conocimientos de los mecanismos de la latencia en la tuberculosis y de estrategias para prevenir la reactivación de los bacilos y el consecuente desarrollo de la enfermedad (Wayne, 1994)

Para la mayoría de los individuos que viven en áreas endémicas, la infección con el *M. tuberculosis* progresa a la etapa de activación de linfocitos T, pero sólo en unos individuos la infección primaria se manifiesta hasta la enfermedad clínica. La reactivación del fenómeno es claramente ocasionado por bacterias que se han llevado en forma asintomática por muchos años. La ubicación de tales organismos persistentes, los mecanismos que permiten su viabilidad continua y los factores responsables de la reactivación son preguntas centrales para la comprensión de la patogénesis micobacteriana. En el cultivo de laboratorio, el *M. tuberculosis* puede convertirse en una forma inmóvil o latente, por la exposición a condiciones anaeróbicas; las condiciones análogas pueden existir en el centro de la lesión caseosa. La exposición previa a anaerobiosis parcial mejora la supervivencia bacteriológica a condiciones anaeróbicas, que indican que en un proceso activo requiere la instalación de vías de supervivencia (Gangadharam, 1995).

EL MODELO ANIMAL: EL RATON BALB/c.

El ratón fué usado por primera vez en investigación inmunológica por Paul Ehrlich en 1891 en una serie extraordinaria de experimentos sobre el traslado maternal de inmunidad antitóxica. Halsey Bagg en 1913 comenzó criando una línea de ratones con pedigree que se nombraron consecutivamente por él, Bagg de Albino. Estos ratones fueron los progenitores del actual BALB/c. Hoy el ratón BALB/c está entre las cinco sublíneas consanguíneas ampliamente usadas en la investigación biomédica y es el favorito para enfermedades infecciosas e investigación inmunológica. La marca de calidad de su respuesta, es su susceptibilidad a las infecciones pero ésta no está asociada con inmunodeficiencias, ya que tiene una óptima reacción a la inmunización (Foster, 1981).

La sublínea BALB/cJ tiene un inusitado fenotipo:

1. Los adultos tienen altos niveles séricos de alfa-fetoproteína,
2. El comportamiento combatiente agresivo de los machos,
3. Los niveles elevados de enzimas que determinan la biosíntesis de catecolaminas en la médula adrenal (hidroxilasa de tirosina, dopamina β -hidroxilasa y feniletanolamina N-metil-transferasa),

4. Los niveles altos de enzimas inducibles en otros tejidos p. ej. dehidratasa de serinas en el hígado, L-glicerol- 3-fosfato dehidrogenasa en la grasa parda, (Potter M, 1985).
5. Algunos autores refieren que posee resistencia a desarrollar el tumor plasmocitoma (Potter M, 1985), mientras que otros mencionan que es muy susceptible a presentarlo por inyecciones sucesivas de aceite mineral (Staats, 1982).

BALB/c tiene muy grandes los órganos reticuloendoteliales en relación al peso del cuerpo. Los pesos de los órganos de ratones machos de 12 semanas de edad son: Tímo: promedio 0.164, D.E. 0.123, Bazo: promedio 0.435, D.E. 0.043 (Cook, 1983). Su promedio de vida es 648 días para los machos y 816 días para las hembras (Staats, 1982).

EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL.

EL HIPOTÁLAMO.

El hipotálamo es una estructura filogenéticamente muy antigua, está constituida por una extensión rostral del tallo encefálico de formación reticular. Las relaciones anatómicas con otras áreas del encéfalo son importantes para las funciones viscerales, autonómicas y del comportamiento, las cuales le confieren al hipotálamo una papel vital en la homeostasis (Riskind, 1995).

El control hipotalámico de la hipófisis es mediado por dos sistemas distintos que no están completamente separados. Las hormonas del sistema hipotalámico-neurohipofiseal se liberan en la circulación sistémica por axones terminales que provienen de las grandes neuronas hipotalámicas magnocelulares. En contraste, el control de la secreción de hormonas por la hipófisis anterior es mediada por la liberación hipotalámica de hormonas liberadoras e inhibitorias, que se secretan desde axones terminales de pequeñas neuronas parvocelulares. Las hormonas de liberación se segregan a un sistema especializado portal de venas que comunican a la hipófisis anterior (Riskind, 1995).

La anatomía macroscópica:

El aspecto ventral del hipotálamo forma una prominencia convexa, el tubérculo cinerum (la eminencia gris), que yace en la base del encéfalo arriba de la glándula hipófisis. La eminencia media (infundibulum) se reconoce fácilmente como una banda ricamente vascular que corre longitudinalmente a lo largo del la línea media del tubérculo cinerum. La eminencia mediana forma el piso del tercer ventrículo y se extiende ventralmente para continuarse con el tallo hipofisiario. Los límites del hipotálamo son inexactos y se han definido arbitrariamente (Riskind, 1995).

Los grupos nucleares:

El hipotálamo se divide en tres zonas longitudinales: una lateral, una medial, y una zona periventricular. La zona lateral se divide desde la zona medial por el nivel del fórnix.transverso, la zona lateral longitudinalmente es medial al haz del encéfalo

anterior, además de un sistema importante de fibras que conectan las regiones límbicas con las regiones del tallo cerebral (Riskind, 1995).

Grupos celulares hipotalámicos más importantes:

Zona Periventricular	Zona Medial	Zona Lateral
área periventricular preóptica	área preóptica medial	área preóptica lateral
núcleo periventricular anterior	núcleo preóptico medial	área hipotalámica lateral
núcleo supraquiasmático	área hipotalámica anterior	<i>núcleo supraóptico</i>
núcleo periventricular paraventricular	<i>núcleo paraventricular</i>	
núcleo arcuato	núcleo ventromedial	
núcleo dorsomedial	núcleo perifornical	
núcleo magnocellular tuberal	área hipotalámica posterior	
	núcleo mamilar medial	

I. Núcleo Supraóptico (NSO).

A. Organización y proyecciones eferentes:

Su división principal comienza rostralmente, está constituida por neuronas grandes, dispersas y teñidas intensamente, laterales al quiasma óptico, que se agrupan y colindan con el borde lateral de la extensión óptica. Más posteriormente hay una continuación retroquiasmática que aparece como una hoja delgada de neuronas similares que yacen a lo largo de la superficie pial entre la extensión óptica y el tercer ventrículo. Ambos grupos celulares se proyectan primariamente a la hipófisis posterior (Armstrong, 1985).

Las neuronas productoras de oxitocina se distribuyen principalmente en posición anterodorsal, mientras que las neuronas productoras de arginina- vasopresina (AVP) se localizan posteroventralmente. La mayoría de las neuronas del núcleo supraóptico son grandes (20-35 μm de diámetro) y poseen de una a tres dendritas varicosas, la mayoría se extienden ventralmente y se subdividen escasamente. Muchas de éstas dendritas forman un plexo receptivo para la entrada de axones, los cuales cursan dorsal y medialmente, para posteriormente alcanzar la capa interna de la eminencia media (Armstrong, 1985). Estas neuronas son en número de 30 000- 50 000, sus cuerpos celulares poseen núcleos excéntricos, nucleólos prominentes y un citoplasma abundante con abundante *Sustancia de Nissl*, de aquí el término magnocelular (Scheithauer, 1992).

B. Conexiones aferentes:

La mayor parte de las fibras aferentes son noradrenérgicas, originadas primariamente del grupo celular A1 de la médula ventrolateral. Otro aporte de nervios aferentes se origina en el órgano subfornical, una estructura circunventricular involucrada en el balance hídrico. Algunas proyecciones aferentes provienen desde el núcleo preóptico mediano, núcleo de lecho y núcleo hipotalámico dorsomedial, también fibras que contienen serotonina pueden inervar la porción dorsal del NSO. Algunas neuronas sintetizadoras de GABA y acetilcolina yacen cerca el NSOP y pueden servir como interneuronas mediando la influencia inhibitoria del septum sobre las células neurosecretoras (Armstrong, 1985).

II. Núcleo Paraventricular (NPV).

A. Grupos que se proyectan hacia la neurohipófisis.

La gran mayoría de las neuronas paraventriculares que envían axones al lóbulo posterior de la hipófisis descansan en dos grupos distintos de células: la porción magnocelular medial (PMM) que contiene la mayoría de las neuronas que producen *oxitocina* y que yacen anteroventromedialmente en el núcleo y la división lateral magnocelular que contiene primariamente neuronas de *AVP (arginina vasopresina)* y

forman un grupo celular distinto situada postero dorsolateralmente a la PMM (Armstrong, 1985).

B. Grupos que se proyectan de la eminencia media.

Estas células son principalmente pequeñas y están ubicadas en las porciones parvocelulares anteriores (PaAP) y mediales (PaMP) del núcleo. La PaAP y la PaMP contienen una gran variedad de tipos celulares, incluyendo neuronas inmuorreactivas para neurotensina, CRF, somatostatina, encefalinas, dopamina y hormona liberadora de tirotrópina. Muchas de estas neuronas peptidérgicas las cuales probablemente conectan a la capa externa de la eminencia media. Una inervación vasopresinérgica considerable de la capa externa de la eminencia media deriva desde el NPV y está implicada funcionalmente con la regulación de los glucocorticoides. Un grupo separado de neuronas parvocelulares sólo llegan a ser inmunoreactivas para AVP después de la adrenalectomía. (Armstrong, 1985).

C. Grupos que se proyectan extrahipotalámicamente.

Los subnúcleos dorsomedial, ventral y posterior son poblados por células de tamaño variable que contienen neuronas pequeñas a medianas que contienen AVP (ventral) y oxitocina (los 3 subnúcleos) (Armstrong, 1985).

D. Conexiones aferentes.

El NPV recibe inervación noradrenérgica y no noradrenérgica desde el locus coeruleus y del núcleo del tracto solitario. También recibe proyecciones desde el núcleo preóptico medial, núcleo dorsomedial, hipotálamo lateral, núcleo supraquiasmático y células productoras de ACTH del núcleo arcuato. (Armstrong, 1985).

III. Núcleos neurosecretorios accesorios.

Éstos son los núcleos magnocelulares anteriores de la comisura y periventriculares. Ambos grupos se proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis (Armstrong, 1985).

Los núcleos encefálicos que expresan *Fos*, un producto del gen temprano inmediato celular *c-fos*, que se usa ampliamente como un índice de activación neuronal funcional, están en los núcleos del encéfalo anterior, los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo y en el núcleo amigdalóide central que se conoce controlan las funciones autonómicas, neuroendócrinas, noniceptivas y de comportamiento (Piekut, 1985).

En el hipotálamo de la rata, la concentración densa de células positivas a rCRH se ubican en la parte medial, parvocelular del NPV. Concentraciones elevadas de células positivas a rCRH se ubican también dentro del hipotálamo periventricular preóptico, núcleo supraquiasmático, núcleo hipotalámico posterior, las partes dorsales y ventral del núcleo premamilar, área hipotalámica dorsal, área hipotalámico lateral al nivel del núcleo ventromedial y lateral y las partes laterales parvocelulares y magnocelulares del NPV. Células positivas a rCRH dispersas se han visto también en

el núcleo supraóptico, en las áreas perifornicales y en el hipotálamo lateral rostral (Waynforth, 1995).

Estudios de la diferenciación hipotalámica en la rata indican que las neuronas CRH tuberoinfundibulares se ubican primariamente en el NPV parvocelular medial. Sus fibras cursan lateralmente desde el NPV y vuelven ventralmente en el hipotálamo lateral y se curvan medialmente dentro del área lateral retroquiasmática hacia la EM (Waynforth, 1995).

Una subpoblación de neuronas en el área medial, NPV parvocelular selectivamente aumenta la inmunoreacción a CRH después de la adrenalectomía, indicando la unión anatómica para el efecto selectivo de retroalimentación de los corticosteroides adrenales sobre éstas células (Bertini, 1988).

LA GLANDULA HIPÓFISIS.

Anatómicamente la hipófisis está situada en la base del encéfalo, rodeada por el hueso esfenoides y cubierto con el diafragma de la silla turca, yace en la silla cerca del hipotálamo y del quiasma óptico. Se divide en dos partes: la adenohipófisis y la neurohipófisis (Armstrong, 1985).

Embriológicamente la hipófisis tiene dos orígenes embrionarios. El lóbulo anterior o *adenohipófisis*, deriva desde una evaginación del *ectodermo* estomodeo, conocido como *Bolsa de Rathke*, por lo tanto es de origen glandular. Constituye el 80% de la hipófisis y se compone de 3 partes: La parte distal (glandular), la parte intermedia ó lóbulo intermedio y la parte tubular. Su porción más grande es el lóbulo anterior que rodea el lóbulo posterior ventralmente y lateralmente y se compone de varios tipos de células productoras de hormonas (hormona luteinizante LH, hormona adrenocorticotrópica ACTH y hormona del crecimiento GH, entre otras). El lóbulo anterior se conecta a la capa externa de la eminencia media (EM) por pequeños vasos portales que corren a lo largo del tallo. Estas vasos conducen las sustancias al lóbulo anterior que son segregadas por axones de las células parvocelulares neurosecretoras terminando en la EM y que influyen la liberación de hormonas del lóbulo anterior (Dubois, 1995).

La *neurohipófisis*, que proviene desde el *neuroectodermo* del piso del encéfalo anterior, del tejido diencefálico y consiste en un lóbulo posterior y axones del tallo hipofisiario que son simplemente la continuación de axones en la capa interna de la eminencia media (EM) (Dubois, 1995). La neurohipófisis está compuesta por el infundíbulo, un crecimiento cónico del tubérculo cinereo, una porción cilíndrica llamada tallo hipofisiario y el lóbulo posterior o neural. La neurohipófisis representa sólo una porción de una unidad compleja que comienza con los núcleos pareados supraóptico y paraventricular, ya que ellos forman el tracto hipotálamo-hipofisiario (North, 1993). Axones de ambos núcleos muestran dilataciones a lo largo de su trayecto (*Cuerpos de Herring*) y terminan en expansiones terminales, los espacios perivasculares terminales en el lóbulo neural son el sitio de la neurosecreción (Scheithauer, 1992).

El lóbulo posterior tiene abundantes fibras nerviosas no mielinizadas, células de la neuroglía (pituicitos) y tejido conjuntivo que sostiene a los capilares fenestrados. Dos hormonas, la oxitocina (OX) y la vasopresina (VP) son almacenadas y liberadas desde la parte nerviosa (Gude, 1982). El lóbulo posterior además contiene numerosos pituicitos (células gliales) y una rica vasculatura fenestrada. La inervación adicional de la hipófisis posterior incluyen axones que contienen ácido δ -aminobutírico (GABA), dopamina, noradrenalina y encefalinas, todas las cuales modulan la secreción de VP y OX (Armstrong, 1985).

El lóbulo intermedio se separa del lóbulo anterior por una hendidura recubierta por un epitelio cuboidal. Las células en este lóbulo tienen núcleos ovalados intensamente teñidos y un citoplasma basofílico claro. La hormona elaborada por este lóbulo es la Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH) (Gude, 1982).

Por sus características anatómicas la *vasculatura* de la hipófisis posterior es única. Ésta consiste en vasos fenestrados rodeados por la lámina basal y pericitos, así como también un espacio perivascular, a la vez rodeado por una lámina basal abluminal. La importancia fisiológica del espacio extracelular es incierta. Este espacio contiene un pequeño número de macrófagos, fibroblastos y ocasionalmente células cebadas (Scheithauer, 1992).

La Adenohipófisis.

Histológicamente, según el tipo de afinidad por el colorante existen tres de tipos de células que pueden identificarse:

1. Las *acidófilas*: contienen núcleos redondos pequeños y el citoplasma eosinofílico que se caracterizan por elaborar la hormona del crecimiento (GH) y por producir hormonas lactogénicas,
2. Células *cromóforas* agranulares: cuyo citoplasma no se tiñe y pueden ser células madre,
3. Las *basófilas* pueden dividirse en dos clases: las *beta basófilas*, cuyos gránulos son aldehído-fucsina positivos y segregan hormona tirotrófica, y las *delta basófilas*, cuyos gránulos son aldehído-fucsina negativos pero se tiñen positivas con el ácido peryódico de Schiff (PAS) de color rojo y producen gonadotrofinas, la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Gude, 1982).

Actualmente por medio de técnicas inmunohistoquímicas se sabe que la adenohipófisis está formada por 5 tipos celulares distintos (Lloyd, 1996):

1. Células *somatotrofas*. que producen la hormona del crecimiento (GH= growth hormone),
2. Células *lactotrofas*, que producen la prolactina,
3. Células *corticotrofas*, que producen la hormona adrenocorticotrofa (ACTH) que es un péptido de 39 a.a. de una sola cadena derivado de su precursor la molécula de POMC (pro-opio-melano-cortina). lipocortina y endorfinas. Representan aproximadamente el 10% de la población celular. Son de tamaño medio, ovoides, polihédricas o angulares, con un núcleo ovoide o esférico, basofílicas y PAS positivas, presentan grandes

vacuolas nucleares llamadas *cuerpos enigmáticos*, que ultraestructuralmente corresponden a los *fagolisosomas*. Ultraestructuralmente presentan un citoplasma bien desarrollado, denso con numerosos gránulos esféricos irregulares con un tamaño de 250 a 750 nm de diámetro, los cuales frecuentemente se alinean a lo largo de la membrana celular, un núcleo con un nucleólo prominente frecuentemente unido a la membrana nuclear. El RER tiene cisternas ligeramente dilatadas, con numerosos ribosomas libres, el complejo de Golgi tiene cisternas esféricas o aplanadas. Las mitocondrias son esféricas u ovoides con matriz moderadamente electro-densa. Los lisosomas son grandes y electrolúcidos. Una característica estructural de éstas células es la presencia de *filamentos de citoqueratina tipo I* en el citoplasma, localizándose en la región perinuclear cuando son estimuladas. (Horvath, 1988),

4. Células *tirotrofas*, que producen la hormona estimulante de la tiroides.

5. Células *gonadotrofas*, que producen hormona folículo estimulante y luteinizante.

La Neurohipófisis.

Los pituicitos tienen una derivación astrocítica porque son capaces de la formación de las *Fibras de Rosenthal* y demuestran inmunoreactividad para la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (Scheithauer, 1992).

Se reconocen cinco formas principales de pituicitos:

1. Pituicitos *principales*: son como astrocitos, células de contorno irregular que poseen procesos largos, tienen núcleos irregulares con inclusiones nucleares llamadas *esferidia*. Los pituicitos tienen un citoplasma hipodenso rico en membranas de Golgi con relativamente poco retículo endoplásmico rugoso. El citoplasma contiene los filamentos intermedios (filamentos gliales), fibras de Rosenthal escasas, algunos microfilamentos, microtúbulos, lisosomas y gotitas de lípidos; algunos desmosomas intercelulares se han visto entre los pituicitos,

2. Pituicitos *oscuros*: son electrodensos y demuestran una relación citoplasma-núcleo aumentada, pero de otra manera parecidos a los pituicitos principales,

3. Pituicitos *oncocíticos*: Ellos poseen un número aumentado de mitocondrias, frecuentemente con morfología anormal, en relación con otros organelos. Pueden verse *crystaloides* mitocondriales,

4. Pituicitos *granulosos*: contienen lisosomas abundantes, algunos pareciendo simple lipofuscina y otros cuerpos mielinoideos y gotitas de lípido. Tienen fosfatasa ácida. Se ha sugerido que los pituicitos granulosos surgen por micro pinocitosis, mediada por la fagocitosis. Finalmente, los pituicitos granulosos pueden representar el componente celular de tumores granulosos de células de la neurohipófisis conocidos como "*coristomas*",

5. Pituicitos del *epéndimo*: son infrecuentes. Hay células endimarias que revisten el sistema ventricular, ellas poseen cilios y microvellosidades, particularmente cuando se agrupan, se diferencian formando luces extracelulares y exhiben una especie de listón, como complejos de unión (Scheithauer, 1992).

LA GLANDULA ADRENAL.

Embriológicamente la adrenal se compone de dos partes diferentes, la corteza y la médula, la corteza es de origen mesodérmico, la médula se origina desde la cresta neural, por lo que es de origen ectodérmico (Beamer, 1983).

La corteza de adrenal proviene del pliegue urogenital. A partir del mesotelio celómico primitivo las células cercanas al polo anterior del mesonefros proliferan y penetran al mesénquima para formar el primordio de la corteza adrenal en el día 13 de la gestación en el ratón. La corteza adrenal crece rápidamente entre los días 16 y 20 de gestación, cuando el ACTH aparece en la hipófisis fetal. El crecimiento rápido se asocia con aumento en el número de mitocondrias, gotitas de lípido y vesículas citoplásmicas (Hamlin MH, 1990). El período de gestación en la rata es de 20-22 días y en el ratón es 19-21 días. Existen células ectodérmicas desde la cresta neural que comprende la inervación simpatomedular comienzan la migración en el rudimento cortical sobre el día 16 de gestación para formar la médula. Éstas dan origen a células simpáticas del ganglio y feocromoblastos, para posteriormente diferenciarse en células cromafines. Las etapas finales de maduración ocurren al comenzar la inervación esplénica después de la primera semana postnatal (Hamlin, 1990).

Anatómicamente en los ratones, las glándulas adrenales son órganos pequeños, pares, en forma de óvalo, de color rosado claro, laterales a la aorta en la grasa retroperitoneal, ubicadas adyacentes al polo anterior-medial de cada riñón. Miden aproximadamente 1 mm en su dimensión más grande. La corteza comprende aproximadamente el 90% de la glándula, por peso (Beamer, 1983).

Se ha observado que las siguientes variables afectan el peso de la adrenal:

- *lateralidad*, la adrenal izquierda es típicamente más pesada que la derecha;
- *el sexo*, las adrenales de las hembras son más grandes que las de los machos de la misma edad
- *la cepa*, los ratones C57BL/10 tienen adrenales significativamente menores que las de otras cepas, ratones de madres BALB/c tuvieron adrenales más grandes que las crías híbridas. En el BALB/c ratones machos con un peso corporal de 25-75 g, tuvieron un peso adrenal de 0.0069 g para la derecha y 0.0082 g para la izquierda (Meckler, 1965).

La irrigación que abastece a las glándulas adrenales es parecida a la del sistema portal hipotalámico-hipofisiario. La adrenal izquierda es abastecida por la arteria adrenal craneal, una rama aórtica y la adrenal derecha es irrigada por la arteria adrenal caudal. Las arterias también penetran a la médula para formar capilares, de forma que ésta tiene un abastecimiento dual de sangre, ésta es colectada en un seno venoso central, formando una única vena que se vacía en la vena cava abdominal (Hamlin, 1990).

Histológicamente la adrenal posee una cápsula de tejido conjuntivo fibroso rodeándola. Se divide en corteza y médula. En la mayoría de los mamíferos la división cortical puede ser subdividida en tres zonas de células epiteliales, pero en los ratones sólo dos zonas se han visto claramente. La *zona glomerular* subcapsular consiste en células pequeñas con grandes núcleos arregladas en forma de arcos, con capilares entre las células. Abajo de la zona glomerular está la amplia *zona fascicular*, que

consiste en columnas de células separadas por el tejido conjuntivo. Estas células son grandes con núcleos vesiculosos y contienen material lipídico, que se elimina con el proceso histológico de rutina de inclusión en parafina (Gude, 1982).

Con frecuencia en el ratón hay varios hallazgos como son: adrenales accesorias, parciales o completas, que son muy comunes en la cápsula del tejido conjuntivo (Percy, 1993).

Los zona reticular identificada en la mayoría de los mamíferos se ha visto raramente en el ratón. (Gude, 1982). La zona reticular de la corteza **no** es discernible de la zona fascicular (Percy, 1993). Sin embargo, una zona entre la corteza y la médula se identifica como *zona X* en machos y hembras antes de la madurez sexual (Gude, 1982). La zona X de la corteza, rodea la médula. La zona X se compone de células basofílicas y aparece en ratones aproximadamente a los 10 días de edad (Percy, 1993). La zona desaparece en machos sexualmente maduros y con la primera preñez en las hembras. Se ha observado que persiste en hembras vírgenes por diferentes períodos de tiempo y en machos castrados (Gude, 1982). Durante su involución, la zona X experimenta marcada vacuolización en las hembras pero no en los machos. Los células residuales acumulan *ceroide*. En ratones viejos de ciertas cepas (BALB/c) células grandes espumosas con pigmento marrón forman una zona cortical adyacente a la médula. El pigmento es parecido al *ceroide* en el ovario y se refiere como "*degeneración marrón ó café*". En algunas cepas el cambio es más pronunciado (Gude, 1982, Percy, 1993). La enzima 20- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa puede estar involucrada en la zona X (Beamer, 1983).

Esparcido entre las células corticales están los fibroblastos así como células que contienen vitamina A en cantidades substanciales. Éstas células almacenadoras de vitamina A pueden tener un papel en los procesos oxidativos (Beamer, 1983).

Los grupos de células polihédricas que producen *adrenalina* o epinefrina y *noradrenalina* o norepinefrina son los que forman a la médula. Ambos tipos celulares tienen una afinidad por el bicromato de potasio y los gránulos citoplásmicos que contiene las hormonas se tornan marrones después del tratamiento con este químico (reacción cromafín) (Gude, 1982). El término cromafín se refiere a la oxidación de las catecolaminas por la solución de cromato, que les imparte un color rojo-marrón a los gránulos secretorios (Hamlin, 1990).

En la rata adulta aproximadamente 74% de las células medulares (cromafines) producen E=epinefrina (termino usado en USA) o *adrenalina* (término usado en Europa) y 26% producen NE= norepinefrina (*noradrenalina*). Estas dos aminas adrenérgicas naturales comparten el mismo tipo de receptores, llamados *adrenoreceptores*. En general epinefrina se refiere a la *hormona* mientras que norepinefrina se refiere al *neurotransmisor* (García-Sainz, 1995). Las células que contienen NE tiende a estar adyacentes a las arterias medulares, mientras que las células de E están adyacentes a los capilares que irrigan la corteza adrenal. Ultraestructuralmente, el diámetro promedio de los gránulos de E es de 153 nm y el de los gránulos de NE es 135 nm. Ambos tipos de gránulos están limitados por una membrana, pero los gránulos de E comúnmente tienen un material granular electrodensito separado desde la membrana externa por una aureola estrecha, mientras que los gránulos de NE tienen un material

homogéneo (no granular), muy electrodensos que están frecuentemente ubicados asimétricamente dentro de la membrana limitante (Hamlin, 1990).

Una tercera célula aparentemente de linaje cromafín, la *célula pequeña granulada* está también presente en la médula. Estas células son del mismo tamaño que las células cromafines típicas pero tienen gránulos menores y vesículas de tipo sináptico como en las neuronas. A veces son referidas como pequeñas células intensamente fluorescentes (Hamlin, 1990).

La glándula adrenal retiene la capacidad presente en el feto, para apoyar la hematopoyésis en respuesta a una infección crónica, neoplasia o anemia. La hematopoyésis extramedular debe distinguirse de infiltrados inflamatorios o de leucemia (Hamlin, 1990).

La corteza adrenal produce más de 30 hormonas esteroideas, pero sólo unas cuantas se segregan en cantidades fisiológicas. Estas son esenciales para la vida. Las células de la zona glomerular segregan *mineralocorticoides* que regulan el balance del agua y electrolitos. La secreción de *aldosterona*, el mineralocorticoide principal, es regulada por el nivel sérico del ión potasio, el sistema *renina-angiotensina* y temporalmente por niveles altos de ACTH (Hamlin, 1990).

De los *glucocorticoides*, principalmente *corticosterona*, se secretan primariamente por células de la zona reticular y fascicular con respecto al ACTH desde la hipófisis. Una secreción aumentada de ACTH ocasiona la *hipertrofia* y con niveles disminuidos de ACTH, la corteza llega a ser *atrófica* (Hamlin, 1990).

La médula adrenal es un ganglio del sistema simpático que se modifica para ser un órgano neuroendócrino. Sus productos no son esenciales para la vida pero son importantes para la respuesta al estrés o crisis. La función de estas células es regulada por señales neurogénicas así como también hormonales. La médula es inervada por terminaciones nerviosas simpáticas colinérgicas preganglionares las que hacen sinapsis sobre células cromafines y que estimulan la secreción y síntesis hormonal (Hamlin, 1990).

Por otro lado el papel de la adrenal como un efector en la inmunomodulación necesita ser reconsiderado y merece gran atención, ya que existe la evidencia creciente para una interacción inmune-adrenal en donde los macrófagos pueden jugar un papel importante (Anónimo, Scientific American, 1997). Se ha investigado la densidad, distribución y fenotipo de los macrófagos humanos en la adrenal usando anticuerpos monoclonales. Los macrófagos se localizan en todas las zonas de la glándula. Estas células exponen el fenotipo del compartimiento macrofágico fagocítico (CD11C+, KiM8+) y a nivel ultraestructural, los macrófagos están frecuentemente adheridos a la pared endotelial, pero también residen en contacto directo con células corticales y cromafines. Esto sugiere un posible papel de los macrófagos en el eje local inmune-neuroendócrino (González-Hernández, 1994).

Adaptaciones Celulares en la Adrenal:

1. Hipertrofia: es un aumento en el tamaño de la célula. El citoplasma y el núcleo aumentan de tamaño (Milikowski,1997). Puede ser bilateral y difusa o focal. Es ocasionada comúnmente por la secreción aumentada de ACTH. Cuando se llegan a observar focos formados por un grupo de células corticales dentro de la zona glomerular o fascicular en donde la compresión no se presenta, se llama *hipertrofia focal*. El citoplasma de las células afectadas es comúnmente eosinofílico y finamente granular con o sin las vacuolas claras de lípidos. Cuando el agrandamiento celular es causado principalmente por la acumulación de vacuolas de lípido, se diagnostica como *vacuolización* (cambio graso) y no hipertrofia (Hamlin, 1990).

2. Hiperplasia: es un aumento en el número de células (Milikowski,1997). Puede ser bilateral y difuso o focal. La *hiperplasia difusa bilateral* es acompañada por aumento en el tamaño total de la adrenal, espesor y peso de la corteza. Con la estimulación prolongada la adrenal puede llegar a ser *nodular*. Las vacuolas de lípido se pueden acumular dentro de células corticales hiperplásicas y cuando es severo, debe distinguirse de la vacuolización difusa sin la hiperplasia. La *hiperplasia focal* comúnmente involucra primariamente la zona fascicular y en proporción menor, la reticular, los células de la zona glomerular pueden estar agrandadas. La hiperplasia focal puede ser solitaria o múltiple. Las lesiones tienen la forma de una media luna con la glomerular formando la base. Esto puede ocasionar compresión delgada del parénquima circunvecino. Las células mantienen un modelo arquitectónico normal con los cordones dentro de la fascicular en un orden perpendicular a la cápsula. Los células pueden ser menores y más basofílicas que las células corticales cercanas. La atipia celular está ausente. La vacuolización citoplásmica o el cambio graso frecuentemente está presente en la región interna del foco (Hamlin, 1990).

Ultraestructura: Las células de la glándula de adrenal son las células endócrinas especializadas para sintetizar y almacenar sustancias esteroideas con actividad hormonal. Sus características ultraestructurales incluyen abundante retículo endoplásmico liso, cantidad numerosa de gotitas de lípido y muchas mitocondrias con crestas tubulares y vesiculares en el citoplasma (Ito,1996).

En el ratón, las células de la zona fascicular muestran mitocondrias grandes esféricas, que ocupan sobre el 20% del volumen celular. El RER está bien desarrollado con grandes colecciones de cisternas lamelares lisas aplanadas, el RER corresponde al 27% del volumen celular. Las gotitas de lípido son abundantes y ocupan el 40% del volumen celular, ellas contienen ésteres de colesterol o colesterol. El aparato de Golgi es extenso. Las microvellosidades y cisternas revestidas se han visto en el espacio subendotelial e intercelular. Otros elementos ultraestructurales son los lisosomas y peroxisomas, microtúbulos y microfilamentos (Nussdorfer, 1978).

El valor de renovación de las células glandulares adrenales cambia con el envejecimiento y puede estar sometido a la actividad glandular total (Ito,1996). Las enzimas de la síntesis de esteroideas se ubican en el RER y en la mitocondria (Nussdorfer, 1978).

Por otro lado, con respecto a las técnicas de medición es importante conocer que la **morfometria** implica el uso de datos cuantitativos en la descripción de hallazgos

estructurales, dichos datos morfométricos pueden ser obtenidos por una variedad de procedimientos de medición, desempeñados sobre cualquier tipo de espécimen, como son fotografías, pero también pueden derivarse desde el análisis estereológico de secciones de tejido montadas en portaobjetos (Weibel, 1969). La **estereología** implica un análisis geométrico de estructuras y texturas, e incluye métodos que permiten la derivación directa de propiedades métricas de estructuras desde secciones bidimensionales en base a un razonamiento estadístico y geométrico, pero esto requiere el uso de metodología más compleja (Weibel, 1969).

EL SISTEMA RESPIRATORIO EN ROEDORES.

En el desarrollo fetal del pulmón en la rata, los glucocorticoides están implicados en el proceso de aceleración de la maduración, pues podrían inhibir la proliferación de las células alveolares tipo II, especialmente en la 3ra. semana postnatal (días 4-14), que es un período crítico durante el cual la subdivisión o alveolización debe ocurrir (Tschanz, 1995).

Anatómicamente, el ratón tiene un sólo lóbulo pulmonar izquierdo y cuatro lóbulos derechos, el anterior, el medio, el posterior y el accesorio (Gude, 1982). Histológicamente hay diferencias entre las diversas especies, que influyen en la función y en la reacción al daño, ya sea por variaciones en la lobulación, pleura, septos interlobulares y vías aéreas distales (Tyler, 1983). El epitelio respiratorio puede contener inclusiones secretorias eosinofílicas, las cuales pueden ser especialmente obvias en algunos cepas de ratones ej: C57BL. Las envolturas cartilaginosas están presentes únicamente en vías aéreas extrapulmonares. Los bronquiolos respiratorios son cortos o no existen. Los músculos cardíacos rodean las subdivisiones principales de venas pulmonares en la mayoría de los roedores y no se deben entender mal como una hipertrofia medial. El tejido linfóide asociado a bronquios está presente normalmente, sólo en el *hilio* del pulmón. Las acumulaciones linfoides se encuentran frecuentemente sobre la pleura visceral de ratones, dentro de las hendiduras septales. (Gude, 1982).

Datos Morfométricos y de Ventilación para el pulmón de ratón, (Foster, 1982):

Parámetro	Variable
peso pulmonar	0.20 g (ratón de 32 g)
volumen pulmonar	0.74 ml (ratón 20g)
capacidad vital	1.4 ml (ratón 20 g)
diámetro alveolar promedio	38.7 μ m
área de superficie alveolar	280-340 m^2 / ratón 100 g
media aritmética del grosor de la barrera hemtao-aerógena	1.25 μ m (ratón 20 g)
promedio del grosor de la barrera tisular	0.32 μ m (ratón 20 g)

ENDOCRINOLOGÍA Y RITMOS BIOLÓGICOS: LOS RITMOS CIRCADIANOS.

El término *circadiano* deriva del latín "circa y diem", que significa "alrededor del día". El uso del término ritmo circadiano significan todas las variaciones diurnas que recurren regularmente a la vez en un intervalo de aproximadamente 24 horas. En los mamíferos indica que los ritmos del comportamiento representan las manecillas de un reloj del sistema circadiano que subyace en la mayoría, si no; en casi todos los ritmos endócrinos (Turek, 1985).

Dichas variaciones presentan las siguientes características: Una oscilación está definida por su *período* (el intervalo de tiempo después de que la onda de oscilación recurre), por su *variación* (rango) (la diferencia entre los valores máximos y mínimos dentro de un período), y por su valor promedio (la media aritmética de todos los valores de la variable oscilante dentro de un de un período). La mitad de la variación de oscilación se llama la *amplitud*. Cada estado instantáneo de una oscilación representa una *fase*. Los puntos de referencia de la fase que se usan usualmente incluyen la oportunidad máxima adecuada, frecuentemente referida como *acrofase*, y la oportunidad mínima adecuada, frecuentemente referida como el *nadir* (Turek, 1985).

La sincronización externa es de importancia obvia para la supervivencia de las especies y asegura que el organismo haga la cosa correcta en el momento correcto. El sistema circadiano provee un reloj interno de organización temporal. El sistema circadiano juega un papel fundamental en la expresión de otros ritmos biológicos con períodos que son más cortos (*ultradiano*) que 24 hrs, tal como la liberación hormonal pulsátil, y más larga (*infradiano*) que 24 hrs (Touitou, 1994).

La Organización del Sistema Circadiano Mamífero.

El ritmo circadiano de 24 hrs en mamíferos está bajo el control del marcapaso circadiano maestro, ubicado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. Este núcleo contiene neuroquímicos, incluyendo péptidos, aminas y aminoácidos. La distribución heterogénea de estos neuroquímicos define las subestructuras del NSQ. En particular, la hipótesis que el NSQ dorsomedial está involucrado en *mantener* el ritmo circadiano, mientras el NSQ ventrolateral está comprometido en *ajustar* la fase del ritmo, es algo que está en discusión (Inouye, 1994).

Bajo un ritmo circadiano libre de 24 hrs en la ausencia de cualquier señalización en el medio ambiente externo y condiciones sin entrenamiento, la destrucción del SNC en una amplia variedad de especies mamíferas, conduce a la abolición o la interrupción severa de muchos ritmos del comportamiento fisiológico incluyendo los del cortisol, melatonina pineal y secreción de hormona del crecimiento (Meijer 1989, Turek, 1985).

Los Ritmos Circadianos Humanos.

La secreción de algunas hormonas es modulada primariamente por la periodicidad del ritmo circadiano (por ej. cortisol, melatonina), mientras otros parecen ser estrictamente dependientes del sueño (por ej. prolactina, GW). La periodicidad de secreción del cortisol era considerada como un ritmo circadiano "puro", pero luego se demostró un efecto inhibitor de las primeras pocas horas de sueño (Turek, 1985).

Ritmos Ultradianos: El término ultradiano se refiere a la gama entera de períodos más cortos que el circadiano que oscila, de 20 a 28 h. Actualmente, el término *ultradiano* se usa primariamente para designar las ritmicidades con períodos que tocan desde fracciones de horas a varias horas (Turek, 1985).

INTERACCIONES INMUNO-NEUROENDOCRINAS.

Los tres sistemas más importantes involucrados en mantener la homeostasis son: el nervioso, el endócrino y el inmune. Los sistemas endócrino y nervioso están claramente unidos a través del descubrimiento de la *neurosecreción* y bajo la aceptación general de que la mayoría de las funciones endócrinas están reguladas por la secreción de las hormonas hipotalámicas hipofisiarias a través de un efecto de retroalimentación. (Reichlin, 1995; Savino, 1995; Steinman, 1993). Las interacciones que existen entre estos sistemas fueron puestas en evidencia por trabajos pioneros como lo fueron los realizados por Hugo Besedovsky en 1977. Actualmente se ha acuñado el término *neuroendocrinoinmunología* que se refiere a que el sistema neuroendócrino puede regular o modular las células del sistema inmune y estos cambios funcionales pueden a su vez influir en la función cerebral y la actividad endócrina (Azad, 1991).

Relaciones Anatómicas.

1. Por la inervación directa de órganos linfoides y elaboración de neurotransmisores:

En el sistema nervioso autónomo la *noradrenalina* es el neurotransmisor postganglionar asociado a las fibras, ya que regula el flujo sanguíneo tanto de órganos linfoides primarios (médula ósea y timo), como secundarios (bazo, ganglios linfáticos, placas de Peyer, tonsilas, etc.). También existen una gran cantidad de neuropéptidos con propiedades inmunomoduladoras, por ej. el VIP (péptido intestinal vasoactivo) y sustancia P (Ottaway, 1992).

2. La modulación del eje hipotálamico-hipofisiario se da por medio de hormonas tales como: CRH, POMC y ACTH.

Esto en conjunto llega a influir la migración linfocitaria a nivel macro y microscópico, lográndose una redistribución, localización y migración de las diferentes subpoblaciones de linfocitos a través de vías neuropsicológicas y neuroendócrinas (Ottaway, 1992).

El SNC es modulado por la respuesta inmune ya que:

1. Se ha observado un aumento en la descarga de neuronas hipotálamicas durante la respuesta inmune,
2. Se ha visto un cambio en los niveles de neurotransmisores del encéfalo durante la respuesta inmune,
3. Hay un aumento en la corticosterona plasmática durante la respuesta inmune,
4. La IL-1 aumenta la producción de ACTH,

5. La IL-1 es un pirógeno endógeno (Roszman, 1988).

En modelos murinos de *esclerosis múltiple* y *encefalitis autoinmune experimental* (EAE) se ha estudiado el papel que juegan los ganglios linfáticos regionales en la autoinmunidad mediada por células T, ya que se ha establecido que en ciertas especies, sobretodo roedores, existe un drenaje linfático del encéfalo; el fluido y los antígenos llegan a drenar a lo largo de espacios perivasculares poblado por células perivasculares inmunocompetentes. Las vías de drenaje conectan directamente por medio del plano cribiforme nasal a los linfáticos y ganglios cervicales. Los antígenos solubles que drenan desde el encéfalo inducen producción de anticuerpo en los ganglios linfáticos cervicales. Al usar un modelo de lesión por frío, la remoción de los ganglios linfáticos cervicales reduce significativamente el aumento de EAE. Estos hallazgos sugieren el drenaje de antígenos desde el encéfalo a los ganglios linfáticos cervicales, en la presencia de linfocitos activados en las meninges o en el SNC, resultando en una segunda ola de linfocitos en contra del encéfalo. Los linfocitos T que infiltran el SNC se activan recientemente por los linfocitos de memoria que expresan en gran cantidad CD44, LFA-1 e ICAM-1 y expresan en baja cantidad CD45RB en el ratón (Weller, 1996).

Factores de Regulación.

La regulación inmune está mediada por factores endócrinos, parácrinos y autócrinos. Los *factores endócrinos* son las citocinas secretadas por células inmunocompetentes que influyen en la proliferación y activación, los *factores parácrinos* que son los que activan a las células por contacto directo y factores de control *autócrino* son los mediados por la secreción de citocinas por las células activadas así mismas (Reichlin, 1995).

Los ligandos y receptores compartidos se usan como un idioma químico común para la comunicación dentro de y entre los sistemas inmunes y neuroendócrinos. Tal comunicación sugiere un papel *inmunoregulador* para el encéfalo y una función *sensitiva* para el sistema inmune (a, Blalock, 1994).

Comunicación Celular.

La comunicación entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune es posible porque ellos comparten los ligandos y receptores que anteriormente se pensaba que eran específicos de cada sistema (b, Blalock, 1994). Utilizan mensajeros solubles para comunicarse entre los diversos componentes celulares y los mediadores humorales funcionan como amplificadores biológicos de las señales débiles y así contribuyen a la respuesta total del sistema (Roszman, 1988). Comparten su información en una corriente *bidireccional* de citocinas, esteroides y neuropéptidos (Watkins, 1994).

Se ha demostrado que los leucocitos poseen *receptores para catecolaminas*, así como también para el neuropéptido Y. Con esto se ha visto que la regulación simpática puede subyacer en algunas de las anomalías inmunológicas observadas en el estrés crónico, la depresión clínica y el envejecimiento (Friedman, 1997). También se

ha demostrado la presencia de *receptores adrenérgicos alfa y beta* sobre tipos diferentes de células inmunocompetentes, pues la exposición de linfocitos y macrófagos a agonistas adrenérgicos *in vitro*, modula sus funciones (Hori, 1995)

En el bazo el nervio simpático esplénico puede constituir un canal de comunicación que media la modulación central de la inmunidad celular periférica, aunque los papeles y los mecanismos del control parasimpático de los órganos linfoides todavía permanecen oscuros, los datos recientes sugieren que las vías aferentes del nervio vago tímico, pueden estar involucradas en la modulación central de la inmunidad (Hori, 1995). En el timo de rata, la cápsula tímica, región subcapsular y los septos de tejido conjuntivo son inervados por las terminales varicosas noradrenérgicas de axones inmuno teñidos con hidroxilasas de tirosina y dopamina. El estudio neuroquímica dá a conocer que las terminales nerviosas son capaces de retomar, almacenar y liberar *noradrenalina* en una forma dependiente de Ca^{2+} (Vizi, 1995).

Neuropéptidos.

Los neurotransmisores, neuropéptidos, neurotrofinas y hormonas neuroendócrinas han tenido tradicionalmente funciones en la homeostásis y desarrollo normal de las redes neuronales; mientras que las citocinas y las moléculas de adhesión tienen funciones dentro del sistema inmune periférico (Blalock, 1992; Merrill, 1995). Las hormonas y los neuropéptidos en células eucarióticas, se sintetizan como moléculas grandes precursoras en el retículo endoplásmico rugoso (RER), desde donde son translocadas al aparato de Golgi. La clasificación de proteínas destinada a la vía secretoria es regulada desde la red trans-Golgi (TGN). En ambas vías, las vesículas necesitan ser transportadas a la membrana plasmática antes de sus contenidos para ser liberados por exocitosis. Los hormonas y los neuropéptidos necesitan ser segregados desde las células en que se sintetizan para ejercer sus acciones biológicas, aunque también pueden tener acciones parácrinas y autócrinas. Las prohormonas y proneuropéptidos debe experimentar modificaciones transcripcionales que ocurren en determinados compartimientos subcelulares dentro de las células eucarióticas y se efectúan en una sucesión estricta de sucesos intracelulares, que dan origen a los productos biológicamente activos (Blalock 1992, Perone, 1997).

Los cuatro sistemas principales de neuropéptidos son: encefalina, dimorfina, taquicinina y neurotensina. Diversos estudios funcionales y neuroanatómicos han enfatizando las interacciones reguladoras entre neurotransmisores y neuropéptidos a nivel de expresión genética de neuropéptidos. Los sistemas de neuropéptidos están involucrados en la regulación y ejecución de *programas motores* y también en el control del estado de ánimo y afectan también a la personalidad; su administración modifica al comportamiento y lo sensibiliza, especialmente por medio del núcleo accumbens y sus conexiones recíprocas con el encéfalo medio, el hipocampo y la corteza frontal. Los glucocorticoides modulan el estado de ánimo, así como también la personalidad (Angulo, 1994).

Los mecanismos que controlan la expresión específica en la célula de los genes de neuropéptidos en el hipotálamo son complejos e involucran *elementos reguladores* múltiples que pueden radicar dentro del gen o muchas kilobases lejos del *promotor*. Estos elementos actúan positiva y negativamente en células diferentes para mejorar o restringir la expresión, y pueden incluir sucesiones que se escuden en influencias reguladoras de otros genes cerca del punto de inserción cromosomal (Waschek, 1995).

En estudios *in vitro* y más recientemente, *in vivo* se ha examinado como la taquicinina (takicinin=TK) regula las respuestas inmunes celulares. La TK estimula la proliferación de células T, mejora la capacidad mitogénica, induce la liberación de citocinas incluyendo el IFN-gamma, el TNF-alfa, la IL-1 e IL-6 desde los macrófagos y células mononucleares, mejora la secreción de inmunoglobulinas y afecta la fagocitosis y quimiotaxis celular. En estudios *in vivo* ha mostrado un papel en la recirculación de linfocitos de ganglios linfáticos de ovejas, la inversión de la involución tímica por estrés y producción de Ig, ambos en rata y ratón. Muchos de estos efectos parecen ser mediados por receptores de tipo NK-2 (Eglezos, 1991).

Citocinas.

Las citocinas actúan sobre el sistema nervioso central, produciendo diversas acciones como son: promoción del crecimiento, acción neuro-moduladora, instalación de la fiebre, sueño y disminución de la ingesta. Además, las citocinas, neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas participan en una relación intrincada para contribuir al desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del encéfalo. Las citocinas están también involucradas en las respuestas del encéfalo lesionado por trauma, infección o procesos neuro-degenerativos (Pousset, 1994).

Se ha visto que en la hipófisis, la *IL-1 beta* coexiste con la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en una subpoblación de células tirotrópicas, sugiere que pueden tener un papel como *factor parácrino* de la hipófisis. Las citocinas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6, IFN-gamma y el TNF, ejercen efectos profundos sobre el eje hipotálamo-hipofisiario. Se ha establecido la hipótesis de que el reemplazo de información al sistema neuroendócrino representa una función sensitiva para el sistema inmune en donde los leucocitos reconocen a los estímulos que no son reconocibles por los sistemas nerviosos centrales y periféricos (bacterias, neoplasias, virus como antígenos). El reconocimiento de tales estímulos no-cognitivos por las células inmunes se convierte entonces en la información y como consecuencia ocurre un cambio (Weigent, 1995).

Por otro lado en la corteza adrenal se identificó recientemente el *factor inductor del interferón-gamma* (FIIG) que es una citocina también llamada IL-1 gamma o interleucina-18 (IL-18). Su actividad biológica es pleiotrópica y ha mostrado que induce la producción de interferón-gamma en células Th1, aumenta la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (CSF) y disminuye la de IL-10 (Conti, 1997).

Hormona Liberadora de Corticotropina (CRF).

El factor liberador de corticotrofina (CRF) juega un papel principal coordinando las respuestas endócrinas, autonómicas, del comportamiento y de inmunidad al estrés mediante acciones en el encéfalo y en la periferia. Los receptores de CRF identificados en el encéfalo, hipófisis y bazo tienen características cinéticas y farmacológicas comparables. Se han observado diferencias, en la masa molecular del complejo del receptor de CRF entre el encéfalo (58,000 Da) y la hipófisis y bazo (75,000 Da), que parece deberse a la diferente *glicosilación* de las proteínas del receptor. El recientemente clonado receptor en la hipófisis y el encéfalo (designado como CRF1) codifica para una proteína de 415 amino-ácidos y está estructuralmente relacionado a la subfamilia de receptores acoplados a proteínas G (calcitonina/ péptido intestinal vasoactivo y la hormona liberadora de la hormona del crecimiento). Un segundo miembro de la familia de receptores de CRF codifica para una proteína del encéfalo de rata de 411 amino-ácidos con aproximadamente un 70% de homología al CRF1, se ha designado como CRF2. En estudios autorradiográficos, los receptores de CRF se localizaron en densidades más altas en los lóbulos anteriores e intermedios de la hipófisis, corteza cerebral, amígdala, cerebelo y en zonas de la pulpa roja del bazo. El CRF puede modular el número de sus receptores de manera recíproca. Por ejemplo, el estrés y la adrenalectomía aumentan la secreción hipotálmica de CRF que, a la vez, regula la disminución de receptores de CRF en la hipófisis anterior. Los receptores a CRF en el encéfalo y la hipófisis se alteran también a consecuencia del desarrollo y los procesos de envejecimiento (De-Souza, 1995).

En cuanto a la regulación se ha observado lo siguiente:

La corticosterona parece ser capaz de obrar recíprocamente con por lo menos dos mecanismos neuronales diferentes para regular los niveles de ARNm de CRH: uno se ha visto claramente en las *neuronas paraventriculares neurosecretoras*, los niveles plasmáticos crecientes del corticosteroide reducen los niveles de ARNm; el otro, se ha visto en *neuronas en el núcleo central de la amígdala*, en el cual actúa aumentando los niveles de ARNm (Watts, 1996).

En ratas se ha observado que, la inyección intracerebroventricular de *beta-endorfina* aumenta la actividad neuronal y la biosíntesis de CRF en el núcleo PV y estimula la secreción de ACTH por la secreción creciente de CRF. Este efecto sobre el NPV se midió, en parte, por medio del receptor de opioide (Wang, 1996).

Pro-Opiomelanocortina (POMC).

La pro-opiomelanocortina (POMC) es una molécula precursora del neuropéptido que es translocado vía secretoria dentro de las células neuroendócrinas. Es escindido por la acción de endopeptidasas y ya maduro origina a los péptidos como hormona adrenocorticotrófica (ACTH), beta-lipotrofina (beta-LPH) y beta-endorfina (Castro, 1997). Curiosamente, se ha descubierto que los linfocitos albergan un ARNm de la pro-opiomelanocortina (POMC), poseen dos copias que carecen del exón 1 y 2 pero

contienen o se separan por un exón 3. Las dos copias son reguladas por el CRF (Galin, 1991).

Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH).

La ACTH es un polipéptido de cadena lineal de 39 a.a. con un peso molecular alrededor de 4 500 KDa. Se produce en las células corticotrópicas por escisión proteolítica de una molécula precursora más grande. La *pro-opio-melanocortina*, el gen del POMC se localiza en el cromosoma 2 en el humano y consta de 3 exones. Otro producto de escisión es la *hormona β-lipotrópica* (LPH), que se segrega junto con la ACTH, la LPH puede ser descompuesta para producir la Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH) y la β-endorfina. El ACTH es almacenado en **gránulos** secretorios redondos, en forma de gota o de corazón que miden de 300 a 500 nm (Imura, 1995). Las células corticotrofas son estimuladas por CRH y la **función** de la ACTH es estimular a la corteza adrenal para que segregue glucocorticoides (cortisol, en los humanos o corticosterona, en roedores), además provoca que se secreten mineralocorticoides y esteroides sexuales (Lloyd, 1996).

La producción ectópica de CRH es capaz de inducir hiperplasia corticotrofa. En casos de exceso de sobreproducción de ACTH se ocasiona el *Síndrome de Cushing*. (Horvath, 1997). Las células productoras de ACTH responden al estrés liberando dicho factor, mientras que el mecanismo de *retroalimentación* por supresión *negativa* se dá a través de los niveles elevados de cortisol o *corticosterona* en los roedores, tiene un rápido efecto inhibitorio en la secreción de ACTH y las células corticotrofas inhibidas son fácilmente identificadas porque presentan una reacción única específica llamada "*Hialinización de Crooke*", que consiste en una acumulación progresiva, masiva, perinuclear en forma de anillo de filamentos de *citoqueratina tipo 1*. Este efecto parece ser reversible (Doniach, 1985). Por otro lado, se ha demostrado que las células adrenales y linfocitos tienen un mecanismo de captación de calcio dependiente del ACTH funcional (Clarke, 1994). En los humanos, existe un síndrome de *producción ectópica de ACTH*, que es producido por una gran variedad de neoplasias extrahipofisarias, incluyendo carcinoides bronquiales, carcinomas pulmonares, carcinoma de células del islote pancreático, carcinoma tiroideo medular, carcinoides tímico y adenocarcinoma ovárico (Lack, 1990).

ACTH Y MIF.

El factor de la inhibición de la migración de macrófagos (MIF) que se libera desde células inmunes que actúa "por encima" de los efectos supresivos de los esteroides sobre la producción de citocinas, indica que la función de MIF fisiológicamente es un mediador de contra-regulación que modula los efectos de los glucocorticoides sobre la inflamación e inmunidad, además de ser un componente crítico en la respuesta del huésped al choque séptico (Bernhagen, 1993). Se ha observado, que los glucocorticoides a concentraciones bajas, inducen más bien la inhibición de la producción de MIF desde monocitos/ macrófagos y células T. En estudios in vitro se estableció que CRH es un potente secretagogo de MIF, induciendo

su liberación a concentraciones más inferiores que las que se requirieron para la liberación de ACTH (Nishino, 1995).

En un estudio reciente, que provee la primera confirmación anatómica y morfológica que indica que el factor MIF ha sido redescubierto por ser un abundante componente *preformado* de la glándula anterior de la hipófisis y del macrófago ya que por la técnica de microscopía electrónica el ACTH segregado, comprendió dos subtipos celulares. Del *primer tipo* eran en la forma de un óvalo con pocos procesos, con gránulos secretorios que llenan el citoplasma entero. El *segundo tipo* de célula corticotrófica consistió en células pequeñas satélites con procesos y los gránulos secretorios se alinearon en una disposición en fila en contra de la membrana celular exterior. Ambos tipos de células contuvieron una abundancia de gránulos secretorios positivos a MIF. En forma interesante, se identificaron *tres tipos* distintos de *gránulos secretorios* dentro de cada tipo de célula: unos conteniendo MIF sólo y otros conteniendo ACTH sólo, y otros conteniendo ambos MIF y ACTH. Por otro lado, morfológicamente las células secretoras de *TSH* mostraron un bien desarrollado retículo endoplásmico y un gran número de gránulos secretorios pequeños que osciló en tamaño desde 150 a 200 nm en el diámetro. Como en el caso de células corticotróficas conteniendo MIF, se identificaron *tres de tipos de gránulos secretorios* dentro de éstas células: unos conteniendo el MIF sólo, otros conteniendo TSH solo y otros conteniendo ambos MIF y TSH. (Nishino, 1995).

Otras hormonas:

El papel de la *prolactina* como un inmunoregulador ha sido descubierto recientemente, ya que modula las funciones normales de los linfocitos, timocitos, esplenocitos y células NK, después de unirse a receptores específicos para PRL (Reichlin, 1995). Se ha visto que los linfocitos del timo y del bazo en ratas contienen receptores específicos para la *hormona liberadora de la hormona del crecimiento* (HLHC) que se acopla para respuestas biológicas importantes y permiten la comunicación bidireccional entre los tejidos inmunes y neuroendócrinos (Guarcello, 1991). También en los leucocitos de rata, el ARN de la HC y la proteína inmunoreactiva pudieron ser detectados in vivo, tanto en animales normales como en los estimulados por lipopolisacárido bacteriano y adjuvante completo de Freund, lo que apoya la idea de que la HC puede ser activada en una respuesta inmune (Baxter, 1991). Incluso los datos demuestran que leucocitos mononucleares de diversos tejidos, incluyendo el bazo, timo, médula ósea, placas de Peyer y sangre periférica, todos tienen la capacidad para producir el ARNm de la HC y segregar HC (Weigent, 1991).

REGULACION DEL EJE HHA DURANTE EL ESTRÉS.

Después de 100 años de investigación en el hombre y en los animales, el estrés psicológico se considera como un cofactor potencial en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, ya que es capaz de alterar la *susceptibilidad* de animales y hombre a los agentes infecciosos, influyendo en la *iniciación, curso y resultado* de estas infecciones (Biondi, 1997).

La activación por citocinas del eje HHA y la supresión inducida resultante de los glucocorticoides en las respuestas inmunes e inflamatorias representa un mecanismo importante por medio del cual la respuesta central al estrés modula la inflamación periférica. La interrupción de esta comunicación se asocia con exacerbación de la enfermedad inflamatoria (Sternberg, 1995).

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) es un sistema que ha sido modelado para el control neuroendócrino de las respuestas a agentes estresantes y esto se conoce desde el siglo pasado (Black, 1994). A pesar de esto, las vías por las cuales los agentes infecciosos actuaban recíprocamente con el eje HHA, permanecieron pobremente definidas. La evidencia surgió con los mediadores humorales liberados por las células inflamatorias (citocinas) ya que participan en la comunicación bidireccional entre el sitio de inflamación y el sistema nervioso central (Lilly, 1992).

Las citocinas estimulan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), aumentando los niveles circulantes de corticosteroides y de ACTH. Esto a la vez induce cambios metabólicos tales como: aumento en los substratos para la liberación de energía, cese de la actividad de células inmunes específicas y alteración en la liberación de los secretagogos importantes para ambos sistemas, inmune y neuroendócrino. Con aumentos agudos y niveles sostenidos de citocinas en la sangre, las terminales nerviosas en la *eminencia media*, particularmente las que contienen factor liberador de corticotrofina (CRF), representan un sitio importante de acción a estas señales inmunes. Consecutivamente, los cambios tienen lugar dentro del encéfalo en general y en particular en el *hipotálamo*, que incluyen la síntesis/ liberación de péptidos como CRF y vasopresina, y de neurotransmisores como catecolaminas y prostaglandinas y citocinas en sí mismos (Rivier, 1995).

La activación del eje HHA es el aspecto esencial de la respuesta sistémica al estrés y conduce finalmente al aumento en niveles circulantes de glucocorticoides, que son el aspecto fundamental para modular la respuesta del hospedero a la invasión al tejido e infección (b y c, Buckingham, 1996, Calandra, 1995). Un amplio conjunto de agentes estresantes inducen la liberación de ACTH de la hipófisis anterior, con la consiguiente estimulación y liberación por la corteza adrenal de glucocorticoides. El ACTH estimula la expresión genética in vivo e inhibe la proliferación celular adrenocortical. La unión de ACTH a su receptor acoplado a proteína G estimula la producción de AMPc y la activación de la vía de las proteín-cinasas (Watanabe, 1997).

Las respuestas neuroendócrinas e inmunes al estrés crónico por restricción puede diferir de los datos observados en el estrés agudo (Mekaouche, 1994).

El papel inmunoregulator de los neurotransmisores.

El estrés estimula la *secreción* de pro-opio-melanocortina (POMC) y sus péptidos derivados como son ACTH y beta-endorfina (extremo terminal beta) así como también prolactina (PRL) desde la adenohipófisis. La regulación de la secreción es compleja e incluye una variedad de neuropéptidos y neuroaminas. La *histamina* (HA) parece participar como un neurotransmisor en la regulación central de la secreción de la

adenohipófisis. Sin embargo, el efecto de la HA sobre la secreción de POMC y PRL es indirecta y puede involucrar la activación de neuronas hipotálamicas consecutivamente para que liberen factores que a su vez regulan la secreción hormonal como son AVP y OX (Kjaer, 1996).

Las neuronas centrales noradrenérgicas están involucradas en la respuesta y adaptación al estrés. (Stanford, 1995). La acetilcolina (ACh) y los neurotransmisores de monoamina que incluyen noradrenalina (NA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y dopamina (DA), tienen un papel inmunoregulator que comprende dos aspectos: la modulación de funciones inmunes por neurotransmisores y el efecto del sistema inmune sobre funciones nerviosas del sistema. La *inhibición* de la biosíntesis de ACh en el sistema nervioso central ocasiona el aumento en la respuesta inmune humoral en ratas a eritrocitos de ovejas; en contraste, la *inhibición* de la actividad de la enzima *acetilcolinesterasa* en el SNC resulta en la supresión de la respuesta inmune. Parece que la ACh en el encéfalo juega un papel inmunoinhibitorio. Su acción puede ser bloqueada por *atropina*, o un antagonista muscarínico, pero no por *hexametonio*, un antagonista nicotínico. El propósito de esta interacción es para mantener la homeostasis de las funciones fisiológicas e inmunes (Qiu, 1996).

El papel inmunoregulator de las citocinas:

Las citocinas son las glicoproteínas, con masas moleculares de 15,000-20,000 kDa, que son elaboradas por las células inmunes activadas por antígenos y son las responsables de orquestar las actividades celulares inmunes. Estos mediadores inflamatorios también afectan el funcionamiento del sistema neuroendócrino (a, Buckingham, 1994). Así, las interleucinas, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, el factor de necrosis tumoral-alfa y el interferón-gamma, afectan la secreción de las hormonas de hipófisis anterior e hipotálamico *in vitro* e *in vivo* y se han identificado en tejidos neuroendócrinos receptores específicos de alta afinidad para IL-1, IL-2, e IL-6. La producción de éstas citocinas en células neuroendócrinas es regulada por neuropéptidos, endotoxinas y otras citocinas (Spangelo, 1995).

Muchos de los efectos de las endotoxinas sobre la función de la hipófisis han sido atribuida a la capacidad de IL-1, TNF o IL-6 para promover la liberación de factores hipotálamicos tales como el CRH (c.- Buckingham, 1996). La IL-1 induce la liberación de corticosteroides en el plasma por estimulación de la liberación de ACTH y potenciación de la síntesis de proteínas de fase aguda. En el caso de los ratones adrenalectomizados se ha visto que son más sensibles a los efectos mortales del LPS (lipopolisacárido). En este respecto, el efecto protector de los corticosteroides sugiere que la inhibición de la actividad del sistema retículoendotelial podría ser importante en la modulación de la IL-1 y el TNF, porque pueden inducir choque hemodinámico (Bertini, 1988).

Las citocinas tienen una gran variedad de funciones endócrinas por ej. los *interferones*, inducen resistencia a la insulina y disminuyen la tolerancia a la glucosa, se asocian con disfunción tiroidea y puede estimular la secreción de ACTH y de cortisol.

Las acciones hormonales y metabólicas de las interleucinas se han demostrado en el metabolismo del hueso, aparato reproductor y fisiología tiroidea (Vassilopoulou, 1994).

Efectos de IL-1 en el eje HHA.

La interleucina-1 (IL-1) está constituida por IL-1 alfa, IL-1 beta e IL-1 antagonista del receptor (IL-1RA) (Paez-Pereda, 1995). La interleucina-1 beta (IL-1 β) es una citocina pleiotrópica que es un componente integral bidireccional de señalización entre los sistemas inmune y nervioso central. Se produce en el hipotálamo y se ha mostrado que *inhibe* el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y *activa* el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. La IL-1 β es *regulada* por la taquicinina, la sustancia P (SP), en el sistema nervioso periférico. Se ha observado, recientemente que algunos miembros hipotálamicos de la familia de la taquicinina incluyendo la SP y la neurocinina A (NKA) estimulan la secreción de la corticosterona en la adrenal. En ratas macho castradas la IL-1 β aumentó selectivamente a la NKA en la eminencia media y en el núcleo arcuato (Kalra, 1994).

Se han publicado muchos informes conflictivos acerca de la IL-1 y sobre el eje HHA. Unos han confirmado la observación de que la IL-1 estimula la producción de ACTH en la hipófisis. Otros han fracasado para demostrar esto, pero han encontrado que la IL-1 estimula la liberación hipotalámica de CRF, que a la vez estimula a la hipófisis para que libere ACTH. Las diferencias entre los sistemas de las preparaciones de IL-1 hacen difícil interpretar estos resultados negativos. La IL-1 probablemente actúe sobre ambos tipos de células y quizá uno es más importante biológicamente. Sin embargo, todos los resultados son uniformes en que IL-1 es capaz de activar el eje HHA (Kalra, 1994).

Los lipopolisacáridos (LPS) involucran la liberación de interleucina 1 (IL-1) y otras citocinas, que a su vez estimulan al eje HHA. Se vió que la administración de endotoxina e IL-1 disminuyen la afinidad del receptor a mineralocorticoide (tipo I) hipocámpico en paralelo a la activación del HHA, lo que contribuye a la estimulación de la secreción de corticosterona por las adrenales durante la infección (Schobitz, 1994). La IL-1 en el sistema hipocámpico juega un papel importante en la coordinación de respuestas neuroendócrinas, autonómicas y del comportamiento después de un desafío inmune (infección) o estrés (Linthorst, 1997; Takao, 1995).

La interleucina-1 (IL-1) está involucrada en las respuestas al estrés, incluyendo la inmunosupresión. En el caso del opioide péptido beta-endorfina (SER) se sintetiza y es segregado por las células del sistema inmune y se ha demostrado que participa en la modulación de las respuestas inmunes. Se demostró que la hipofisectomía y el tratamiento con indometacina no modifica el efecto de IL-1, sin embargo un aumento en el SER, parece *depende*r de la activación de CRH, catecolaminas y serotonina, pero parece ser *independiente* de la activación del eje HHA y de las prostaglandinas (Sacerdote, 1994).

La síntesis de IL-1 beta se estimula en timo y bazo con el desarrollo de artritis inducida por adjuvante (estrés inflamatoria crónico). En ratas artríticas

adrenalectomizadas hubo un fracaso para observar niveles elevados de IL-1 beta en el tejido por la ausencia de corticosteroides circulantes (Jessop, 1993).

Para demostrar el papel de la IL-1 en la enfermedad, se han usado una gran variedad de modalidades para bloquear su producción y/o actividad, esto incluye el uso de agentes que inhiben o reducen:

- 1) su transcripción y/o síntesis,
- 2) el procesamiento de pro-IL-1 beta en sus formas maduras,
- 3) la secreción de IL-1 beta,
- 4) neutralizando su actividad usando anticuerpos anti-IL-1,
- 5) receptores solubles (extracelulares),
- 6) bloqueo del receptor,
- 7) usando agentes que inhiben la expresión de receptor y por lo tanto la disponibilidad de los receptores de superficie,
- 8) los agentes que afectan la señal de traducción mediada por IL-1, (Dinarello-CA, 1994).

La ventaja terapéutica de reducir la actividad de IL-1 radica en prevenir sus efectos biológicos deletéreos, sin involucrar la homeostasis y defensa en el hospedero. Por ejemplo, bloqueando las prostaglandinas inducidas por IL-1, es el blanco a tratar en enfermedades inflamatorias ya que las drogas que inhiben la ciclooxigenasa tienen toxicidades bien conocidas porque bloquean la síntesis fisiológica normal de prostaglandinas en muchos tejidos, como plaquetas y epitelio gástrico. En cambio bloqueando a la IL-1, se reduce únicamente la porción de la síntesis de prostaglandina debido a IL-1 elevada, dejando la síntesis de prostaglandinas necesarias para la homeostasis fisiológica. Un caso similar puede hacerse para el óxido nítrico endógeno (Dinarello, 1994).

El papel del CRH.

El péptido clave en la respuesta al estrés, es el *CRF hipotálmico*, aunque también están las fuentes extra-hipotálamicas, tales como las células del sistema inmune, que juegan un papel importante en la regulación periférica de la respuesta al estrés (Puri, 1994). El CRH central tiene acción inmunosupresiva, se ha demostrado que el CRH actúa en el encéfalo para reducir la respuesta a anticuerpos específicos in vivo (Irwin, 1993). El CRH modula el sistema de IL-1 en los monocitos; se ha visto que esto depende del estado de activación de dicha célula, CRH ejerce un control inhibitorio sobre la célula activada y una acción estimuladora sobre el monocito inactivo (Paez-Pereda, 1995).

Se ha visto que la infusión ICV (intracerebroventricular) de IL-1 ocasiona una disminución del 35% en la proliferación de linfocitos T y del 34% en la actividad de células NK, pero un pre-tratamiento con un anticuerpo de CRF atenúa la supresión de la proliferación de linfocitos T y la actividad de las células NK en un 10% y 8%, respectivamente. Resultados comparables se observaron en ratas adrenalectomizadas. Estos hallazgos sugieren el anticuerpo de CRF es capaz de bloquear los efectos inmunosupresivos de la IL-1. Hay una relación secuencial entre estos mediadores, con

la liberación de IL-1 central seguido por la del CRF (Saperstein, 1992). La infusión continua ICV de CRH produce un aumento transitorio en la locomoción y temperatura del cuerpo, además, en las ratas tratadas mostraron un nivel elevado de corticosterona libre, sin el ritmo diurno evidente y cuando eran desafiadas con LPS, se produjo una respuesta retardada de fiebre (Linthorst, 1994).

Experimentalmente se ha observado que la privación maternal antes del destete en ratas macho produce efectos sobre los sistemas neurales del CRF, en la hipófisis y en el sistema nervioso central, que son evidentes varios meses después y se asocian probablemente con alteraciones persistentes de la respuesta del comportamiento en ratas adultas (Ladd, 1996).

También en modelos por estrés psico-social (dominancia entre machos), se han encontrado hallazgos que representan una demostración in vivo de la modulación extrahipotalámica de receptores a CRH (Fuchs, 1995).

El CRF está involucrado en la regulación de la síntesis de prostaglandinas (PG) en fibroblastos y células endoteliales. La IL-1 alfa se vió que mejoró la actividad de la fosfolipasa A2 en un 30% y en la actividad de la sintetasa de la prostaglandina H en un 60%, los dos efectos eran bloqueados completamente por el CRF, por lo que se concluye que el CRF *suprime* la síntesis de PG inducida por IL-1 alfa, mediante acciones *sobre* la fosfolipasa A2 y la ciclo-oxigenasa. Por lo que se vió que CRF tiene un papel esencial en la liberación de ACTH y en la regulación de PGE2 central inducida por IL-1 alfa, estos hallazgos sugieren una cascada reguladora novedosa en las interacciones inmune- neuroendócrinas (Fleisher-Berkovich, 1995).

Efectos de IL-2 en el eje HHA.

La IL-2 estimula la liberación de CRF en dosis dependiente al calcio y la liberación de arginina-vasopresina (AVP) y el ACTH en la amígdala, que contiene niveles altos de CRF y está conectada en las reacciones al estrés y en la regulación del eje HHA; así como a partir del hipotálamo (Raber, 1995).

La IL-2 tiene la capacidad de modular la actividad neuroendócrina en un período extendido ya que *induce efectos sobre el HHA*, ocasionando un aumento en los niveles de ACTH con lo que las concentraciones plasmáticas de corticosterona se elevan significativamente, por lo que se ha visto que induce *gliosis* (Hanisch, 1994).

Efectos de IL-6 en el eje HHA.

La adrenalina, que se segrega desde la médula adrenal durante el estrés, está involucrada en el control de la *inflamación y respuestas inmunes*. La administración de adrenalina por vía SC en ratas, induce un aumento dosis-dependiente en las concentraciones plasmáticas de IL-6 alcanzando su máximo después de 2 hr, por eso puede modular las respuestas inflamatorias (De Rijk, 1994).

La IL-1 y la IL-6 y sus receptores, se expresan en neuronas hipocámpicas, que son los blancos de las hormonas corticosteroides. Los corticosteroides afectan a los

receptores intracelulares, los de mineralocorticoides (MR) y los de glucocorticoides (GR). Los MRs responden a concentraciones bajas del esteroide, mientras que concentraciones superiores se necesitan para la activación adicional de los GR. La ocupación de los MR en neuronas hipocámpicas parece importante para la estabilidad, así como para la transmisión en proceso, sensibilidad y actividad basal del sistema de respuesta al estrés, así como en la selección de respuestas conductuales. La activación adicional transitoria de GR suprime la excitabilidad, facilita la recuperación de la respuesta al estrés y promueve el almacenamiento de información. Así, el balance entre MR y GR, aparece crítico para el control a largo plazo ejercido por los corticosteroides sobre aspectos específicos de actividad neuronal, estrés y adaptación conductual. La administración de IL-1 produce un aumento duradero en la corticosterona, también influye en la función de MR en el hipocampo y ocasiona un cambio en los MR y el balance de GR, que puede subyacer en la activación prolongada del eje HHA durante una respuesta inmune (De-Kloet, 1994).

Otros mecanismos:

Los esteroides gonadales también influyen en la inmunidad actuando a dos niveles: en los tejidos linfoides primarios o maduros en las células inmunocompetentes y a nivel del eje hipotálamo-hipófisis, influyendo en la liberación de hormonas que por sí mismas tienen propiedades inmunoregulatorias. Los antiestrógenos también afectan la respuesta inmune en ambos modos de acción, agonístico y antagonístico (Draca, 1995 y Homo-Delarche, 1991).

La luz puede ser también un mecanismo de modulación hormonal, ya que la exposición a luz visible leve también modula la hipófisis y glándula pineal, lo que conduce a cambios neuroendócrinos. La melatonina, la norepinefrina y la acetilcolina disminuyen con la activación leve, mientras que los niveles de cortisol, serotonina, gaba y dopamina aumentan. La síntesis de polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido liberador de gastrina (GRP) y el neuropéptido Y (NPY) se ha demostrado que puede ser modificados por la luz, en la rata. Todos estos cambios neuroendócrinos pueden conducir a la modulación inmune. Otra vía alternativa para la modulación inmune por la luz es mediante la piel, ya que la luz visible (400-700 nm) puede penetrar las capas epidérmicas y dérmicas de la piel y pueden interactuar directamente con los linfocitos circulantes para modular la función inmune, por lo que es importante respetar el ciclo luz/obscuridad en los ratones (Roberts, 1995).

Efectos del estrés:

El estrés agudo induce grandes cambios, rápidos y reversibles en la distribución de las subpoblaciones de leucocitos en la sangre periférica de la rata, ya que induce aumentos en los niveles de corticosterona plasmáticos, que son acompañados por una disminución importante en los números y en los porcentajes de linfocitos y por un aumento en los números y en los porcentajes de los neutrófilos. El análisis citométrico de células B, células NK, y los números de monocitos mostraron una disminución

inducida por un mayor estrés. La corticosterona actúa sobre el receptor a esteroide de tipo II (Dhabhar, 1995 y 1996)

En ratas se ha observado una disminución en los niveles CBG (globulina unida a corticosteroide) como resultado de estrés social crónico lo que conduce a un mayor acceso de hormona libre de corticosterona para unirse a receptores II en el bazo que están típicamente presentes en ratas bajo condiciones de estrés agudo o basal. Este resultado ilustra un mecanismo de cómo el estrés crónico puede tener un impacto mayor que estrés agudo sobre la función inmune esplénica (Spencer, 1996). En contraste a los linfocitos de sangre periférica, las células del bazo muestran una respuesta mejorada al mitógeno por la inmovilización y a la adrenalectomía, indicando que la respuesta inmune se regula de manera diferente en los diversos compartimientos del sistema inmune (Rinner, 1992).

En un desafío inmune con LPS, se vió que éste podría inducir respuestas neuroquímicas, neuroendócrinas, e inmunes parecidas a las del estrés, sugiriendo que estas respuestas pueden ser expresadas asimétricamente, lo que parece depender del comportamiento de la lateralidad. En el hipotálamo e hipocampo se observó un metabolismo aumentado de la serotonina, que ocurrió en el lado izquierdo; además, el aumento en el cambio de serotonina en el hipotálamo medial, se niveló con una elevación plasmática de adrenocorticotropina y una disminución de linfocitos T, mientras que la proliferación se observó en ratones diestros y ambidextros pero no en animales zurdos (Delrue, 1994).

Se ha visto que en el estrés o en la enfermedad grave, hay un cambio en el metabolismo de pregnenolona alejada de la DHEA y su producción de sulfato hacia el de los glucocorticoides (a.- Regelson, 1994).

LOS ESTEROIDES.

La función celular influida por esteroides, aparece desde las primeras señales de vida sobre la tierra. De hecho, el modelo de la secreción de esteroides desde glándulas especializadas parece ser relativamente reciente en términos evolutivos (Gawienowski, 1997). Un número de bacterias, hongos y las plantas vasculares fotosintéticas sintetizan esteroides que son activos en los animales. El efecto celular de tales esteroides en los microbios y en las plantas parece ser comparable al de los mamíferos. La evidencia sugiere que esa acción de esteroides en varios fila botánicos es por medio de receptores organizados de una manera parecida a la que se ha visto en los animales (Agarivall, 1993).

La actividad de esteroidogénesis es concomitante con el contenido de lípidos en las células adrenales, tanto morfológica como fisiológicamente. El estado físico de las vacuolas lipídicas y sus características morfológicas en forma de cuerpos cristaloides se ven afectadas en diferentes estadios funcionales, ya que al estimularse la biosíntesis hormonal las vacuolas de lípidos muestran una birrefringencia y múltiples fases de transición (Szabo, 1996).

Los Receptores.

Existe una familia de moléculas que comparten la estructura básica del *ciclopentanoperhidrofenantreno*, y que requieren que haya una unión preliminar al receptor para que se obtenga respuesta. Un grupo grande de dominios de unión -la superfamilia de receptor de esteroide- cuyos miembros comparten algunos requisitos mínimos básicos para la afinidad a los esteroides (Beato, 1989). Estas proteínas reguladoras comprenden, entre otros, los *receptores* para los gluco y los mineralocorticoides, estrógenos y progesterona, andrógenos, retinoides, hormona tiroidea, vitamina D₃ e igual el oncogene v-erb. Sobre el promedio, una célula blanco contiene más de 10,000 receptores a esteroides, de unión reversible a hormonas esteroides con una gran afinidad (K_a 10⁹). Estos *receptores* son una cadena polipeptídica larga de más de 800 a.a. que constituyen menos de 0.01% de la proteína total de la célula. Los miembros de la familia al receptor esteroideal se estructuran en una manera similar, con un extremo N-terminal donde el dominio variable involucrado en la modulación, un dominio conservado rico en *cisteína* en la parte central de ADN, y un bien conservado dominio C-terminal se cree está involucrado en el ligando. Los dominios de esteroide contienen regiones y subregiones de longitudes variables. El receptor a esteroide dentro de la célula puede ocupar ubicaciones diferentes, pero son mayormente nucleares. El receptor de glucocorticoide se encuentra en el citoplasma y en el núcleo (Palomino, 1997).

El receptor a glucocorticoide (RG) regula factores de transcripción que son capaces de modular expresiones genéticas comprometiendo a los sitios específicos de ADN (elementos de respuesta de glucocorticoide). El RG no unido se guarda anclado en un *heterocomplejo* conteniendo las proteínas de choque térmico (heat shock proteins) y otras proteínas. En la hormona comprometida, el RG se disocia desde este complejo y adquiere propiedades obligatorias del DNA, un proceso que se refiere como *activación* del RG. Se ha informado que el RG en estado no unido es *citoplásmico* y para ser transferido al núcleo sobre el ligando que se compromete según el clásico modelo de receptor de paso de activación. Sin embargo, algunas investigaciones encontraron que el RG para estar presente exclusivamente en el núcleo puede estar en ambos estados, unido a su ligando y no unido. El RG humano tiene dos isoformas, ambas de ellas tienen el primero 727 a.a. en común hGR (es de 777 a.a. de largo y hGR tiene 742 a.a.). La forma alfa compromete a la hormona y parece ser la forma fisiológica principal y la forma beta, sugiere que es un inhibidor endógeno de la acción del glucocorticoide. El *hígado* es el *órgano blanco* principal de la acción del glucocorticoide en ambas condiciones fisiológicas y patológicas. Los glucocorticoides modulan la fase de reacción aguda por la interacción vía IL-6 (Smith, 1993).

Mecanismos de Acción.

Los esteroides pueden actuar mediante dos mecanismos básicos: genómico y no genómico. La acción *genómica* clásica es mediada por receptores intracelulares específicos, en el núcleo. El blanco primario para el efecto no genómico es la *membrana* celular. Muchos de los efectos parecen ser mediados mediante la ruta *no genómica*, además de que dichos efectos y otros factores pueden involucrarse con el sistema de receptor intranuclear, induciendo o reprimiendo los efectos específicos

genómicos del esteroide y su receptor. Los **receptores a esteroides (SRs)** son miembros de una familia grande de *factores nucleares de transcripción* que regulan la expresión genética comprometiendo a sus ligandos de esteroides a las sucesiones del *enhacer* (promotor) específico del ADN (elementos de respuesta de esteroide) y a la maquinaria básica de transcripción. Los SRs son fosfoproteínas, que adicionalmente son fosforiladas, después de la unión al ligando. El papel de la fosforilación en la transcripción del receptor es compleja y no puede ser uniforme a todos los SRs. Sin embargo, la fosforilación/ desfosforilación es un suceso clave que regula la actividad transcripcional de dichos receptores. Las actividades de los SR pueden ser afectadas por la cantidad de SR en los núcleos de las células, lo que se modifica por el valor de transcripción y la traducción del gen de SR así como también por la proteólisis del SR. Hay un auto y heteroregulación de los niveles del receptor. Algunos SRs se expresan como dos o más isoformas, que pueden tener efectos diferentes sobre la transcripción. Los isoformas de receptor son productos diferentes de transcripción o la traducción de un gen único. La isoforma A del receptor de progesterona es una forma truncada de la isoforma B que se origina desde el mismo gen, pero es capaz de suprimir no solamente el gen mejorando la actividad del receptor a progesterona (PR-B) pero también el de otros receptores de esteroides (Tuohimaa, 1996).

La regulación genética por esteroides es mediada por la unión del ligando endógeno o farmacológico al receptor nuclear correspondiente. El ligando y los receptores activados de los esteroides comúnmente regulan la expresión de genes de respuesta, comprometiendo elementos comunes de respuesta sobre el ADN en forma de homodímeros. Sin embargo, los hallazgos recientes indican que esos receptores de glucocorticoide y mineralocorticoide son capaces de actuar recíprocamente para formar heterodímeros. En tejidos que coexpresan ambos receptores de corticosteroide, la *heterodimerización* entre ellos pueden ser una modalidad no reconocida para la regulación transcripcional del corticosteroide y los genes de respuesta (Trapp, 1996).

Los Esteroides y el Sistema Inmune.

El sistema inmune mamífero es de composición multicelular y su función apropiada requiere del control cuidadoso sobre las vías de desarrollo complejas y muchos otros distintos tipos de respuestas del efector. Los numerosos mecanismos de superposición de comunicación intercelular se necesitan para realizar las tareas de regulación apropiada de los diversos tipos de células que constituyen este sistema protector esencial. Uno de los mecanismo ocurre por el contacto directo célula a célula mediante la interacción de las moléculas asociadas a las membranas. Los ejemplos de este tipo de comunicación incluyen la interacción que tiene lugar entre el *antígeno* y el *receptor* específico en la célula T y los péptidos ajenos que son el límite principal para el Complejo Principal de Histocompatibilidad, así como también las interacciones coestimuladoras de molécula con sus ligandos específicos expresadas sobre las células presentadoras de antígeno (por ej. CD28 y B7-1 o B7-2). Un segundo mecanismo ocurre mediante la producción, secreción, y activación de mediadores solubles, colectivamente conocido como citocinas. Las citocinas son representadas por un grupo grande y diverso de moléculas que son producidas por una amplia variedad de diversos tipos de células (Daynes, 1995).

Las citocinas se unen a receptores específicos asociados a la membrana sobre las células blanco, induciendo a la activación de señales particulares. Estos procesos consecutivamente conducen a diversos cambios en la fisiología celular. Algunas de las citocinas ejercen sus influencias *in vivo* por medio de rutas *endócrinas*, aunque sea mucho más común la comunicación intercelular por medio de vías *parácrinas* o *autócrinas*. Se han usado como ejemplos de mecanismos inmunes la variación de cepas en la susceptibilidad a agentes infecciosos, la condición de inmunosenescencia, y los procesos que controlan el desarrollo de la inmunidad de las mucosas, ya que pueden estar bajo el control de las hormona esteroideas (Derijk, 1994 y Sternberg, 1995).

El factor inhibidor de migración macrófago (MIF) es un componente crítico del sistema inmune y actúa junto con los glucocorticoides para regular la inflamación y la inmunidad. Hay estudios en curso para determinar las bases moleculares de la interacción glucocorticoide -MIF a nivel subcelular (Calandra T, 1995). Recientemente se ha descubierto que el MIF, se libera directamente desde células inmunes enseguida de la estimulación con concentraciones fisiológicas de glucocorticoides. A nivel de un sitio inflamatorio localizado, las células inmunes que liberan MIF, como son linfocitos T o macrófagos, actúan para equilibrar o contra regular los efectos anti-inflamatorios o inmunosupresivos de los glucocorticoides que aparece en la circulación como una parte integral de la respuesta generalizada de respuesta al estrés por dolor o invasión tejido. El hecho de que los estímulos pro-inflamatorias tales como las endotoxinas también conducen a la liberación de MIF a partir de la hipófisis, indica que la capacidad del hospedero para proveer una *respuesta central*, contrareguladora, que puede servir para equilibrar los efectos de los glucocorticoides se dá a un nivel *sistémico* también y no sólo *local* (Nishino, 1995).

LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA).

El sulfato de DHEA se secreta en grandes cantidades por la corteza adrenal humana, se llama comúnmente andrógeno adrenal (b.- Regelson, 1994). En experimentos usando la separación zonal y los cultivos primarios de zonas adrenocorticales, se determinaron las diferencias zonales. La diferencia en la expresión de genes esteroideogénicos de enzimas, entre la zona fascicular y la zona reticular, es el nivel de la enzima tipo II 3 (el HSD), en la zona reticular es el sitio de la biosíntesis de DHEA y DHEAS, porque expresa un nivel bajo de 3 (HSD) (Endoh, 1996).

La DHEA es cuantitativamente la hormona más abundante en el humano joven y en los mamíferos, con una amplia variedad de efectos fisiológicos, incluyendo efectos reguladores principales sobre el sistema inmune. Dos de los aspectos más llamativos de DHEA son su declinación constante en sus niveles con la edad y una deficiencia importante en pacientes con varias enfermedades, incluyendo el cáncer, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer. La hormona se secreta en forma no-sulfatada (DHEA) y la forma sulfatada (DHEA-S). (Shealy, 1995). Las dos son aparentemente intercambiables y parece probable que sus efectos fisiológicos son

producidos por moléculas derivadas que aún quedan por ser identificadas (Regelson, 1988).

Efectos de la DHEA.

Los datos actuales muestran que algunos de los **efectos** in vivo asociados con la administración *dietética* de DHEA a ratones y ratas son:

(1) disminución en la ganancia de peso en el cuerpo; (2) hay aumentos relativos en el hígado; (3) el hígado cambia de color; (4) instalación de enzimas hepáticas peroxisomales; (5) proliferación de peroxisomas hepáticos; (6) disminución de mitocondrias hepáticas; (7) niveles elevados de enzima málica hepática; (8) disminuciones leves, disminuciones importantes, o aumentos importantes en los niveles triglicéridos séricos; dependiendo de la cepa de ratón; (9) aumento total de los niveles séricos del colesterol; (10) disminuciones importantes en la síntesis hepática; (11) aumentos importantes en la síntesis hepática de colesterol; (12) disminución de la actividad proteica y específica de la enzima hepática mitocondrial carbamoil fosfato sintetasa-I sin cambios concomitantes en urea sérica; (13) instalación de la actividad de la glutatión S-transferasa en el hígado; (14) disminución en la proteína endógena hepática de la fosforilación; (15) aumento en la actividad de AMPasa hepática y GTPasa; (16) formación de 5-androstene-3 beta, 17 beta-diol como un metabolito principal de la DHEA por análisis subcelular de fracciones de hígado, que se refleja en el suero y en los niveles en el tejido; y (17) reducción en los niveles séricos de prolactina (Milewich, 1995).

En inmunología:

- sus efectos requieren la expresión sistémica, pero el balance local de las citoquinas Th-1/Th-2 en el tejido linfoide depende de la activación hormonal in-situ (b- Daynes, 1990)
- la presencia de infección o de un estímulo antigénico, como el estrés, es necesario para que la DHEA muestre su acción inmunoestimulante (McLachlan, 1996)
- la DHEA puede actuar disminuyendo o bloqueando la acción de corticosteroides para modificar el daño al tejido mediado por estrés, una acción que puede ser crítica en las enfermedades degenerativas del envejecimiento o por la modulación de la producción de linfocinas (Suitters, 1997)
- puede ser un mediador natural de las respuestas de las célula T y pueden ser importantes para la restauración juvenil de las respuestas antigénicas en ratones envejecidos (Danenbergl, 1995)
- en dosis adecuadas, la dosis subcutánea a los ratones, alivia el estrés por corticosteroides
- evita la involución tímica y mejora la resistencia inmune a la infección viral y bacteriológica (May, 1990)
- estimula la proliferación de las células T y la producción de IL-2 (Suzuki, 1991)
- el blanco primario inmunológico de la DHEA son los linfocitos Th-1 subclase CD4+, lo que conduce al aumento de IL-2 con una actividad citotóxica mejorada y escasa producción de IL-4 (Daynes, 1990)

- mantienen la producción de IFN, y esto puede explicar alguna de su actividad antiviral in vivo
- podría ser utilizada como una terapia de reemplazo en el envejecimiento y en caso de enfermedades crónicas como cáncer, tendría un valor potencial en la resistencia creciente a las infecciones (b.- Regelson, 1994 y b.- Araneo, 1995)
- mejora la inmunidad de células T y B en ratas infectadas con *Cryptosporidium* e inmunosuprimidas por la dexametasona (Rasmussen, 1991)
- el efecto inhibitorio de la DHEA sobre la producción de IL-6 puede ser mediada por la inhibición de el CRF que estimula el rendimiento de los monocitos de IL-6
- estimula la producción de C1 del sistema del complemento en cultivos celulares hepáticos
- produce una reducción en la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE2) en la epidermis de ratón. La PGE2 es un inhibidor de mitogénesis de los linfocitos y en la secreción y producción de linfocinas (b.- Regelson, 1994)
- puede impedir la agregación plaquetaria, sugiriendo, como se ha visto para linfocitos y macrófagos, que los elementos formados de la sangre pueden metabolizar a la DHEA (Jesse, 1995).

En el metabolismo:

- la DHEA puede modular el rendimiento a la insulina
- los trabajos mediante la estimulación de GMP cíclico, estos niveles de GMP pueden ser la vía común final para la acción de la DHEA sobre respuestas celulares variadas
- estimula la producción de peroxisomas con el aumento marcado del peso del hígado (Swierczynski, 1996)
- es una potente inhibidor no competitivo de la glucosa-6-PO4 deshidrogenasa (G-6-PD), la cual controla la catalisis de la pentosa y la generación del NADPH extramitocondrial
- inhibe la ornitina decarboxilasa y carbamil sintetasa
- induce el bloqueo de canales de K o inhibición de Na⁺ K⁺ ATPasa
- inhibe la síntesis de ribosa 5-P (Regelson, 1988).
- es metabolizada por la piel y juega un papel en la secreción sebácea y el hirsutismo
- la DHEA y el DHEAS aumentan conjuntamente con otros andrógenos en el ejercicio, pero estos niveles se disminuyen en individuos que consumen dietas vegetarianas
- puede tener un efecto tiromimético, porque inhibe la obesidad en el ratón y en perros
- estimula las sulfotransferasas hepáticas, las enzimas de esteroides de sulfato, y esto puede ser aplicable a la sulfatación y la solubilidad de los ácidos biliares (Regelson, 1988).

En neurología:

- puede sintetizarse por medio del colesterol a la pregnenolona, su síntesis en el *encéfalo* es independiente de fuentes endócrinas sistémicas y parece ser producida por medio de una vía oligodendroglial (b.- Robel, 1995)
- la administración de ACTH aumenta niveles plasmáticos de DHEA, DHEAS, androstenediona y testosterona. Los niveles de DHEA disminuyen con la enfermedad (Baulieu, 1996)

- en la rata, la concentración exógena más alta de la captación de DHEA se encontró en la pineal y también en la amígdala, el hipocampo, el tálamo, encéfalo medio y la corteza frontal. La localización pineal de la DHEA se denota en el control pineal del ciclo circadiano y los ritmos estacionales que afecta al ciclo sexual, afectando modelos de sueño y conducta
- la producción de DHEA propia de ciclo circadiano se pierde clínicamente en los grupos de edad mayor que son acompañados por una caída en los niveles de la DHEA
- puede tener una influencia sobre el sistema nervioso simpático
- como un neuroesteroide sintetizado por el encéfalo, puede actuar también mediante la modulación de GABA. Su acción in vitro en el receptor de GABA bloquea en las neuronas ventrales del mesencéfalo. Modifica las respuestas gaba-érgicas mediadas que efectúan la excitabilidad neuronal. puede suprimir la respuesta de ataque en ratones macho y en hembras lactantes (Rabow, 1995)
- produce la estimulación de guanil ciclasa que aumenta el GMP cíclico
- en roedores tiene un efecto de mejora en la memoria. EL DHEA y la pregnenolona tiene un actividad trofica por el SNC (Young, 1996)
- La DHEA y el DHEAS tiene efectos sobre el metabolismo de la prolactina. La prolactina regula la estimulación dopaminérgica de C19 delta 5 de síntesis adrenal esteroideogénica lo que sugiere a la DHEA como un neuroesteroide, que puede tener un papel en la enfermedad de Parkinson (Garcia-de-Yebenes, 1995)

El término "*neuroesteroides*" se aplica a esos esteroides que son sintetizados en el sistema nervioso, de novo a partir del colesterol o desde precursores de hormonas esteroides y que se *acumulan en el sistema nervioso* a niveles por lo menos en parte independientes de la secreción glandular (a.- Robel, 1995). Los células gliales juegan un papel principal en el metabolismo y formación del neuroesteroide. Varios neuroesteroides están involucrados en mecanismos auto o parácrinos que implican ambos regulación de los efectos y la expresión genética sobre los receptores de la membrana (incluyendo los de los neurotransmisores). El papel neuromodulador de los neuroesteroides en la regulación del ciclo estral y la gestación, estrés, memoria, los procesos de desarrollo y el envejecimiento esperan una investigación adicional (Baulieu, 1997).

En el envejecimiento:

Todo el DHEAS circulante en el humano se origina desde la corteza adrenal. Un alto valor en la secreción de los andrógenos adrenales se restringe al humano adulto joven y otros pocos primates superiores. Hay una edad que coincide con la declinación en la secreción plasmática en los niveles de DHEAS y es en la octava década y más allá los niveles están muy deprimidos. Esta se llama *adrenarca*. La hipótesis es que con la edad, hay una declinación progresiva en la producción de DHEA con una disminución en el número de células reticulares en la corteza adrenal, quizás debido a una mayor susceptibilidad de las células en la zona reticular a la apoptosis (Endoh, 1996).

Mecanismos de acción:

1. Por la inhibición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de mamífero, enzima limitante en la vía de la pentosa. La DHEA puede servir como un inhibidor competitivo de glucocorticoides (GCS) aumentando la inducción de G6PD, además de tener efectos anticáncer y anti-aterogénicos
2. Por la activación de la guanidil-ciclasa, puede modular el metabolismo del óxido nítrico en el músculo liso
3. Por la reducción de isoprenilación de proteína por medio de efectos sobre la síntesis de mevalonato, importante en la biosíntesis del colesterol, en la proliferación tumoral y en el transporte de membranas
4. Por la inhibición de la ornitín descarboxilasa y diferenciación de la actividad tumoral con un efecto parecido al del ácido retinoico
5. La DHEA junto con los efectos de las hormonas tiroideas estimulan la termogénesis del hígado como producto de la elevación de enzima maleica. Produce una estimulación de la G3P deshidrogenasa mitocondrial
6. Afecta a la enzima málica, por medio de la regulación de la transcripción. La DHEA podría ejercer un efecto transcripcional regulador similar bloqueando la acción de los glucocorticoides
7. Por la estimulación del IL-1, que juega un papel en el proceso inmune y puede mejorar la hipoglucemia por insulina. La IL-1 que se encuentra en las células noradrenérgicas cromafines, estimula el rendimiento de los GCS. Las células cromafines sintetizan andrógenos, y sería de interés comprobar si estas interrelaciones pueden involucrar también la termogénesis. La IL-1 es la citocina implicada en respuestas febriles, Es inducida rápidamente en ratones por lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas (Besedovsky, 1990, Bartfai de 1990)
8. Es un contra regulador de GCS, específicamente al receptor hormonal, la DHEA es una "anti-hormona" que excita los procesos metabólicos y regula la inmunomodulación y otras respuestas fisiológicas (a.- Regelson, 1994)

EL ANDROESTENEDIOL (AED).

Es un derivado de la DHEA, es un metabolito aún mas activo y potente ya que aumenta la resistencia del hospedero a la infección mediante la inmunoregulación (Araneo, 1993)

EL CORTISOL.

En el humano, el cortisol es el glucocorticoide principal. Se segregan diariamente entre 13-20 mg de cortisol en la zona fascicular y en la zona reticular; después de ser secretado, el cortisol se une a la globulina transcortina. La mayoría del cortisol circulante está unido a la globulina, sólo un porcentaje pequeño está libre y es biológicamente activo. La secreción aumentada de cortisol es crítica en la respuesta fisiológica para adaptarse al estrés y a la enfermedad. La reducción hepática es de una doble molécula que inactiva al cortisol. Después de un número de varias biotransformaciones y conjugaciones subsiguiente con glucoronato o sulfato, los metabolitos de cortisol se segregan como 17 -hidroxiesteroide urinarios (17-OHS) (Anónimo, Scientific American, 1997).

LA CORTICOSTERONA.

La CORT es el esteroide principal secretado por la adrenal en roedores, es el glucocorticoide endógeno libre, tiene los efectos de los mineralocorticoides ya que resulta en la retención de agua. Su vida media es 8-12 h (Sutton, 1994, Gilman, 1990).

La medición de los niveles de corticosterona de sangre en un mamífero tan pequeño como el ratón, se han beneficiado del hecho de que este esteroide se segrega en cantidades considerables y así hay varios métodos disponibles para su uso, el mejor debe ser sensible, específico y reproducible. Los valores obtenidos desde ratones adultos sin tratamiento varían desde **20 a 160 ng/ml** de plasma por ensayo de microfluorescencia. Se ha desarrollado para las ratas el radioinmunoensayo de la corticosterona plasmática que utiliza un anticuerpo específico, sin embargo, los informes de valores por radioinmunoensayo para ratones no están disponibles en este momento (Beamer, 1983).

Los ratones BALB/cBy jóvenes y adultos han mostrado que tienen significativamente más corticosterona en el plasma que los ratones C57BL/6By. Los análisis del corticosterona de plasma desde líneas consanguíneas recombinadas y seleccionadas por retrocruzas derivaron desde el BALB/cBy y el C57BL/6By, lo que apoyó el que dos loci (Cpl-1, Cpl-2) controlaran tales diferencias. La captación hipotálmica de corticosterona 3H-marcada se encontró ser más más baja en BALB/cBy que en la C57BL/6By las hembras con tal diferencia posiblemente se deba a un locus en el gen (Beamer, 1983).

Se ha establecido la diferencia sexual que existe en la actividad del eje hipotálmico, hipófisis y adrenal (HHA). El ciclo estral en ratas hembras podría afectar los niveles plasmáticos de la corticosterona. Los glucocorticoides adrenales ejercen una amplia gama de efectos biológicos y tales efectos podrían ser por variaciones relativas a los niveles plasmáticos de corticosterona. Las ratas hembras segregan niveles basales superiores de corticosterona, circulando niveles de corticosterona unida a globulina que se elevan también y niveles reducidos de la libre, la corticosterona bioactiva a niveles comparables a los machos. Los niveles de glucocorticoide de plasma son mínimos a principios de la *fase de inactividad* (en ratas a 8.00-8.30 A.M.) se elevan en el pico temprano en la *fase activa* (8.30-9.0 P.M.) con una variación total sobre la orden de 20 que dobla en machos cuando un índice de variaciones circadianas (las amplitudes) se compara entre ratas machos y hembras, y que se encontró significativamente más grande en machos que en hembras (Atkinson, 1995). Dado que las ratas y los ratones son animales nocturnos, esto se tiene que tener en mente cuando se comparan niveles de la hormona. Los valores séricos de corticosterona son bajas aproximadamente al mediodía y más alto 2 a 4 h antes de la medianoche (Beamer, 1983).

HIPOTESIS.

Las hipótesis planteadas al inicio de la tesis fueron:

- 1.- El eje HHA sufre alteraciones funcionales y estructurales con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar experimental murina.
- 2.- Estas alteraciones contribuyen al desbalance del patrón de secreción de citocinas tipo Th1 a Th2.

La atrofia adrenal establecida en la fase crónica de la enfermedad se relaciona con una disminución acentuada de DHEA, lo cual permite una mayor actividad Th2 y ésto a su vez permite el agravamiento de la enfermedad y la persistencia crónica de las micobacterias con una mayor susceptibilidad para la producción de necrosis por la producción local de TNF.

Al reestablecerse la función del patrón Th1 mediante la administración exógena de hormonas esteroides de origen adrenal se lograría un efecto protector para el huésped, en este caso el ratón.

Las alteraciones inmunológicas establecidas en la fase crónica de la enfermedad podrían ser revertidas con la administración exógena de hormonas esteroides de origen adrenal, DHEA ó AED.

Tomando en cuenta que:

- la DHEA es la hormona de origen adrenal más abundantemente producida y además es un potente inductor de respuesta Th1
- los glucocorticoides son estimuladores de la respuesta Th2, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS.

1.- Estudiar las alteraciones anatómicas e histológicas (a nivel de microscopía de luz y electrónica) de las glándulas adrenales y de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo durante el curso evolutivo de la tuberculosis pulmonar.

2.- Comparar las fluctuaciones en la secreción de hormonas esteroides adrenales (corticosterona y dehidroepiandrosterona) con la producción de interleucinas producidas por linfocitos cooperadores de clase 1 (Th-1) y clase 2 (Th-2), durante la evolución de la tuberculosis pulmonar murina.

3.- Relacionar los patrones de la secreción de hormonas adrenales e interleucinas con la severidad y cronicidad de la enfermedad

4.-- Manipular la respuesta inmunológica con la administración exógena de esteroides adrenales.

MATERIAL Y METODOS

Los experimentos se realizaron en la sección del Laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, los animales se confinaron al cuarto 7 del primer piso del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del INNSZ.

El proyecto fue financiado por CONACYT.

Se llevaron a cabo varias fases en los experimentos:

- I.- Experimentos para optimizar las dosis de los andrógenos adrenales.
- II.- Administración de la DHEA por sus conocidos efectos antiglucocorticoides (b-Araneo-B; 1995) en fase aguda y crónica y administración de AED, utilizando las dosis óptimas.
- III.- Realización de trasplante de adrenales de animales sanos a animales tuberculosos.

1. Preparación de la micobacteria.

La cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv se cultivó en medio de Proskauer y Beck, modificado por Youmans. Después de 4 semanas de cultivo las colonias se suspendieron en amortiguador de fosfatos salino (PBS) con 0.05% de Tween 80 con agitación por 10 minutos con perlas de vidrio. La suspensión se centrifugó durante 1 minuto a 350 x g para remover los cúmulos grandes de bacilos. Después se realizó un conteo preliminar del sobrenadante contando 10 campos al azar teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen. La suspensión fué diluida finalmente a una concentración de 1×10^6 bacterias en 100 μ l de PBS en alícuotas que se congelaron a -70 °C. Antes de usar las bacterias la viabilidad se revisó usando el método de conversión del acetato de fluoresceína (Jarnagin, 1980). Para preparar el extracto proteico total los bacilos son obtenidos a partir del medio de cultivo líquido despues de 1 mes de crecimiento bacteriano, centrifugado y precipitado con cloruro de amonio al 50%.

2. Los animales.

Se utilizaron ratones machos singénicos de la cepa BALB/c, de 6 a 8 semanas de edad, provenientes de la colonia que se mantiene en el Dpto. de Investigación Experimental y Bioterio del INNSZ, proveniente de Charles River, EUA.

El alimento 5010 de PMI esterilizado por autoclave, fué administrado ad libitum, el agua de la llave se esterilizó y también se administró ad libitum, el material de cama que usaron fué Betachip esterilizado por autoclave, el ciclo de luz/ oscuridad fué de 12 horas, de las 7.00 a las 19.00. En los experimentos que lo requirieron se les suministró corticosterona en el agua de bebida ad libitum, como se indica.

Como anestésico, se les administró por vía intraperitoneal 16-18 μ l de pentobarbital sódico (Anestosal) por 22-24 g de peso vivo, utilizando una jeringa Hamilton, para así poder realizar una incisión en la porción ventral del cuello, disecar la piel y músculos, hasta llegar a la tráquea. Por vía intratraqueal se inoculó una cantidad

de 1×10^6 bacterias vivas de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*, en 100 μ l de buffer salino de fosfatos, cuidando que no se ahoguen. Se suturó la piel con hilo de algodón y se mantuvo a los animales en posición vertical, durante 15 minutos, colocándolos en jaulas de policarbonato de 11x5x6 pulgadas, tapadas con microaisladores, que evitan la diseminación de aerosoles. Todo esto se realizó bajo la campana de seguridad biológica (marca Veco).

Para sacrificar a los animales, se colocaron uno por uno, en un frasco de vidrio con algodón empapado en éter etílico, después se sacaron y se fijaron en tablitas de unisel forradas con papel aluminio, para realizar así una incisión en el plexo braquial y lograr la exsanguinación, en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120, post inoculación de la micobacteria.

3. Grupos experimentales.

En un principio se realizaron los siguientes experimentos:

1. Fase Crónica (inicio al día 60): administración de DHEA 50 μ g/ 50 μ l O.H. sola y el grupo control.
2. Fase Aguda: los ratones se castraron, después se adrenalectomizaron y después se inocularon con *M. tuberculosis* (inicio al día 1): DHEA+C 50 μ g/ 50 μ l en O.H. y el grupo control.
3. Fase Aguda (día 1 al 21): DHEA 50 μ g/ 50 μ l O.H. sola, 3 dosis de AED, la dosis adecuada fué 12.5 μ g/ 50 μ l A.O. y el grupo control. Las hormonas se inyectaron cada tercer día durante 3 semanas.
4. Fase Crónica (del día 60 al 180): se realizó el trasplante adrenal, dos adrenales en mitades a cada ratón, por vía subcapsular en ambos riñones. 3 dosis de AED+C, la dosis adecuada fué 25 μ g/ 50 μ l de A.M., 3 dosis de DHEA+C 50 μ g/ 50 μ l A.O. y el grupo control.

Después se continuó con los siguientes experimentos:

2. Fase Aguda (del día 1 al 120): con los siguientes grupos: el control, AED 25 μ g/ 50 μ l A.O. y DHEA 50 μ g/ 50 μ l A.O.
4. Fase Crónica (del día 60 al 180): a un grupo se le realizó el trasplante adrenal y al otro se le administró DHEA+C 50 μ g/ 50 μ l A.O.
5. Fase Crónica (del día 60 al 180): se realizaron los siguientes grupos: *M. tuberculosis*+ C, sano sin inocular con AED 25 μ g/ 50 μ l A.O. y sano sin inocular con DHEA 50 μ g/ 50 μ l A.O.

En los grupos donde dice "+C" quiere decir que se suministró en el agua de bebida corticosterona, que en los ratones es el glucocorticoide natural, equivalente en los humanos al cortisol. Se preparó de la siguiente forma: 0.0030 g de corticosterona (Sigma)/ litro de solución salina 0.9%, con 10 g/l de sucrosa (Waynforth, 1995).

De los siguientes experimentos:

En la fase aguda.

En la fase crónica, al día 60 postinfección.

Se registró la sobrevida para cada grupo. Del grupo que recibió el tratamiento hormonal sólo de AED a una dosis de 25 µg/ 50µl A.M. la sobrevida fué menor que cuando se les administró la hormona a esa misma dosis pero en A.O. junto con corticosterona en el agua de bebida ad libitum En este grupo la sobrevida fué mejor que la del grupo control.

El otro grupo en fase crónica fué el de trasplante adrenal con una sobrevida mejor incluso que el grupo AED+C y que el control.

4. Variables.

- Sobrevida
- Reacción de DTH (prueba de hipersensibilidad tardía)
- Peso corporal
- Procesamiento y medición de las glándulas adrenales
- Procesamiento y morfometría de los pulmones
- Técnica de Inmunohistoquímica en los pulmones
- Determinación de UFC en los homogeneizados de los pulmones
- Expresión de subclases de IgG determinadas por la técnica de ELISA
- Hibridización in situ en los encéfalos
- Determinación de los niveles de corticosterona en suero
- Realización de trasplante de adrenales

A. Sobrevida.

Se realizó un conteo de los animales que se murieron espontáneamente, del total de animales que se inocularon por grupo. No se toma en cuenta a los animales que se van sacrificando conforme a los diferentes días.

B. Reacción de DTH.

Se realizó la reacción de DTH (hipersensibilidad tardía) que consiste en inyectar por vía S.C. 40 µl de PBS con 20 µg de antígenos de *M. Tuberculosis*, en el cojinete plantar derecho de la pata trasera, utilizando una jeringa de insulina y aguja que se introduce a partir del talón hasta llegar subcutáneamente al cojinete en donde se inyecta suavemente el extracto proteico, de esta forma no hay inflamación por traumatismo directo al cojinete. Con un calibrador de ingeniero se midió el espesor del cojinete antes de la inyección (lectura basal) tres veces y 24 hrs después (lectura de 24 hrs) se vuelve a medir 3 veces. Esto se realizó con el fin de evaluar la respuesta inflamatoria celular local en el ratón, expresada en micras de acuerdo al engrosamiento del cojinete, para lo cual se realiza una resta del valor basal al obtenido 24 hrs después, a este resultado se le multiplica por una constante para obtener el resultado convertido a micras (Van Loveren, 1984).

C. Peso Corporal.

Se registró individualmente para cada ratón utilizando una balanza eléctrica Ohaus, en el día de sacrificio que correspondiera.

D. Obtención, procesamiento y medición en las glándulas adrenales.

Después de realizar la exsanguinación en un ratón y una vez recolectada la sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril, se realiza una incisión en la piel, a lo largo de la línea media, se retira la piel para poder incidir el abdomen, y se extraen el bazo y las adrenales, primero la derecha y después la izquierda. Las adrenales por separado, se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 2 %, durante 2 hr a 4 °C. Se lavaron en buffer de cacodilatos, pH 7.4, para poder disecarlas se utilizó el microscopio estereoscópico, quitándoles el tejido adiposo. Se pesaron en la balanza analítica y se registró su peso individualmente. Se cortaron transversalmente. Se postfijaron en tetraóxido de osmio al 2 % (v/v), para después deshidratarlas en alcoholes etílicos de concentración creciente, hasta incluirlas en resinas epoxi.

Se obtuvieron cortes semifinos de 1 micrómetro de grosor y se tiñeron con azul de toluidina para ser observados al microscopio de luz. Los cortes finos se obtuvieron en el ultramicrotomo Sorval MT-6000, y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Se tomaron electro micrografías de 5 células al azar, a un aumento de 8 000 de cada una de las 3 capas de la adrenal, en un microscopio electrónico Zeiss EM-10, utilizando película de 35 mm y se imprimieron en papel Juama.

En el caso de la capa fascicular se midió directamente en la fotografías utilizando el aparato ZIDAS (Zeiss Interactive Digital Analysis System), que incluye una fuente de poder, un microprocesador, una impresora, una tabla digitalizadora y un cursor.

En los diferentes días de sacrificio, lado de la adrenal y capa; se midieron los diámetros mayores de los núcleos y de los nucleólos, así como también se midieron otros organelos, como son: mitocondrias, vacuolas de lípidos, retículo endoplásmico liso y lisosomas.

Dentro de los núcleos se analizó: número, forma, envoltura, poros nucleares, aspecto de la cromatina. distribución; cuerpos nucleares: número, forma, localización; aspecto del nucleoplasma; nucleólo, número, forma, localización, centros fibrilares y cromatina perinucleolar.

E. Obtención, procesamiento y morfometría en los pulmones.

Una vez que se realiza la incisión en la piel del ratón, a lo largo de la línea media, se retira ésta, para poder incidir el tórax. Se retira el esternón, se extrae el timo y dejando la tráquea adherida al cuello, se inyecta por vía intratraqueal con una jeringa de insulina alcohol etílico absoluto a los pulmones para perfundirlos, se retiran y se depositan en un frasquito con alcohol etílico absoluto para que así se fijen durante 24 hrs y sean procesados hasta obtener los cortes histológicos.

En los primeros experimentos el bazo, el timo y las adrenales se pesaron en balanza analítica, registrando su peso individualmente. El bazo y el timo se congelaron con nitrógeno líquido y después se guardaron en el ultracongelador Revco a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los pulmones ya fijados en alcohol etílico absoluto durante 1 día, se sacaron y se cortaron sagitalmente con una navaja de rasurar. Se conservó la mitad inferior y la mitad superior se incluyó en cassettes de plástico con tapas de acero inoxidable identificados con un número, dándoles el siguiente proceso:

1. En alcohol absoluto durante 30 minutos. Para aclarar: 2. en xilol durante 1 hr, 3. xilol durante 1 hr, Para su imbibición e inclusión: 4. 1er. parafina durante 1 hr, 5. 2a. parafina durante 1 hr, 6. 3er. parafina durante 30 min.

Finalmente se incluyeron en parafina utilizando los moldes y el aparato Tissue Embedding Center de Reicher. De los bloques se obtuvieron cortes de $5\text{-}6\text{ }\mu\text{m}$ de grosor con el microtomo que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E).

Para realizar la morfometría de los pulmones se utilizó un microscopio de luz Polyvar de Reicher Jung (Austria), acoplado a una cámara lúcida, que a su vez es compatible con el aparato ZIDAS (Zeiss Interactive Digital Analysis System) que incluye una fuente de poder, un microprocesador, una impresora, una tabla digitalizadora de $11\text{''} \times 11\text{''}$ y un cursor para trazar las imágenes en la tabla.

Los **criterios de Inclusión** que se siguieron para realizar la **morfometría** en el pulmón fueron los siguientes:

- utilizar de preferencia los cortes de pulmones de animales sacrificados y no de los que se hayan muerto espontáneamente.

- realizar una revisión del corte de arriba a abajo y de izquierda a derecha (en forma de zig-zag).

- una vez calibrado el aparato a micras, con el objetivo de 4x, se midió el área total del pulmón, el área de neumonía dentro del pulmón, las áreas de necrosis y los ganglios, por lo que los resultados se expresaron en micras cuadradas. La neumonía es una área del pulmón consolidada por el infiltrado de células inflamatorias y exudado proteináceo.

- para medir el infiltrado perivascular y el peribronquial se utilizó el objetivo de 40x y una función llamada Delta Area, que resta el contenido del vaso o del bronquio de la medición, ya que se crea una área externa (lectura positiva) y una área interna (lectura negativa). Se decidió medir todos los vasos o bronquios en cada corte con el requisito de que el vaso o el bronquio no rebasaran el tamaño del campo visual, ni que estuvieran rotos o incompletos.

- para medir los espacios intersticiales y los granulomas se utilizó el objetivo de 40x con las funciones de área y perímetro, pero se seleccionaron máximo 5 áreas, una por cada lóbulo del lado derecho y dos en el lado izquierdo. En caso de que fuera medio pulmón, se incluían los campos según si era derecho o izquierdo. El intersticio es el engrosamiento del espacio entre septos alveolares ocupado por células inflamatorias. Un granuloma es una estructura bien definida, formada por macrófagos principalmente, rodeada por linfocitos, de forma más o menos esférica a veces.

Los **criterios de exclusión** que se siguieron fueron los siguientes:

- Los cortes de pulmones de ratones muertos espontáneamente, áreas mal perfundidas o colapsadas, vasos o bronquios más grandes que el campo visual, incompletos o rotos.

De esta forma las variables que se obtuvieron fueron las siguientes:

- infiltrado perivascular
- infiltrado peribronquial
- infiltrado intersticial
- granulomas
- área total del pulmón
- área de neumonía
- área de necrosis
- ganglios

De esta forma cada corte histológico fué revisado por lo menos 7 veces, siguiendo las recomendaciones del "Manual de Operaciones" del ZIDAS (Zeiss, 1984).

F. Técnica de inmunohistoquímica en los pulmones.

Ésta técnica se utiliza para la identificación de células en cortes de tejido. El protocolo que se siguió es el de la utilización de anticuerpos monoclonales con peroxidasa en cortes de parafina, con algunas modificaciones, publicado por Coligan, J et al en 1991.

Para ver la técnica en detalle ver anexo.

G. Determinación de UFC en homogeneizados de pulmones.

Inmediatamente después del sacrificio del animal, se colectaron los pulmones, retirando el timo y los ganglios linfáticos bronquiales y mediastinales. Se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles numerados y se congelaron en nitrógeno líquido, se guardaron en el ultracongelador a -70°C . Posteriormente se tomó la mitad de cada pulmón por separado de acuerdo a cada experimento y día; se sumergió en 3ml de SSF en tubo falcon de 50 ml estéril, para homogeneizarlo usando un politrón. De los homogeneizados se prepararon diluciones seriadas en factores de 10 en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles con SSF estéril. De las diluciones se sembraron $20\ \mu\text{l}$ por duplicado en cajas de petri de plástico desechables con agar midlebrook 7H10. Las cajas de petri se mantuvieron en posición horizontal boca arriba hasta la absorción completa de la gota con la dilución correspondiente. Se dejaron así toda la noche y después se incubaron boca abajo, a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 , durante 12 a 20 días, al cabo de los cuales se realizó el conteo de las colonias formadas. Para calcular el número total de UFC por pulmón se multiplicó el número de colonias por la dilución.

H. Técnica de ELISA indirecta para la determinación de anticuerpos específicos subclases de Ig G en ratones contra M. tuberculosis.

Los ratones producen 4 subclases de Ig G, que son: IgG1, 2a, 2b y 3, según el tipo de respuesta inmunológica que vá a predominar se dará un tipo de subclase, para la de tipo Th1 es la subclase IgG2a y para la de tipo Th2 es la IgG1 (Lawrence, 1994).

La técnica que se siguió es la publicada por Coligan, J et al, en 1991 con algunas modificaciones. Para ver la técnica en detalle ver anexo.

I. Hibridación In Situ en los Encéfalos.

El estudio de hibridación in situ cuantitativa se realizó en los núcleos paraventriculares del hipotálamo de ratones con tuberculosis pulmonar, con el objetivo de estudiar la expresión del gen de FLC durante la evolución de la enfermedad. Después de sacrificar a los ratones infectados y no infectados (controles), se extrajo cuidadosamente el encéfalo, el cual se congeló por inmersión en nitrógeno líquido depositándolo en una caja de petri para evitar su deformación anatómica. Se obtuvieron cortes de 10 μ de espesor del encéfalo a nivel de los núcleos paraventriculares del hipotálamo, los cuales fueron montados en portaobjetos cubiertos con gelatina. Los cortes se fijaron por inmersión en formaldehído al 10% disuelto en PBS por 5 minutos, después de lavar extensamente los cortes, estos se acetilaron e incubaron con la sonda molecular específica para FLC marcada con fósforo radioactivo a una concentración de 1 μ g por ml por toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Posteriormente las laminillas se lavaron con una solución de SSF al 1 y 4% por 3 ocasiones a 55°C de temperatura. Después de secarla las laminillas se distribuyeron en un cassette y se les sobrepuso una película fotográfica. Después de 3 semanas de exposición, la película fotográfica fue revelada, los núcleos paraventriculares de los hipotálamos de los ratones con tuberculosis pulmonar fueron hibridados con la sonda molecular específica para FLC y fueron cuantificados con la utilización de una cámara de televisión incorporada a una computadora con el sistema de análisis de imagen "Image" de Apple McIntosh. Dicho sistema establece un espectro de diversos tonos de grises lo cual se calibra con una lamilla que contiene diferentes concentraciones del isótopo Carbono 14. De esta manera el programa computacional realiza un análisis densitométrico y expresa en unidades la concentración local del mRNA para FLC. Esto se realizó en Inglaterra, en el laboratorio del Dr. Rook en Londres.

J. Determinación de la corticosterona en suero.

Del suero no hemolizado de 3 ratones inoculados con M. tuberculosis H37Rv se realizó un pool para cada día del 1 al 120 de sacrificio y se realizó la determinación de corticosterona utilizando una técnica basada en radioinmunoensayo en fase sólida con el kit "Coat-a-Count Rat Corticosterone" de Diagnostic Products Corp., que se basa en la utilización de yodo radioactivo que compete en un tiempo dado con la corticosterona en la muestra por los sitios del anticuerpo. Se utilizaron tubos de polipropileno y el conteo se realizó utilizando el contador de rayos gamma ubicado en el Dpto. de Biología de la Reproducción del INNSZ, que produce un número que mediante una curva de calibración convierte las lecturas en medidas de cantidad de la corticosterona presente en la muestra.

K. Realización del trasplante de adrenales.

Las glándulas adrenales pasan por dos fases. En la aguda hay **hipertrofia**, lo que se asocia a niveles elevados de hormonas, por lo que hay una respuesta elevada a la prueba de DTH (prueba de hipersensibilidad tardía) y baja a la inyección de TNF, por lo que se decidió dar una suplementación exógena durante 3 semanas con las hormonas DHEA (Dehidroepiandrosterona) y el AED (Androestenediol) con el fin de perpetuar el patrón Th-1 de citocinas.

Al llegar a la fase crónica, las adrenales se **atrofian**, hay niveles hormonales bajos, por lo que hay una respuesta baja a la reacción de DTH, pero alta al TNF. Se decidió dar una suplementación a partir del día 60 postinfección con las hormonas DHEA y AED, además como una suplementación endógena, más fisiológica, se realizó el trasplante de adrenales de animales más jóvenes a los enfermos. Todo esto se realizó para tratar de revertir el patrón de citocinas a tipo Th-1.

Los donadores fueron ratones sanos machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad y los receptores fueron animales inoculados con *M. tuberculosis* H37Rv con 60 días de infección. Ambos animales fueron anestesiados como se describió anteriormente y la técnica que se siguió es la descrita por Engeland WC, en 1986; que incluye el abordaje quirúrgico por la porción dorsal del animal. Las adrenales fueron partidas transversalmente a la mitad y se depositaron en una especie de bolsa que se hizo con la cápsula del riñón del receptor, permitiendo así que la adrenal trasplantada se irrigara posteriormente. Todo esto se realizó bajo la campana de seguridad biológica.

Después del trasplante adrenal la regeneración histológica ocurren en forma similar a la que sucede después de una enucleación adrenal. Después del trasplante, la necrosis de la médula y la mayoría de la corteza ocurre. La regeneración de las tres zonas corticales se dá desde la cápsula y un borde delgado de células corticales. La regeneración de la corteza es completa en aproximadamente 5 semanas, la médula no regenera. No hay evidencia de que exista reinnervación específica funcional de la adrenales trasplantadas (Wilkinson, 1981).

RESULTADOS

Se dividen en dos aspectos principalmente:

- en la descripción estructural de las alteraciones del eje HHA en la TB pulmonar experimental murina.
- en los efectos de la administración exógena de hormonas para la manipulación del curso de la enfermedad para promover o revertir a la respuesta tipo Th1.

En el modelo experimental de tuberculosis desarrollado en el laboratorio, se ha observado que en la infección con *M. tuberculosis*, la evolución de la enfermedad presenta 2 fases: una fase **aguda** que abarca del día 1 al día 28 postinfección, caracterizada histopatológicamente por las siguientes lesiones en el pulmón: inflamación perivascular, inflamación peribronquial e infiltrado inflamatorio en el intersticio alveolocapilar, las tres de tipo mononuclear y al día 14 hay formación de granulomas. Desde el punto de vista inmunológico, la fase aguda se caracteriza por el predominio de linfocitos CD-4 con patrón de citocinas de tipo 1 (IL-2, INF), elevada producción de IL-1 y TNF, asociada a síntesis relativamente disminuida de TGF- β , lo cual coincide con la máxima respuesta a la prueba de hipersensibilidad tardía a antígenos micobacterianos, que en conjunto mantiene el animal controlando la enfermedad (d.- Hernández-Pando R, et al, 1998).

La fase **crónica** comprende del día 60 al 120. En el pulmón histológicamente se observa: neumonía, necrosis, fibrosis e inmunológicamente presenta un predominio de linfocitos CD-8, con una elevada producción de citocinas linfocitarias de tipo mixto (tipo Th-0), tanto de clase 1 como 2 y también de la citocina anti-inflamatoria TGF- β , en coexistencia con una disminución en la síntesis de IL-1 y TNF, que repercuten en una profunda anergia de la inmunidad celular, con la progresión de la enfermedad y muerte del animal (e.- Hernández, et al, 1998).

1. El Porcentaje de Sobrevida:

A los animales adrenalectomizados y gonadectomizados a los que dos semanas después se les inyectó *M. tuberculosis* vivo y virulento por vía intratraqueal, con tratamiento de DHEA sola o corticosterona sola murieron rápidamente, sobre todo los que recibieron DHEA sola. El examen histológico de los pulmones mostró con ambos tratamientos, el *pulmón de choque*, que se caracteriza por presentar una extensa descamación del epitelio alveolar, material proteináceo o glóbulos rojos extravasados en los espacios alveolares.

Los ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv viva y virulenta, por vía intratraqueal, en general empiezan a morir aproximadamente a los 2 meses de infección; después de 4 meses mantienen un porcentaje de sobrevida del 20 al 30%. Los animales que recibieron AED desde el principio de la enfermedad presentaron una sobrevida hasta del 70% (**Fig. 1**). Mientras que los animales con dos meses de infección que cursan con atrofia adrenal a los que se les administró únicamente DHEA, presentaron mayor mortalidad que los controles. En contraste animales con el mismo

tiempo de infección a los que se les administro AED por vía subcutánea y corticosterona por vía oral, así como a los que recibieron el trasplante adrenal presentaron un porcentaje de supervivencia del 50 y 60% respectivamente, después de seis meses de infección y cuatro meses de tratamiento hormonal o del trasplante (Fig. 2).

2. Reacción de DTH:

La inyección subcutánea en el cojinete plantar de antígenos obtenidos del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* en los animales del grupo control, fue detectada a los 7 días de infección y alcanzó su máximo nivel en el día 21. Después del mes de infección la DTH disminuyó acentuadamente a niveles similares a los observados en el día 7 y así se mantuvo hasta el final del experimento (4 meses). A los ratones infectados a los que se les administró DHEA o AED desde el inicio de la infección, incrementaron en más del doble la DTH durante el primer mes de infección y ésta se mantuvo en ascenso después del mes de evolución de la enfermedad (Fig. 3).

En la fase aguda, exp 95-3, el grupo control presentó en forma muy característica un pico máximo a los 14 días, con un decaimiento paulatino y progresivo, hacia la anergia en el día 120.

Como la DTH es un reflejo del buen funcionamiento de la inmunidad celular, es uno de los parámetros claves para explicar el efecto benéfico del tratamiento hormonal. En el exp 95-3 el aumento progresivo lo logró la DHEA y en segundo lugar quedó el AED, aunque hay un decaimiento hacia el día 120 y esto se explica ya que no se siguió administrando la hormona. Lo contrario ocurrió en el exp 97-2 ya que el incremento fue progresivo en la DTH y permaneció durante todo el experimento comparándolo con el control.

Con respecto a los experimentos en fase avanzada de la enfermedad hubo 4 grupos:

En el exp 95-4 el trasplante adrenal es el más exitoso, alcanzando su punto máximo al día 14, pero después declina progresivamente y esto se explica por la infección misma del trasplante. En la Fig. 4 Panel A foto e, se muestra el corte histológico de un cojinete plantar. En cuanto a la intensidad de la reacción de DTH, quedó en 2o. lugar el tratamiento con AED.

Los animales control mantuvieron niveles bajos de DTH. En comparación, los animales con 2 meses de infección a los que se les transplantaron glándulas adrenales normales, presentaron un rápido incremento de la DTH, la cual se mantuvo elevada pero con cierta tendencia a la disminución en los dos últimos intervalos de observación experimental. En animales con el mismo tiempo de infección a los que se les administro AED y corticosterona, el incremento en la DTH fue gradual, después del séptimo día de tratamiento y hasta el final del experimento la DTH se incrementó acentuadamente (Fig. 5).

3. Peso corporal.

Como ya se explicó, se registró individualmente el peso de cada ratón. Se realizó un análisis estadístico, usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras aleatorias independientes, con la prueba de Wilcoxon para experimentos apareados. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (Statistical Package Science Social) versión 5.0.1 para windows.

Criterio de aceptación o rechazo: Si $Sc \geq St$ ó $Sc \leq St$ se rechaza H_0 .
 H_0 : no son diferentes variable 1 vs variable 2

Donde Sc = el estadístico arrojado por la prueba Mann-Whitney-wilcoxon
 St = el valor encontrado en tablas con un 95% de confianza.

En la fase aguda para el peso corporal se comparó el grupo Control vs. el grupo que recibió la DHEA+C, y así sucesivamente: Control vs. AED+C, DHEA+C vs. AED+C, por día. El resultado fue que en cada día se rechazó H_0 por lo tanto son significativos, si hubo un cambio de un grupo a otro (**Fig. 6**).

4. Alteraciones anatómicas de las adrenales.

A pesar de las diferencias en el peso que existen concernientes a la cepa, sexo y lado de la adrenal, se lograron establecer cambios conforme al peso inicial de la adrenal y los cambios que sufre conforme avanzan los días de la enfermedad. En los días 14 y 21 hay un aumento del peso, mientras que a los días 60 y 120 hay una disminución incluso por debajo del 50 % del peso inicial. A nivel ultraestructural, al analizar los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, se observó un incremento en el grosor de la corteza al comparar el día 14, incluso con la formación de focos de hiperplasia, con una disminución en el grosor de la corteza al día 60.

Correlacionó la aparición de granulomas en el pulmón al día 14 con dicho hallazgo en la adrenal, mientras que también correlacionó el hallazgo de la neumonía con la atrofia que sufre dicha glándula. Analizando con microscopía electrónica, al día 14 las células muestran un citoplasma abundante con numerosas mitocondrias y vacuolas de lípidos, mientras que al día 60 hay una disminución del citoplasma e incluso se llegaron a observar algunas células en apoptosis. Es importante señalar que no se observaron hemorragias, zonas de necrosis o infiltración de micobacterias en las adrenales.

Al observar las electromicrografías con la técnica de rutina (tetraóxido de osmio) y a un aumento de 8 000, se distinguen bien los organelos y diversas estructuras dentro del citoplasma.

En los días 14 y 21 se observó un engrosamiento de la corteza, en su zona central, algunos nódulos de células con grandes vacuolas de lípidos, rodeados por otras células compactas de tipo epitelial, no se observan figuras mitóticas, lo que sugiere que hay una hipertrofia del citoplasma celular.

El citoplasma de las células fasciculares mostró abundante desarrollo del retículo endoplásmico liso, numerosas y grandes mitocondrias con escasas vacuolas de lípidos, todos cambios indicativos de hipertrofia (**Fig. 7**).

Mientras que en el día 60 y 120 hay una gruesa cápsula fibrosa que invade a la corteza, lo que indica una atrofia. Las células de las capas fascicular y reticular de ratones con 1 mes o más de infección mostraron escasos organelos y abundantes lisosomas secundarios o autofagosomas (**Fig. 8**). También se observaron algunas células en apoptosis caracterizadas por presentar condensación de la cromatina (picnosis), con citoplasma encogido y buena preservación de los organelos. A nivel ultraestructural no se observaron micobacterias ni daño directo por inflamación o necrosis.

Los resultados de este estudio fueron publicados en las memorias del III Congreso de la Asociación Mexicana de Microscopía A.C. realizado en Cancún, Q. Roo (Streber JML, 1996).

5. Morfometría de los pulmones.

En los animales infectados control, sin manipulación hormonal, se observó desde el primer día y hasta los 7 días de infección pequeños grupos de linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolocapilar y alrededor de bronquios y vasos sanguíneos. En los días 14 y 21 de la infección, aparecieron granulomas pequeños constituidos por linfocitos y macrófagos. Después del primer mes de infección, los granulomas aumentaron de tamaño y en algunas áreas confluyeron, también se observó consolidación neumónica progresiva con áreas focales de necrosis y fibrosis intersticial, además de nódulos linfoides grandes asociados a paredes vasculares o bronquiales.

La administración de DHEA y AED desde el primer día de infección produjo rápido incremento del infiltrado inflamatorio peribronquial y sobre todo intersticial, puesto que en el primer día de infección el infiltrado intersticial en animales a los que se les administró AED fue cinco veces más extenso que en los controles y el doble en los tratados con DHEA. Posteriormente, desde las dos semanas y hasta los dos meses los animales tratados con DHEA durante las 3 primeras semanas de infección mostraron 500% más inflamación en el intersticio alveolocapilar que en los controles, mientras que los tratados con AED duplicaron el área ocupada por infiltrado también en el intersticio y en comparación a los animales controles. La extensión de la inflamación perivascular y peribronquial en animales tratados con hormonas y controles no presentaron cambios tan dramáticos. En cambio si la administración de los andrógenos adrenales se mantiene durante todo el periodo de observación experimental (4 meses), la extensión de la inflamación intersticial es mayor y más prolongada en los ratones tratados con DHEA a comparación de los controles. El tamaño de los granulomas se duplicó en los ratones a los que se les administró AED durante los 4 meses de infección que durante las 3 primeras semanas.

El signo histológico más importante como indicador de la gravedad de la enfermedad es la neumonía, ya que ésta alteración conduce al animal a la muerte, por pérdida de la función de intercambio gaseoso. La neumonía es progresiva en los

animales control, inicia al mes de infección afectando una área reducida del pulmón y progresa hasta afectar un gran volumen pulmonar. Si se administra AED o DHEA durante todo el curso de la infección, la aparición de la neumonía se retrasa con respecto al día 28 y además el área del pulmón afectado es de 3 a 6 veces menor que en el control pero si la administración de las hormonas se suspende después de la tercera semana de infección, la neumonía no mejora e incluso es mayor en los animales tratados con hormonas que en los controles (**Fig. 9**)

Como se muestra en la **Fig. 9 A)** los animales tratados con andrógenos adrenales al iniciar la infección, presentaron un aumento drástico en el reclutamiento de las células inflamatorias alrededor de los bronquios.

Fig. 9 B) en la fase avanzada de la infección el grupo control presentó granulomas pequeños, a diferencia de los grupos de DHEA y AED que recibieron tratamiento durante toda la infección, cuyo tamaño se incrementó.

Fig. 9 C) el porcentaje de neumonía es el indicador histológico más significativo del agravamiento de la enfermedad. En el grupo control resultó más elevado que en los que recibieron el tratamiento hormonal.

Durante la fase crónica la administración de corticosterona provocó disminución del tamaño de los granulomas con un incremento del área neumónica, comparado con el grupo control. Un efecto totalmente opuesto se observó en los grupos tratados con andrógenos adrenales y corticosterona (**Fig. 10**).

Los resultados mostraron en el último período de tiempo experimental, incremento en el tamaño de los granulomas de hasta el 300% en animales que se trataron con AED más corticosterona o de casi el 100% en los que recibieron trasplante adrenal también con mejoría de la neumonía.

En la **Fig. 4 Panel A** de microfotografías se muestran algunos detalles histológicos en H&E

6. Inmunohistoquímica de los pulmones.

Se realizó el inmunomarcaje para las siguientes citocinas: IL-4, de origen linfocitario y que se utilizan como marcadora de un patrón Th-2 y para el marcate del patrón Th1 se usaron IL-1, IL-2 y TNF.

Durante el primer mes de infección se observó en los animales control mayor porcentaje de CIR (células inmuno-reativas) a IL-2 (Th-1) en la inflamación peribronquial, perivascular, intersticial y en los granulomas. Dicho predominio porcentual fue mayor en los días 14 y 21 de la infección. En los animales infectados y tratados durante las 3 primeras semanas de la enfermedad con DHEA o AED se produjo mayor afluencia de linfocitos inmunoreactivos a IL-2 que en los controles, sobre todo en el día 3 puesto que hay 100% más células Th-1 en la inflamación intersticial, peribronquial y perivascular. En los animales control después del mes de infección, las CIR para IL-4 incrementaron su porcentaje hasta llegar a predominar en el cuarto mes de la enfermedad, sobre todo en la neumonía. Sin embargo, en animales tratados con DHEA o AED desde el primer día y hasta la tercera semana de infección el porcentaje de CIR para IL-4 se mantiene por debajo de los controles manteniendo el predominio

de Th-1 sobre Th-2, este efecto es moderadamente mayor en animales a los que se les administraron las hormonas durante todo el periodo experimental (**Fig. 11**).

En la **fig. 11 A)** se aprecia cómo la IL-2 se expresa aún en fases avanzadas en los grupos tratados con andrógenos adrenales. El grupo control al día 28 P.I. presentó disminución en el porcentaje de células positivas a IL-2 pero con un incremento notable para IL-4. Dicha relación se invierte en los grupos tratados con hormonas.

Fig. 11 B) La IL-4 que corresponde al patrón tipo 2 se expresa en mayor porcentaje en el grupo control.

Las líneas punteadas representan a los animales que sólo recibieron el tratamiento durante las 3 primeras semanas de la infección.

Con respecto a las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF, en los animales control se presentaron varios momentos de máxima expresión: al tercer día y en los días 14, 21 y 28. En animales infectados a los que se les administró AED o DHEA, con sólo 2 dosis de administración hay una producción mucho mayor de ambas citoquinas sobre todo en la inflamación peribronquial y perivascular en los macrófagos. Incluso además de los macrófagos, también las células musculares lisas de las paredes vasculares presentaron intensa inmunorreacción, lo que indicaría que son estimuladas por la hormona y se convierten en una fuente extra de producción de dicha interleucina. Sin embargo, si la administración de ambas hormonas se suspende a la tercera semana de infección, el porcentaje de CIR para TNF e IL-1 disminuye acentuadamente y mantiene proporciones muy similares a las de los animales control. Si la administración hormonal se mantiene durante todo el periodo experimental, el alto porcentaje de CIR para ambas citocinas se mantiene alto y muy por arriba del control en todo el curso de la infección (**Fig 12**).

Durante la fase crónica de la infección, en los ratones control (a partir de los 2 meses), se observó en todos los compartimentos histológicos del pulmón así como en granulomas y neumonía predominio porcentual de las CIR para IL-4 sobre las IL-2. Dicho predominio se fue acentuando a medida que la enfermedad avanzaba. En comparación, los ratones con 2 meses de infección a los que se les administró DHEA o AED más corticosterona, o que recibieron transplante adrenal, los porcentajes de las CIR para IL-4 disminuyeron y las células inmunoreactivas para IL-2 aumentaron, sobre todo después de la tercera semana de la administración hormonal o transplante. Con respecto a las citocinas inflamatorias TNF e IL-1, en el infiltrado inflamatorio intersticial, peribronquial y perivascular las CIR fueron muy escasas y similares tanto en los ratones control como en los de manipulación hormonal. En los granulomas y áreas neumónicas de los animales control, las CIR para TNF e IL-1 se mantuvieron por debajo de todos los intervalos de observación experimental. En comparación los animales tratados con hormonas o portadores del transplante adrenal, mostraron incremento porcentual para interleucinas.

Con respecto a la **Fig. 13**, el panel A y B muestran que el grupo control presentó una disminución progresiva de las células productoras de IL-1 y TNF en los granulomas, dicha disminución se acentúa con la administración de corticosterona sola. Esto se revierte significativamente con la administración combinada de DHEA+C y AED+C.

El aspecto histológico se muestra en el **Panel B** de microfotografías.

Como se muestra en la **Fig. 14 A) y B)** la sola administración de corticosterona acentúa la producción de IL-4 con la concomitante disminución de expresión de IL-2 en los granulomas. Un efecto totalmente opuesto se puede apreciar en los animales que recibieron el tratamiento combinado, tanto en el espacio intersticial, **C y D**, como en las áreas neumónicas, **E y F**.

7. Determinación de UFC en los pulmones.

En la **Fig. 1**, en el inserto superior se muestra cómo la sobrevida correlaciona en forma inversamente proporcional con el número de unidades formadoras de colonias, en el caso del grupo control en la fase aguda.

En la **Fig. 2**, en la parte superior se muestra el porcentaje de sobrevida y en la parte inferior la gráfica de las Unidades Formadoras de Colonias, que muestra que la administración por separado de DHEA y corticosterona al día 60 provocaron mayor mortalidad que en el grupo control. Al administrarse en forma combinada DHEA+C, AED+C la sobrevida mejora notablemente. Los animales que sólo recibieron los glucocorticoides tuvieron una carga bacteriana mayor que el grupo control. En contraste el tratamiento combinado fisiológicamente proporcionado de antiglucocorticoides y glucocorticoides presentó una considerable disminución de las UFC.

8. Expresión de subclases de IgG determinadas por ELISA.

La expresión de las diferentes subclases de Ig son el reflejo de toda una serie de complejos eventos inmunológicos que caracterizan muy bien al tipo de respuesta de que se trate, ya sea tipo Th-1 o Th-2. Se sabe que la Ig G1 es sobre-regulada por IL-4, mientras que IgG 2a e IgG 3 son sobre reguladas por el IFN- γ y regulada su inhibición por IL-4, donde IgG 2b es inhibida por IL-4 (Lawrence, 1994).

Se analizaron los sueros de los animales de estos experimentos por medio de la técnica de ELISA, para la determinación de la expresión de las subclases de inmunoglobulinas G, Ig G1 e Ig G2a, ya que su diferente expresión se asocia según al patrón de secreción de las células T cooperadoras que predominen. El patrón Th1 involucra la expresión de IL-2, IFN- γ , TNF e Ig G2a. En el patrón Th-2 se expresan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 con Ig G1 e Ig E (c.- Hernández-Pando; 1994).

Se realizaron dos tipos de ELISAS: una con la mezcla de los sueros según cada día y por experimento (pool de sueros) y otra con cada suero individualmente.

Los resultados de la fase aguda mostraron los siguiente: (**Fig.15**)

- grupo Control: La D.O. para Ig G2a resultó ligeramente más elevada (0.3) que para Ig G1 (0.2), donde hay un predominio mixto (Th0).
- DHEA a una dosis de 50 μ g/50 μ l de OH: predomina Ig G2a a una densidad mayor (0.9) que que Ig G1, indicando que hay un predominio de un patrón Th1, aún en el día

120, así que se mantiene el patrón que favorece al ratón y provoca control de la enfermedad.

Se decidió analizar por ELISA 2 grupos de AED que recibieron dosis diferentes: **(Fig.16)**

- AED 12.5µg/50µl de A.O. con predominio de Ig G2a (patrón Th1) indicando en la fase aguda que ésta sería la dosis correcta ya que mantiene el patrón que favorece al ratón, y que se requiere la mitad de la dosis que en la fase crónica.
- AED 25µg/50µl de A.O. donde lo anterior se invirtió predominando Ig G1 (patrón Th-2) que es el que favorece a la micobacteria y por lo tanto persiste la enfermedad. Sin embargo ésta dosis es la que se escogió para el siguiente experimento 97-2.

Cuando se realizó la técnica de ELISA para cada suero individual, haciendo cada suero por duplicado, se obtuvo el promedio y desviación estándar, con lo que se observó lo siguiente: **(Fig.17)**

- Control: se invirtió el valor de las D.O. que se dió cuando se hizo el pool, ya que aquí el valor más alto lo tuvo Ig G2a (0.33) pero como Ig G1 dió (0.25), esto se interpretaría como un patrón mixto (Th0).

Los demás grupos se comportaron parecido al resultado obtenido con el pool de cada día.

En la fase aguda al realizar una comparación de la expresión entre los diferentes grupos por promedio de los sueros la D.O. más elevada de Ig G1 al día 60 la dió el grupo de AED 12.5µg/50µl A.O.

Al comparar la Ig G2a por promedio de los sueros, la D.O. más elevada al día 120 la dió el grupo de DHEA 50 µg/50µl OH.

Los resultados de la fase crónica mostraron los siguiente: **(Fig.18)**

Los sueros se analizaron por pool y por suero individual, obteniendo su promedio y desviación estándar.

- Control: al día 180 predominó la Ig G1 (patrón Th-2) con D.O. de 0.85 sobre Ig G2a que dió D.O. 0.2.
- Trasplante adrenal: el resultado fué similar sólo que la D.O. que dió Ig G1 fué menor (0.35).
- AED+C 25µg/50µl A.M. las D.O. tanto para Ig G1 como para Ig G2a para el día 180 tuvieron valores muy parecidos.
- DHEA+C 50 µg/50µl A.O., para el día 180 Ig G1 con una D.O. 0.05, predominó mucho sobre Ig G2a (D.O. 0.2)

Al analizar los sueros individualmente los patrones de Ig G no se modificaron con respecto al análisis por pool; al comparar los grupos para cada subclase de Ig, al día 180 en ambas subclases las D.O. más elevadas las dió el grupo control.

La falta de efecto hormonal es consecuencia de que la enfermedad al día 60 ya está perfectamente establecida por lo tanto es muy difícil revertir sus efectos. Esta observación originó que el siguiente experimento crónico se iniciara al día 28 postinfección con el afán de que dando tratamiento en una fase "crónica temprana" se viera el efecto de cambio de un patrón Th2 a un patrón Th1 por la administración exógena de las hormonas.

En el exp 95-4 no se logró la inversión del patrón, pero en la repetición que se hizo de dicho experimento, el 97-4, si se logró con éxito la inversión hacia Th1.

9. Hibridización in situ en los encéfalos.

En los encéfalos de ratones control, a partir de los cuales se realizaron cortes por congelación utilizando hibridización in situ con sondas de oligonucleótidos para el FLC en el núcleo paraventricular, se observó que la cinética de transcripción del gene de FLC en el hipotálamo de ratones con tuberculosis pulmonar muestra un enorme incremento en la expresión del gen en los días 14 y 21 de la infección que corresponde a una elevación en la producción de IL-1 y TNF, así como el nivel máximo de hipertrofia adrenal, sin embargo hay una disminución en los días 60 y 120 (**Fig. 19**).

10. Determinación de niveles de corticosterona en suero.

Se midieron en sueros de ratones inoculados únicamente con *M. tuberculosis*, por el método de RIA en fase sólida. Se observaron niveles constantes hasta el día 28, pero en el día 60 y 120 hubo una drástica caída (**Fig. 20**).

11. Trasplante de adrenales.

El estudio histológico de las glándulas adrenales transplantadas, mostró extensa necrosis isquémica que afectó a la superficie de la glándula transplantada al tercer día post-transplante. Posteriormente, se produjo tejido de granulación entre la superficie renal y la glándula transplantada con lo cual se revascularizó la glándula y progresivamente se regeneró en su totalidad después de 21 días (**Fig. 4 Panel A, foto b**). Curiosamente, en las adrenales transplantadas se volvió a observar en su superficie cambios de atrofia en el último intervalo de tiempo experimental (día 180).

DISCUSION

La respuesta de protección inmunológica en tuberculosis requiere de la actividad citoquinica Th1, asociada a la función de células citotóxicas T y de macrófagos activados. Sin embargo, tanto en el hombre como en animales de experimentación, cuando la enfermedad progresa y se agrava, se acompaña de un incremento progresivo de las células Th2, este fenómeno es por lo tanto de gran significado en la inmunopatología de la enfermedad. El esclarecimiento de los factores que inducen a este desbalance Th-1/Th-2 tiene por lo tanto una enorme importancia en el conocimiento de los mecanismos fundamentales de la enfermedad, además la manipulación de éstos mecanismos y su posible control, permitirán potenciar al sistema inmunológico para lograr una mejor respuesta al tratamiento. Dado que los andrógenos adrenales son potentes activadores de la respuesta Th1, mientras que los glucocorticoides lo son de las células Th2, surgió el objetivo del presente trabajo, estudiar la estructura y función del EHHA en correlación con la histopatología e inmunopatología del pulmón en un modelo experimental de tuberculosis.

Los resultados muestran que en ratones con TB experimental se produce hipertrofia de las adrenales, la cual alcanza su máximo nivel en la segunda y tercera semana de la infección en asociación a una fase temprana de la enfermedad en la que predomina la respuesta Th1. Posteriormente, se produce atrofia de las glándulas adrenales, con disminución en el peso de hasta 50% al día 60 de infección y una actividad mixta Th-1+Th2 (Th0). Es importante enfatizar que ninguno de estas alteraciones es debida a la infección directa de las glándulas adrenales por *M. tuberculosis*.

La hipertrofia adrenal producida en las primeras 3 semanas de la infección es seguramente producida por la activación del eje HHA por las citocinas inflamatorias TNF e IL-1. Ya que el máximo nivel de hipertrofia adrenal observado en el día 14-21 de infección coincide con el máximo nivel de producción del ARNm del FLC demostrado por hibridación in-situ cuantitativa en las neuronas de los núcleos hipotalámicos paraventriculares y se correlaciona también con un segundo momento máximo de producción de TNF e IL-1 por parte de los macrófagos activados localizados en el espacio intersticial y en los granulomas. Es también en este momento cuando en los mismos granulomas, así como en el infiltrado inflamatorio intersticial y peribronquial existen abundantes linfocitos productores de IL-2 con menor porcentaje de los linfocitos inmunoreactivos a IL-4. Es entonces en esta fase de la infección cuando la actividad inmunológica de tipo 1 es máxima, puesto que la DTH producida por antígenos micobacterianos alcanza su nivel más alto. Teóricamente los andrógenos adrenales también deben de producirse en gran cantidad en este momento, entre éstos la DHEA debe de encontrarse en altas concentraciones en sangre estimulando y potenciando a los linfocitos Th-1.

A diferencia de lo que sucede en los humanos, la DHEA es producida en pequeñas cantidades en los ratones, por esta razón no fué posible determinar su concentración en orina colectada de animales infectados, a diferencia del estudio de la

actividad productora de hormonas adrenales en pacientes con tuberculosis pulmonar analizada por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas en orina (f.- Rook GAW, 1996), ya que este estudio mostró que los pacientes con tuberculosis reciente no tratada, tenían incremento en la producción de esteroides adrenales, incluida la DHEA. Existe por lo tanto una respuesta hormonal similar en humanos y ratones con tuberculosis en estadios tempranos de la infección por *M. tuberculosis*.

En la fase aguda se demostró que la DHEA o su derivado tiene efectos protectores en el modelo de TB pulmonar murina. Este efecto correlaciona con el mantenimiento elevado de células protectoras de IL-2 sobre las IL-4, así como elevadas expresiones de IL-1 α y TNF α y una mayor respuesta de DTH. A nivel histológico esto se traduce en un cambio de neumonía a granuloma. El AED es más potente que la DHEA y provoca una disminución más efectiva de las UFC, además de una mayor expresión de TNF α en los granulomas tempranos y en las zonas de infiltrado peribronquial. En contraste la DHEA que se pensaría es menos efectiva resulta que induce mejores respuestas de DTH, lo cual podría indicar una correlación entre la DTH y la protección.

La inducción temprana de IL-2 y TNF α en los infiltrados inflamatorios resulta muy importante ya que esto no se acompaña por una caída inmediata en la carga bacteriana con el tratamiento durante las 3 primeras semanas y sobretodo si no se continúa éste. Los cambios que se observan en el día 60 después del tratamiento de 3 semanas refleja que se redujo la carga bacteriana en esos ratones. Sin embargo al comparar el tratamiento continuo, se demostró que la administración de los andrógenos adrenales durante la fase tardía de la infección es relevante.

Previamente se ha demostrado que el TNF puede ser tóxico en un patrón mixto Th1+Th2, como se ha visto en este modelo experimental y está relacionado con el componente Th2, que es mínimo cuando la respuesta presente es la Th1. Esto puede ayudar a explicar el hecho de que el incremento en la expresión fué asociado con la protección más que con el incremento en la inmunopatología y existe un cambio simultáneo hacia una respuesta dominada por Th1 en el mismo nivel.

Es posible que la administración de DHEA o AED bloquee un mecanismo fisiológico que usa el incremento en glucocorticoides, lo que se refleja en la hipertrofia adrenal, para terminar la respuesta temprana a Th1 y que se deriva hacia Th2. La modulación de la respuesta Th1 después de 3 semanas de tratamiento es claramente prematura en el ratón con TB pulmonar.

Lo más importante serían las implicaciones que tiene esto para la TB humana. Sin embargo la fisiología de la DHEA en roedores es claramente diferente de la fisiología en el humano, pues la cantidad detectable en el suero es muy baja comparada con los humanos.

También es importante recordar los hallazgos en cuanto a susceptibilidad asociada a la edad y la TB, pues se ha visto que es muy alta en niños menores de 5 años y que se caracteriza por presentar en el pulmón consolidación y neumonía sin cavitaciones, éstos niños tienen niveles bajos de DHEAS. Por otro lado, los niños de 5 a 10 años son resistentes a la TB, presentan niveles intermedios de DHEAS. La

susceptibilidad regresa en la pubertad, cuando los niveles de DHEAS alcanzan los niveles de los adultos. Los aspectos patológicos de éstos pulmones cambian, hay cavitación y necrosis, como en la enfermedad en el adulto. Sin embargo, la relación DHEA/glucocorticoides es muy delicada, pues un exceso de DHEA puede provocar un daño tisular, mientras que poco puede provocar el cambio hacia Th2, como pasó en los ratones que sólo se les administró DHEA sola.

Los resultados obtenidos de este modelo experimental y las observaciones en los pacientes tuberculosos, condujeron a realizar experimentos terapéuticos en el modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar. En la fase temprana de la enfermedad que se caracteriza por el predominio de la respuesta inmunológica de tipo 1 e hiperplasia adrenal, se reforzó con la administración exógena de DHEA o su análogo AED, lo cual contribuyó a disminuir el daño tisular y la carga bacilar con mejoría de la sobrevida. Paradójicamente, cuando se administró DHEA en animales con tuberculosis avanzada en los que existe atrofia acentuada de las adrenales, con un balance mixto Th-1+Th-2 y con mayor daño tisular, la enfermedad no sólo no se controló, sino que se presentó una acelerada mortalidad. El mismo fenómeno se observó cuando se reprodujo experimentalmente las condiciones metabólicas de los ratones con tuberculosis avanzada, al adrenalectomizar y gonadectomizar a los animales de experimentación para posteriormente inocularles la *M. tuberculosis* por vía intratraqueal y administrarles por separado DHEA o corticosterona sola. La explicación de este fenómeno es el efecto sistémico que tiene la DHEA y su relación funcional con los glucocorticoides; ya que la DHEA además de ser una hormona antagónica de los glucocorticoides a nivel inmunológico tiene efecto sobre la actividad de los linfocitos T CD-4, también se opone al resto de sus diversas funciones metabólicas sistémicas (a-Regelson, 1994).

Aunque los glucocorticoides son hormonas anti-inflamatorias y al estimular a las células Th-2 favorecen la progresión de la enfermedad, también tienen un efecto benéfico al permitir superar el intenso estrés fisiológico que animales con tan avanzada enfermedad deben estar sufriendo. Luego entonces, cuando animales con disminución en la producción de glucocorticoides endógenos por atrofia adrenal extensa que están sometidos a intenso stress fisiológico como consecuencia de su enfermedad infecciosa pulmonar se les administra una hormona antagonista de los glucocorticoides como la DHEA, el animal pierde la capacidad de tolerar el estrés y muere. La confirmación de esta explicación fue la mejoría en la sobrevida de los animales tratados con DHEA mas corticosterona (el principal glucocorticoide en murinos). En éstos ratones también se obtuvo reactivación parcial de la respuesta tipo 1 (mayor producción de IL-2, TNF e IL-1) manifestada sistémicamente por una alta respuesta de DTH a antígenos micobacterianos y disminución de la carga bacilar. Una respuesta similar se observó en animales a los que se les trasplantaron adrenales de ratones sanos, dicha respuesta de tipo 1 fue mayor en la tercera y cuarta semana post-transplante momento en el que la restitución y preservación de las glándulas transplantadas analizadas histológicamente fue máxima. Sin embargo en estos animales también se observó después de 4 meses del transplante cierto grado de lesión necrótica en las glándulas transplantadas, lo cual indica que, el o los factores inductores de la atrofia adrenal siguen vigentes pero actúan con menor intensidad.

Por otro lado la atrofia de las glándulas adrenales que acompaña a la fase crónica de la enfermedad seguramente se asocia a disminución en la producción hormonal, lo cual a su vez contribuye a alterar el balance Th1/Th2. Si esta hipótesis es correcta la sustitución de las adrenales atroficas por glándulas sanas o la administración exógena de glucocorticoides y andrógenos adrenales debe modificar las alteraciones histológicas de los pulmones con tuberculosis experimental, por ésta razón se decidió realizar el trasplante adrenal. Pero de hecho la atrofia adrenal es más difícil de explicar, ya que sustancias derivadas de las micobacterias o las mismas citocinas pudieran ser la causa de dicha atrofia. En relación a esto, existen ciertas citocinas inmunomoduladoras como es el factor de transformación tumoral β (TGF- β) que es capaz de inducir muerte por apoptosis en células cultivadas de glándula adrenal fetal (Stankovic, 1994).

En este mismo modelo de TB pulmonar se ha reportado recientemente que TGF- β se produce abundantemente en la fase crónica de la infección, lo cual contribuye a la anergia de la inmunidad celular por actividad directa puesto que el TGF es una potente citocina inmunosupresora e indirectamente porque es también un estimulador de las células Th-2 (b.- Hernández, 1997). Además, el TGF- β también puede influir indirectamente en el desbalance Th-1/Th-2 al originar atrofia de las adrenales. Teóricamente, la atrofia adrenal produciría disminución en la síntesis y secreción de DHEA, y en consecuencia las células Th-1 dejarían de tener uno de sus factores tróficos mas importantes lo cual explicaría parcialmente el desbalance Th-1/Th-2 característico de la fase avanzada de la enfermedad. En apoyo a esta hipótesis, esta la observación de que en pacientes con tuberculosis avanzada no tratada existe una disminución de 50% en la secreción de DHEA y cortisol por las glándulas adrenales (h.- Rook GAW, et al, 1997). Sin embargo, los niveles de cortisol plasmático son normales o ligeramente elevados mientras que los de DHEA se encuentran muy disminuidos. Esto significa que aunque la producción adrenal de cortisol, potente activador TH-2, esta disminuida a la mitad de lo normal, su concentración en plasma es normal o elevada lo cual se explica por anomalías en la actividad degradativa de esta hormona esteroidea en los tejidos periféricos como hígado, riñones o incluso pulmón.

Otro aspecto importante es el hecho de que el ciclo circadiano de producción del cortisol en pacientes tuberculosos es anormal. En humanos normales los glucocorticoides se producen y alcanzan su máxima concentración durante la mañana, estos disminuyen en el transcurso del día llegando a su nivel mas bajo durante la tarde y noche, mientras que los pacientes con TB avanzada tienen niveles constantemente altos o normales sin las fluctuaciones circadianas de los sujetos normales, esto provoca que los tejidos de los pacientes con tuberculosis estén permanentemente expuestos a los glucocorticoides, lo cual aunado a la disminución en la concentración de DHEA, nos permite proponer a estas anomalías endocrinológicas como uno de los factores inductores mas importantes del desbalance Th-1/Th-2 de la tuberculosis avanzada.

Durante la fase crónica el hallazgo crucial es el efecto terapéutico acompañado de un cambio hacia el perfil de citocinas de tipo 1 con un incremento en la expresión de IL-1 α y TNF α que se demuestra en una fase muy avanzada de la TB en el modelo

murino, como consecuencia de administrar la combinación de GC y dos anti-GC mientras que la administración en forma individual es fatal.

Esto enfatiza la importancia del sistema neuroendócrino en esta enfermedad, además de que la manipulación de la respuesta inmune a la infección por este microorganismo puede influir en la expresión de citocinas en una forma terapéutica muy útil.

En este modelo la DHEA no sólo incrementó la expresión de citocinas Th1 sino también la de citocinas pro-inflamatorias como son la IL-1 y TNF α .

En este estudio los esteroides no se administraron hasta el día 60 a los ratones BALB/c cuando la TB pulmonar ya está bien establecida y con un cambio en el perfil de citocinas hacia Th2 con atrofia adrenal. La atrofia adrenal se acompañó de un decremento en la expresión de CRH en los núcleos paraventriculares, lo que sugiere que ciertos mecanismos centrales están involucrados. Para explicar la atrofia adrenal también está el efecto de la respuesta Th2 sobre las glándulas.

Sin embargo si se administra corticosterona sola a partir del día 60 no solo falla en tener un efecto terapéutico, sino también en provocar la pérdida de la expresión de IL-1 y TNF α , además de provocar un cambio hacia una sobreexpresión de IL-4 y conducir a la muerte.

Todos éstos datos del peso bajo de la adrenal, niveles reducidos de corticosterona y expresión baja de FLC en el NPV puede reflejar la necesidad fisiológica en esta etapa de la infección. Sin embargo, a medida que se incrementan los niveles de corticosterona, también existe la necesidad de incrementar los niveles de DHEA o AED. Lo cual evidencia la estrecha relación entre estos 2 esteroides.

De esta forma, este estudio provee la evidencia directa de las propiedades sinérgicas de la combinación apropiada de un GC y un anti-GC. Sin embargo sólo se estudió, la dosis de reemplazo de GC en forma fisiológica pero se requieren más estudios para descubrir cuando el cambio a Th1 puede ser incrementado en forma más precisa y ajustar la relación DHEA+C y AED+C o concebir dosis más bajas de éstos sin usar corticosterona.

Por otro lado el metabolismo anormal de los glucocorticoides en pacientes con tuberculosis puede deberse a un incremento en la actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual tiene un efecto dual puesto que por su actividad convierte al principio activo *cortisol* en el metabolito inactivo *cortisona* en riñón y pulmón normal, pero la misma enzima puede tener un efecto totalmente opuesto, es decir convertir la cortisona en cortisol; este efecto se realiza normalmente en el hígado y podría aparecer en el pulmón cuando es portador de un evento patológico infeccioso tan extenso como es la TB (Hundertmark-S; 1994). En la tuberculosis avanzada existe atrofia adrenal con disminución en la producción de DHEA y glucocorticoides, sin embargo estos últimos se pueden metabolizar anormalmente en el pulmón al convertir enzimáticamente metabolitos inactivos en formas activas o por sobrestimulación de las citocinas de este proceso metabólico del hígado. Cualquiera de las dos fenómenos o ambos, actuando simultáneamente producirían local y sistémicamente una actividad permanente de las hormonas estimuladoras de los linfocitos Th2, lo cual, aunado a la

disminución en la concentración sistémica de esteroides androgénicos adrenales promotores de la actividad de Th1 (DHEA) contribuirían al desbalance Th-1/Th-2.

Los resultados obtenidos en el modelo experimental y las observaciones realizadas en conjunto en pacientes humanos, permiten integrar al eje HHA en la compleja patogenia de la tuberculosis, la reconstitución experimental de su actividad funcional puede contribuir en el tratamiento de dicha infección coadyuvando al tratamiento farmacológico existente.

CONCLUSIONES

La inmunidad protectora en este tipo de enfermedades infecciosas crónicas requiere del patrón de secreción de citocinas de tipo 1, sin embargo éste patrón es substituido por el de tipo 2, con lo que el animal prefiere evitar el daño tisular pero surge la progresión de la enfermedad y su agravamiento, que culmina en la muerte.

Los resultados del presente trabajo mostraron que durante la fase aguda de la infección (primer mes), existe un predominio de la respuesta de las citocinas tipo 1 con el control parcial de la enfermedad, asociado a hipertrofia de las glándulas adrenales. Posteriormente, cuando la enfermedad progresa a la fase crónica o avanzada (2-4 meses), se instala un patrón mixto (Th-1/Th-2) en coexistencia con atrofia acentuada de las adrenales. El trasplante de adrenales sanas o la administración conjunta de DHEA+corticosterona en animales en la fase avanzada de la enfermedad (2 meses de infección), produce una restitución parcial de la respuesta tipo 1 y como consecuencia una notable sobrevida. La administración de DHEA o su derivado androstenediol (AED) desde el inicio de la infección, produce un predominio de la respuesta tipo 1 por mayor tiempo, mejorando también la sobrevida y disminuyendo el daño tisular.

BIBLIOGRAFIA

- Angulo-JA, McEwen-BS. Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain-Res-Rev* 19 (1): 1-23, 1994
- Anónimo: IV The Adrenal. En: 3 Endo. *Scientific American Bulletin XX* (2). 1-17, 1997
- Agarwall MK. Receptors for mammalian steroid hormones in microbes and plants. *Fed Eur Biochem Soc*, 332, 207, 1993
- Araneo-BA, Woods ML, Daynes RA. Reversal of the immunosenescent phenotype by dehydroepiandrosterone hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 167: 830-46, 1993
- a- Araneo-B; Daynes-R. Dehydroepiandrosterone functions as more than an antigluocorticoid in preserving immunocompetence after thermal injury. *Endocrinology* 136 (2) 393-401, 1995
- b- Araneo-B, Dowell-T, Woods-ML; Daynes-R; Judd-M, Evans-T. DHEAS as an effective vaccine adjuvant in elderly humans. Proof-of-principle studies. *Ann-N-Y-Acad-Sci* 29; 774, 232-48, 1995
- Armstrong WE. Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei en: *The Rat Nervous System*, vol.1 Forebrain and midbrain. Paxinos G (ed.), Academic Press, Australia, 1985
- Atkinson, HC & Waddell BJ. The hypothalamic- pituitary- adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. *Endocrinology* 136: 512-520, 1995
- Azad-N; Agrawal-L; Emanuele-MA, Kelley-MR; Mohaghehpour-N; Lawrence-AM; Emanuele-NV. Neuroimmunoendocrinology. *Am-J-Reprod-Immunol* 26 (4): 160-72, 1991
- Balasubramanian-V; Wiegshaus-EH; Taylor-BT; Smith-DW; Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber-Lung-Dis* 75(3): 168-78, 1994
- Baliko-Z, Szereday-L; Szekeres-Bartho-J. Gamma/delta T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Thorax* 52 (4) 375-7, 1997
- Barnes DJ, Naraqi S, Temu P, Turtle JR. Adrenal function in patients with active tuberculosis. *Thorax* 44: 422-424, 1989
- Bartafai T, Andersson C & Bristluf J. IL-1 and noradrenergic chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *Ann N.Y Acad Sci* 594: 207-213, 1990
- Bates JH & Stead WW: The history of tuberculosis as a global epidemic. En: Bass JB (ed): *Tuberculosis. The Medical Clinics of North America* 77 (6): 1205-1217, 1993
- Baulieu-EE; Robel-P. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J-Endocrinol* 150 Suppl: S221-39, 1996
- Baulieu-EE: Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent-Prog-Horm-Res* 52: 1-32, 1997
- Baxter-JB, Blalock-JE; Weigent-DA. Expression of immunoreactive growth hormone in leukocytes in vivo. *J-Neuroimmunol* 33 (1) 43-54, 1991
- Beamer WG, Wilson MC & Leiter EH. *Endocrinology*. En. Foster HL, Small JD, Fox JG (ed.). *The Mouse in Biomedical Research*, vol.III, Academic Press, San Diego, 1983
- Beato M. Gene regulation by steroids hormones, *Cell* 56, 335-344. 1989
- Benson CV (serie ed.): Analysis of proteins, chapter 10, in: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds). *Current Protocols in Molecular Biology*, vol 2, John Wiley & Sons, 1997
- Berg JP & Haug E. Vitamin D. A hormonal regulator of the cAMP signaling pathway. En: Parish EJ, Nes WD (ed) *Biochemistry and Function of Sterols*, Boca Raton, Florida, CRC Press, 221-229, 1997
- Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelker, KR, Manogue, Cerami A & Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365 oct 758-759, 1993
- Bertini R, Bianchi M & Ghezzi P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of IL-1 and TNF. *J Exp Med* 167: 1708-1712, 1988

- Besedovsky, HO & Del Rey A. Metabolic and endocrine actions of IL-1: effects on insulin resistant animals. *Ann N.Y. Acad Sci* 594: 214-221, 1990
- Besedovsky, HO & Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27: 1-12, 1977
- Bienkowski-RS; Gotkin-MG. Control of collagen deposition in mammalian lung. *Proc-Soc-Exp-Biol-Med* 209 (2): 113-119, 1995
- Biondi-M; Zannino-LG. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. *Psychother-Psychosom* 66 (1): 3-26, 1997
- Black-PH: Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob-Agents-Chemother* 38 (1): 1-6, 1994
- a - Blalock-JE. Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Chem-Immunol* 52: 1-24, 1992
- b.- Blalock-JE: The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol-Today* 15 (11): 504-11, 1994
- c - Blalock-JE. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. *Ann-N-Y-Acad-Sci* 25; 741: 292-8, 1994
- Bothamley GH & Grange JM. The Koch phenomenon and delayed hypersensitivity: 1891-1991. *Tubercle* 72: 7-11, 1991
- Bloom BR (ed.): *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, American Society for Microbiology Press, Washington, D C, 1994
- Brown M, Koob R, Rivier GF (ed): *Stress neurobiology neuroendocrinology*, Marcel Dekker, New York, 1991
- Buckingham-JC; Loxley-HD, Taylor-AD, Flower-RJ: Cytokines, glucocorticoids and neuroendocrine function. *Pharmacol-Res.* 30 (1): 35-42, 1994
- a- Buckingham-JC: Fifteenth Gaddum Memorial Lecture December 1994. Stress and the neuroendocrine-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *Br-J-Pharmacol.* 118 (1): 1-19, 1996
- b- Buckingham-JC; Loxley-HD; Christian-HC; Philip-JG: Activation of the HPA axis by immune insults: roles and interactions of cytokines, eicosanoids, glucocorticoids. *Pharmacol-Biochem-Behav.* 54 (1): 285-98, 1996
- Calandra T, Berhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A & Bucala R: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377, sept: 68-71, 1995
- Carlson HE. Current concepts. Gynecomastia. *N Engl J Med* 3033: 795-799, 1980
- Carlsten, H.: Impaired cutaneous DTH. *Int Arch Allergy Immunol* 81: 322-325, 1986
- Castro-MG; Morrison-E: Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit-Rev-Neurobiol* 11 (1): 35-57, 1997
- Chignard M, Petrolani M, Renesto P & Vargafing BB: Cells and cytokines in lung inflammation. *Annals N. Y. Acad Sci* 725 (5), 1994
- Cohen-MC; Cohen-S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am-J-Clin-Pathol.* 105 (5): 589-98, 1996
- Coligan, JE, Kruisbeek, AM, Margulies, DH, Shevach, EM and Strober, W. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, 1991
- Converse-PJ; Jones-SL; Astemborski-J, Vlahov-D, Graham-NM: Comparison of a tuberculin interferon-gamma assay with the tuberculin skin test in high-risk adults. effect of human immunodeficiency virus infection. *J-Infect-Dis.* 176 (1): 144-50, 1997
- Conti B, Jahng JW, Tinti C, Son JH & Joh TH. Induction of interferon- γ inducing factor in the adrenal cortex. *J Biol Chem* 272 (4): 2035-2037, 1997
- Cook MJ: Anatomy. in: Foster HL, Small JD, Fox JG (ed): *The Mouse in Biomedical Research*, vol III, Academic Press, San Diego, 1983
- Costello-AM; Rook-G: Tuberculosis in children. *Curr-Opin-Pediatr* 7 (1): 6-12, 1995
- Clarke-BL; Moore-DR; Blalock-JE. Adrenocorticotrophic hormone stimulates a transient calcium uptake in rat lymphocytes. *Endocrinology.* 135 (5): 1780-6, 1994

- Cunniff-Beamer TL. *Biomethodology and surgical techniques* en: Foster HL, Small JD, Fox JG (ed) *The Mouse in Biomedical Research*, vol III, Academic Press San Diego, 1983
- Danenberg-HD, Ben-Yehuda-A, Zakay-Rones-Z, Friedman-G. Dehydroepiandrosterone enhances influenza immunization in aged mice. *Ann-N-Y-Acad-Sci* 774 (12), 297-9, 1995
- a- Daynes, RA & Araneo, BA. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factor IL-2 and IL-4. *Eur J Immunol* 19 2319-2325, 1990
- b- Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K, Dudley D: Regulation of murine lymphokine production in vivo III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med* 171, 979-96, 1990
- c- Daynes-RA, Araneo-BA, Hennebold-J; Enioutina-E; Mu-HH. Steroids as regulators of the mammalian immune response. *J Invest-Dermatol* 105 (1 Suppl) 14S-19S, 1995
- De-Kloet-ER; Oitzl-MS; Schobitz-B. Cytokines and the brain corticosteroid receptor balance: relevance to pathophysiology of neuroendocrine-immune communication. *Psychoneuroendocrinology* 19 (2) 121-34, 1994
- Delrue-C; Deleplanque-B, Rouge-Pont-F; Vitello-S; Neveu-PJ. Brain monoaminergic, neuroendocrine, and immune responses to an immune challenge in relation to brain and behavioral lateralization. *Brain-Behav-Immun* 8 (2) 137-52, 1994
- DeRijk-RH; Boelen-A; Tilders-FJ; Berkenbosch-F: Induction of plasma interleukin-6 by circulating adrenaline in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 19 (2): 155-63, 1994
- De-Souza-EB: Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20 (8): 789-819, 1995
- De-Wit-D; Wootton-M, Dhillon-J, Mitchison-DA. The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis. *Tuber-Lung-Dis* 76 (6) 555-562, 1995
- Dhabhar-FS; Miller-AH, McEwen-BS; Spencer-RL: Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J-Immunol*. 154 (10) 5511-27, 1995
- Dhabhar-FS, Miller-AH; McEwen-BS, Spencer-RL. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J-Immunol*. 157 (4): 1638-44, 1996
- Diagnostic Products Corporation: Coat-A-Count, Rat Corticosterone, Los Angeles, CA, 1997
- Dinarello-CA: Interleukin-1 in disease. *K-J-Med* 43 (3): 131-6, 1994
- Dirección General de Epidemiología. Boletín de Epidemiología no. 48, vol 14, semana 48, 23 al 29 nov. 1997, pag.7, México, D.F.
- a - Dirección General de Epidemiología. Boletín de Epidemiología no.10, vol 15, semana 10, del 8 al 14 de marzo de 1998, pag 7, México, D.F.
- b.- Dirección General de Epidemiología. Boletín de Epidemiología no.11, vol 15, semana 11, del 15 al 21 de marzo de 1998, pag.7, México, D.F.
- Dirección General de Epidemiología. Boletín de Epidemiología no 52, vol 16, semana 52, del 26 de diciembre al 1o. de enero del 2000, pag 7, México, D.F.
- Dubois PM, El Amraoui A. Embryology of the pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab* 1995 6 1-7.
- Doniach Y: Histopathology of the pituitary. *Clin Endocrin Metab* 14 765, 1985
- Draca-SR: Endocrine-immunological homeostasis: the interrelationship between the immune system and sex steroids involves the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Panminerva-Med*. 37(2): 71-6, 1995
- Eglezos-A; Andrews-PV, Boyd-RL, Helme-RD. Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunol-Cell-Biol*. 69 (Pt 4) 285-94, 1991
- Ehlers S, Mielke MEA & Hahn H: Progress in TB research. Robert Koch's dilemma revisited. *Immunol Today* 15 (1) 1-3, 1994
- Ellis ME and Tayoub F. Adrenal Function in tuberculosis. *Br. J. Dis. Chest* 80: 7-12, 1986
- Ellner JJ: Current issues in tuberculosis. *J Lab Clin Med* 123 478-484, 1994
- Endoh A, Kristiansen SB, Casson PR, Buster JE & Hornsby PJ. The zona reticularis is the site of biosynthesis of DHEA and DHEAS in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 81 3558-3565, 1996

- Engeland WC Pituitary-adrenal function after transplantation in rats: dependence on age of the adrenal graft. *Am J Physiol* 205 (Endocrinol Metab 13): E87-E93, 1985
- Fennelly KP Personal respiratory protection against M. tuberculosis. En: Iseman MD & Hult GA (ed): *Tuberculosis, Clinics in Chest Medicine* 18 (1): 1-17, 1997
- Foster HL, Small JD, Fox JG. *The Mouse in Biomedical Research vol. I History, Genetics and Wild Mice*. Academic Press, San Diego, 1981
- Fleisher-Berkovich-S; Danon-A. Effect of corticotropin-releasing factor on prostaglandin synthesis in endothelial cells and fibroblasts. *Endocrinology* 136 (9): 4068-72, 1995
- Flood, JF Morley, JE & Roberts E Memory enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1567-1571, 1992
- Friedman-EM, Irwin-MR. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol-Ther* 74 (1): 27-38, 1997
- Fuchs-E; Flugge-G Modulation of binding sites for corticotropin-releasing hormone by chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 20 (1): 33-51, 1995
- Galin-FS; LeBoeuf-RD, Blalock-JE. Corticotropin-releasing factor upregulates expression of two truncated pro-opiomelanocortin transcripts in murine lymphocytes. *J-Neuroimmunol* 31 (1): 51-8, 1991
- Gangadharam-PR. Mycobacterial dormancy [editorial]. *Tuber-Lung-Dis* 76 (6): 477-479, 1995
- Garcia-de-Yebenes-E; Hong-M; Pelletier-G: Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on pituitary prolactin and arcuate nucleus neuron tyrosine hydroxylase mRNA levels in the rat. *J-Neuroendocrinol.* 7 (8): 589-95, 1995
- Garcia-Sainz JA: Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch Med Res* 26 (3): 205-212, 1995
- Gawienowski AM: Integration of the metabolic pathways of steroids, carotenoids and retinoids. En: Parish EJ, Nes WD (ed). *Biochemistry and Function of Sterols*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 263-268, 1997
- Gilman, AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (ed) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, USA, 1990
- Gonzalez-Hernandez-JA, Bornstein-SR; Ehrhart-Bornstein-M; Geschwend-JE; Adler-G, Scherbaum-WA. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell-Tissue-Res* 278 (2): 201-5, 1994
- Guarcello-V; Weigent-DA, Blalock-JE, Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell-Immunol.* 136 (2): 291-302, 1991
- Gude, WD, Cosgrove, GE & Hirsch, GP. *Histological Atlas of the Laboratory Mouse*, Plenum Press, New York, 1982
- Hamlin MH, Banas DA. *Adrenal Gland*, en: *Pathology of the Fischer Rat, Reference and Atlas*, Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA & Mackenzie WF (ed), Academic Press, San Diego, 1990
- Hanisch-UK; Rowe-W, Sharma-S, Meaney-MJ, Quirion-R: Hypothalamic-pituitary-adrenal activity during chronic central administration of interleukin-2. *Endocrinology* 135 (8): 2465-72, 1994
- Harris-DP; Vordermeier-HM; Arya-A, Moreno-C; Ivanyi-J: Permissive recognition of a mycobacterial T-cell epitope: localization of overlapping epitope core sequences recognized in association with multiple major histocompatibility complex class II I-A molecules. *Immunology* 84 (4): 555-61, 1995
- a.- Hernández-Pando-R, Orozco-H, Honour-J; Silva-P; Leyva-R; Rook-GA: Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis, a clue to pathogenesis?. *FEMS-Immunol-Med-Microbiol.* 12 (1): 63-72, 1995
- b.- Hernández-Pando-R, Orozco-H, Arriaga-K, Sampieri-A; Larriva-Sahd-J; Madrid-Marina-V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 90 (4): 607-17, 1997
- c.- Hernández-Pando-R; Rook-GA. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82 (4): 591-5, 1994
- d.- Hernández-Pando R, Streber Ma de la Luz, Orozco EH, Arraga AK, Pavón RL, Al-Nakhli AS & Rook GAW. The effects of androstenediol and the dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology* 95: 2334-241, 1998

- e - Hernández Pando, Streber Ma. de la Luz, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Al-Nakhil SA, Martí O, Lightman S and Rook GA Emergent immunoregulatory properties of a combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *Q. J. Med* 91 755-766, 1998
- Hill RA, Makin HLJ, Kirk DN & Murphy GM. Dictionary of steroids, chemical data, structures and bibliographies. Chapman & Hall, London, 1991
- Hirsch LJ, Mazzone, T. Dexamethasone modulates lipoprotein metabolism in cultures human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 77 (2): 485-490, 1986
- Homo-Delarche-F; Fitzpatrick-F; Christeff-N, Nunez-EA, Bach-JF; Dardenne-M: Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol.* 40 (4-6): 619-37, 1991
- Hori-T, Katafuchi-T; Take-S; Shimizu-N; Nijima-A: The autonomic nervous system as a communication channel between the brain and the immune system. *Neuroimmunomodulation* 2 (4) 203-15, 1995
- Horsby PJ: Biosynthesis of DHEA by the human adrenal cortex and its age-related decline. *Ann NY Acad Sci* 774 29-46, 1995
- Horvath E & Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech* 8:401-32, 1988
- Horvath E, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV: Regional Neuropathology. Hypothalamus and Pituitary, chapter 17, en: Graham DI, Lantos PL: *Greenfield's Neuropathology*, 6 th ed, Arnold, London, 1997
- Hundertmark-S; Ragosch-V; Schein-B; Buhler-H; Lorenz-U; Fromm-M; Weitzel-HK: Gestational age dependence of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the enzymes of phosphatidylcholine synthesis in lung and liver of fetal rat. *Biochim-Biophys-Acta.* 20; 1210 (3): 348-54, 1994
- Imura-H: Adrenocorticotrophic hormone, en: De Groot, LJ (ed): *Endocrinology*, vol 1, W.B. Saunders, Philadelphia, 1995
- Inouye-ST; Shibata-S Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci-Res* 20 (2): 109-30, 1994
- Iochim HL: *Pathology of Granulomas*. Raven Press, New York, 1983
- Irwin-M: Brain corticotropin-releasing hormone- and interleukin-1 beta-induced suppression of specific antibody production. *Endocrinology* 133 (3): 1352-60, 1993
- Ito M Radioautographic studies in aging change of DNA synthesis and the ultrastructural development of mouse adrenal gland. *Cell Mol Biol* 42 (2): 279-292, 1996
- Jarnagin JL & Luchsinger DW. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 55, 253-258, 1980
- Jesse-RL; Loesser-K; Eich-DM, Qian-YZ; Hess-ML, Nestler-JE: Dehydroepiandrosterone inhibits human platelet aggregation in vitro and in vivo. *Ann-N-Y-Acad-Sci* 774: 281-90, 1995
- Jessop-DS; Chowdrey-HS; Lightman-SL: Interleukin-1 beta measured by radioimmunoassay in the rat spleen and thymus is increased during chronic inflammatory stress. *Neuropeptides* 24 (6). 367-71, 1993
- Kalra-PS; Dube-MG; Kalra-SP: The effects of interleukin 1 beta on the hypothalamic tachykinin, neurokinin A. *Brain-Res.* 662 (1-2): 178-84, 1994
- Kasper-M; Haroske-G Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. *Histol-Histopathol* 11 (2): 463-83, 1996
- Kjaer-A: Neurohypophysial peptides. Histaminergic regulation and function in adenohypophysial secretion. *Dan-Med-Bull* 43 (5), 391-406, 1996
- Laal-S, Samanich-KM, Sonnenberg-MG, Zolla-Pazner-S, Phadtare-JM; Belisle-JT: Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. *Clin-Diagn-Lab-Immunol* 4 (1) 49-56, 1997
- a.- Lack EE (ed): *Pathology of the Adrenal Glands*, Churchill Livingstone, New York, 1990
- b - Lack E E & Gruhn JG. Adrenal Glands, chapter 63 en: Damjanov I, Linder J (ed) *Anderson's Pathology*, 10 th ed, Mosby, St Louis MO, 1996
- Ladd-CO, Owens-MJ, Nemeroff-CB Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology* 137 (4) 1212-8, 1996

- Lawrence RA, Allen JE, Osborne J & Maizels RM. Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in Balb/c mice. *J Immunol* 153: 1216-1224, 1994
- Lentner C (ed): Geigy Scientific Tables: Bacteria, Fungi, Protozoa & Helminths, vol. 5. Ciba-Geigy, Basel Switzerland, 1992
- Lilly-MP; Gann-DS: The hypothalamic-pituitary-adrenal-immune axis. A critical assessment. *Arch-Surg* 127 (12): 1463-74, 1992
- a - Linthorst-AC; Flachskamm-C, Holsboer-F, Reul-JM. Local administration of recombinant human interleukin-1 beta in the rat hippocampus increases serotonergic neurotransmission, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity, and body temperature. *Endocrinology* 135 (2): 520-32, 1994
- b - Linthorst-AC, Flachskamm-C, Hopkins-SJ; Hoadley-ME, Labeur-MS; Holsboer-F, Reul-JM: Long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge. *J-Neurosci* 17 (11): 4448-60, 1997
- Lloyd RV, Horvath E, Stefanescu L & Kovacs K: The pituitary gland, chapter 60 en. Damjanov I, Linder J (ed) *Anderson's Pathology*, 10th ed, Mosby, St. Louis, 1996
- Madden DL & Fujiwara K: Selected bacterial diseases en. Foster HL, Small JD, Fox JG (ed). *The Mouse in Biomedical Research*, vol IV, Academic Press, San Diego, 1982
- Malo-D; Vogan-K; Vidal-S; Hu-J; Cellier-M; Schurr-E; Fuks-A; Bumstead-N; Morgan-K; Gros-P: Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23 (1): 51-61, 1994
- Manolagas SC, Provvedini DM & Tsoukas CD: Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the immune system, *Mol Cell Endocrinol* 43: 113, 1985
- May-M; Holmes-E; Rogers-W; Poth-M. Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone. *Life-Sci* 46 (22): 1627-31, 1990
- McCray E, Winbaum CM, Braden CR & Onorato IM: The Epidemiology of tuberculosis in the United States En: Iseman MD & Hutt GA (ed): *Tuberculosis Clinics in Chest Medicine*, 18 (1): 99-113, 1997
- McLachlan-JA; Serkin-CD; Bakouche-O: Dehydroepiandrosterone modulation of lipopolysaccharide-stimulated monocyte cytotoxicity. *J-Immunol*. 156 (1): 328-35, 1996
- Mekaouche-M, Givalois-L; Barbanel-G; Staud-P; Maurel-D; Malaval-F, Bristow-AF, Boissin-J, Assenmacher-I, Izart-G: Chronic restraint enhances interleukin-1-beta release in the basal state and after an endotoxin challenge, independently of adrenocorticotropin and corticosterone release. *Neuroimmunomodulation* 1 (5): 292-9, 1994
- Meckler, RJ & Collins RL: Histology and weight of the mouse adrenal: A diallelic genetic study. *J Endocrinol* 31: 95-103, 1965
- Meijer JH, Rietveld WJ: Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 69: 671-707, 1989
- Meikle, AW, Dorchuk, RW, Araneo A et al: The presence of a DHEA specific receptor binding complex in murine T cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 293-304, 1992
- Merrill-JE; Jonakait-GM: Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB-J*. 9 (8): 611-8, 1995
- Mesiano-S, Jaffe-RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr-Rev* 18 (3): 378-403, 1997
- Milewich-L; Catalina-F; Bennett-M: Pleiotropic effects of dietary DHEA. *Ann-N-Y-Acad-Sci* 29: 774-149-70, 1995
- Milikowski C, Berman Y. *Color Atlas of Basic Histopathology*, Appleton & Lange, Hong Kong, 1997
- Modarress KJ, Opoku J, Xu M, Sarlis NJ, Simons S: Steroid induced conformational changes at ends of the hormones-binding domain in the rat glucocorticoid receptors are independent of agonist versus antagonist activity. *J Biol Chem* 272 (38): 23986-23994, 1997
- Montecalvo-MA; Wormser-GP: Selective tuberculin anergy. case report and review. *Mt-Sinai-J-Med* 61 (4): 363-365, 1994
- Morely JE, Distiller LA, Sagel J et al. Hormonal changes associates with testicular atrophy and gynecomastia in patients with leprosy. *Clin Endocrin* 6: 299-303, 1977
- Musajo F, Neri G, Tortorella C, Mazzochi G, & Nussdorfer GG: Intra-adrenal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase plays a role in the regulation of corticosteroid secretion. An in vitro study in the rat. *Life Sci* 59 (17): 1401-1406, 1996
- Nishino T, Bernhagen J, Shiki H, Calandra T, Dohi K & Bucala R: Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* 1 (7): 781-788, 1995

- Nolte FS, Metchock B: Mycobacterium. En Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover RH (eds.) Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology Washington D.C. 400-437, 1995
- North WG, Moses AM & Share L (ed): The Neurohypophysis a window on brain function. Ann N Y Acad Sci 689, 1993
- Nussdorfer GG, Mazzocchi G & Meneghelli V: Cytophysiology of the adrenal zona fasciculata. Int Review of Cytology, 55: 291-365, 1978
- O'Reilly-LM, Daborn-CJ: The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. Tuber-Lung-Dis. 76 Suppl 1 (8), 1-46, 1995
- Ottaway CA & Husband AJ: Central nervous system influences on lymphocyte migration. Brain, Behaviour and Immunity 6: 97-116, 1992
- Palomino E: Chemical modulation of activity in steroidal estrogens. En. Parish EJ, Nes WD (ed). Biochemistry and Function of Sterols, Boca Raton, Florida, CRC Press, 245-256, 1997
- Paez-Pereda-M, Sauer-J, Perez-Castro-C, Finkelman-S, Stalla-GK, Holsboer-F, Arzt-E: Corticotropin-releasing hormone differentially modulates the interleukin-1 system according to the level of monocyte activation by endotoxin. Endocrinology 136 (12), 5504-10, 1995
- Percy, DH & Barthold, SW: Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits, Iowa State University Press, 1993
- Perone-MJ; Castro-MG: Prohormone and proneuropeptide synthesis and secretion. Histo-Histopathol 12 (4): 1179-88, 1997
- Piekut D, Joseph SA: Relationship of CRF-immunostained cells and magnocellular neurons in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus. Peptides 6: 873- 882, 1985
- Post FA, Soule SG, Willcox PA and Levitt NS: The spectrum of endocrine dysfunction in active pulmonary tuberculosis. Clin Endocrinol 40: 367-371, 1994
- Porter-JD; McAdam-KP: The re-emergence of tuberculosis. Annu-Rev-Public-Health 15: 303-23, 1994
- Potter M (ed): The BALB/c Mouse, Genetics and Immunology, Current Topics in Microbiology and Immunology, 122, Springer-Verlag, Berlin, 1985
- Poussel-F: Cytokines as mediators in the Central Nervous System. Biomed-Pharmacother 48 (10), 425-31, 1994
- Puri-PL, Palma-A, Fabbri-A: The concept of stress and the role of hypothalamic and extra-hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) in the integration of the neuroendocrine and immune responses. Clinical and experimental aspects. Minerva-Endocrinol 19 (1): 19-28, 1994
- Qiu-Y; Peng-Y, Wang-J: Immunoregulatory role of neurotransmitters. Adv-Neuroimmunol 6 (3): 223-31, 1996
- Raber-J, Koob-GF, Bloom-FE: Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling, comparison with the hypothalamic response. J-Pharmacol-Exp-Ther 272 (2): 815-24, 1995
- Rabow-LE; Russek-SJ; Farb-DH: From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. Synapse 21 (3): 189-274, 1995
- Ragno-S, Estrada-I, Butler-R; Colston-MJ: Regulation of macrophage gene expression following invasion by Mycobacterium tuberculosis. Immunol-Lett. 57 (1-3): 143-6, 1997
- Rajalingam-R, Mehra-NK; Chopra-GS, Puri-MM; Jain-RC: Anti-IgG autoantibodies and possible immune regulatory mechanisms in patients with pulmonary tuberculosis. Tuber-Lung-Dis 77 (6): 502-9, 1996
- Rasmussen, KR, Martin EG, Arrowood MJ & Healey MC: Effect of dexamethasone and dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. J Protozool 38: 157-159, 1991
- Rastogi-N; Labrousse-V; de-Sousa-JP: Mycobacterial growth and ultrastructure in mouse L-929 fibroblasts and bone marrow-derived macrophages: evidence that infected fibroblasts secrete mediators capable of modulating bacterial growth in macrophages. Curr-Microbiol 25 (4): 203-13, 1992
- Reichlin S: Endocrine-Immune Interaction. En De Groot LJ (ed): Endocrinology, vol 3, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1995
- a- Regelson, W, Loria R & Kalimi M: Hormonal intervention: buffer hormones or state dependency. The role of DHEA, thyroid hormone, estrogen and hypophysectomy in aging. Ann N Y Acad Sci 521: 260-273, 1988

- b- Regelson, W, Loria R & Kalimi M: DHEA -the mother steroid, I. Immunologic action. En: The Aging Clock, Third Stromboli Conference on Aging and Cancer. Ann N Y Acad Sci 719: 553-563, 1994
- c- Regelson, W, & Kalimi M: DHEA -the multifunctional steroid, II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. Mechanism of action? Ann NY Acad Sci 719: 564-575, 1994
- Reznick RH and Armstrong P: The adrenal gland. Clin Endocrin 40: 561-576, 1994
- Riskind PN & Martin JB: Functional Anatomy of the Hypothalamic-Anterior Pituitary Complex. En: De Groot LJ (ed): Endocrinology, vol 1, WB Saunders, Philadelphia, 1995
- Rivier-C: Influence of immune signals on the hypothalamic-pituitary axis of the rodent. Front-Neuroendocrinol, 16 (2): 151-82, 1995
- a.- Robel-P, Baulieu-EE: Neurosteroids: biosynthesis and function. Crit-Rev-Neurobiol, 9 (4): 383-394, 1995
- b - Robel-P, Baulieu-EE: Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neuroactive neurosteroid. Ann-N-Y-Acad-Sci 29: 774-82-110, 1995
- Roberts-JE: Visible light induced changes in the immune response through an eye-brain mechanism (photoneuroimmunology). J-Photochem-Photobiol-B 29 (1): 3-15, 1995
- a.- Rook GAW & Attitayah: Cytokines and the Koch phenomenon. Tubercle 72: 13-20, 1991
- b.- Rook-GA: Macrophages and Mycobacterium tuberculosis: the key to pathogenesis. Immunol-Ser 60: 249-61, 1994
- c.- Rook-GA; Hernandez-Pando-R: T cell helper types and endocrines in the regulation of tissue-damaging mechanisms in tuberculosis. Immunobiology 191 (4-5): 478-92, 1994
- d - Rook-GA, Hernandez-Pando-R, Lightman-SL: Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. Immunol-Today 15 (7): 301-3, 1994
- e.- Rook GAW & Hernández-Pando R: The pathogenesis of tuberculosis. Ann Rev Microb 50: 259-284, 1996
- f.- Rook GAW, Honour J, Kon OM, Wilkinson RJ, Davidson R, Shaw RJ. Urinary adrenal steroid metabolites in tuberculosis- a new clue to pathogenesis? Q J Med 89: 333-341, 1996
- g - Rook GA, Stanford-JL: The Koch phenomenon and the immunopathology of tuberculosis. Curr-Top-Microbiol-Immunol 215: 239-62, 1996
- h - Rook GAW, Hernández Pando R, Baker R, Orozco H, Arriaga K, Pavón L & Streber ML. Human and murine tuberculosis as models for immuno-endocrine interactions. En: Rook GAW & Lightman S (ed.) Steroid Hormones and the T-Cell Cytokine Profile, Springer-Verlag, Great Britain, 193-220, 1997
- Rozsman TL, Brooks WH: Signaling Pathways of the Neuroendocrine-Immune Network. En: Blalock JE, Bost KL (ed) Neuro-immunoendocrinology. Progress in Allergy, vol 43, Karger, Switzerland, 1988
- Sacerdote-P; Bianchi-M; Manfredi-B; Panerai-AE: Intracerebroventricular interleukin-1 alpha increases immunocyte beta-endorphin concentrations in the rat: involvement of corticotropin-releasing hormone, catecholamines, and serotonin. Endocrinology 135 (4): 1346-52, 1994
- Saperstein-A; Brand-H, Audhya-T, Nabriski-D, Hutchinson-B, Rosenzweig-S; Hollander-CS: Interleukin 1 beta mediates stress-induced immunosuppression via corticotropin-releasing factor. Endocrinology 130 (1): 152-8, 1992
- Sarma GR, Chandra Y, Ramachandran G, Krishnamurthy PV, Kumaraswami V, Prabhakar R. Adrenocortical function in patients with pulmonary tuberculosis. Tubercle 71: 277-82, 1990
- Savino W & Dardenne M: Immune-neuroendocrine interactions. Immunol Today 16 (7): 318-321, 1995
- Schatzberg AF & Nemeroff CB: The Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis, Physiology, Pathophysiology and Psychiatric implications, Raven Press, New York, 1988
- Scheithauer BW, Horvath E & Kovacs K: Ultrastructure of the neurohypophysis. Microscopy Research and Technique 20: 177-186, 1992
- Schobitz-B, Sutanto-W; Carey-MP; Holsboer-F; de-Kloet-ER: Endotoxin and interleukin 1 decrease the affinity of hippocampal mineralocorticoid (type I) receptor in parallel to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuroendocrinology. 60 (2): 124-33, 1994

- Secretaria de Salud: Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2 para la Prevencion y Control de la Tuberculosis en la atencion primaria de la salud, Diario Oficial, 28 de enero de 1995
- Shealy-CN: A review of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Integr-Physiol-Behav-Sci* 30 (4): 308-13, 1995
- Simpson ER & Waterman MR. Steroid Hormone Biosynthesis in the adrenal cortex and its regulation by adrenocorticotropin. En De Groot, LJ (ed): *Endocrinology*, 3rd ed. vol 2, WB Saunders, Philadelphia, 1995
- Smith, AW: 1986 report of the American Veterinary Medical Association panel on euthanasia *J Am Vet Med Assoc* 188: 251-253, 1986
- Smith DF, Toft DO: Steroids receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol*. 7: 4-11, 1993
- Spangelo-BL; Gorospe-WC. Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front-Neuroendocrinol* 16 (1) 1-22, 1995
- Spencer-RL, Miller-AH, Moday-H; McEwen-BS, Blanchard-RJ; Blanchard-DC; Sakai-RR: Chronic social stress produces reductions in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels *Psychoneuroendocrinology* 21 (1) 95-109, 1996
- Staats J: Inbred and segregating inbred strains En: *The Mouse in Biomedical Research*, Foster HL, Small JD, Fox JG (ed), Academic Press, San Diego, 1982
- Stanford JL: Koch's phenomenon: can it be corrected?. *Tubercle* 72: 241-249, 1991
- Stanford-SC: Central noradrenergic neurones and stress. *Pharmacol-Ther*. 68 (2): 297-42, 1995
- Stankovic AK, Dion LD, Parker CR. Effects of TGF on human fetal adrenal steroid production. *Mol. Cell Endocrinol*. 99: 145-151, 1994
- Stead WW: The origin and erratic global spread of tuberculosis: How the past explains the present and is the key to the future. En: Iseman MD & Huitl GA (ed): *Tuberculosis. Clinics in Chest Medicine* 18 (1), 65-77, 1997
- Sternberg-EM: Neuroendocrine factors in susceptibility to inflammatory disease: focus on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis *Horm-Res* 43 (4): 159-61, 1995
- Steinman L: Connection between the immune system and the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 90 (17): 7912-7914, 1993
- Streber J, ML, Hernández PR, Zavala, PG: Ultraestructura de la capa fascicular de adrenales en la tuberculosis pulmonar experimental murina, en: *Memorias del III Congreso de la Asociación Mexicana de Microscopia A C*, Cancún, Quintana, Roo, sept 1-5, 1996, pag: 321- 322, Inst. de Física y Fac. de Medicina, UNAM, México, D F., 1996
- Sutters-AJ; Shaw-S, Wales-MR, Porter-JP; Leonard-J; Woodger-R, Brand-H; Bodmer-M; Foulkes-R: Immune enhancing effects of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate and the role of steroid sulphatase. *Immunology* 91 (2): 314-21, 1997
- Sutton LC, Fleshner M, Mazzeo R, Maier SF, Watkins LR: A permissive role of corticosterone in an opioid form of stress-induced analgesia: blockade of opiate analgesia is not due to stress-induced hormone release. *Brain Research* 663: 19-24, 1994
- Suzuki-T; Suzuki-N; Daynes-RA; Engleman-EG: Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin-Immunol-Immunopathol*. 61(2 Pt 1): 202-11, 1991
- Swierczynski-J; Bannasch-P; Mayer-D. Increase of lipid peroxidation in rat liver microsomes by dehydroepiandrosterone feeding *Biochim-Biophys-Acta*. 1315 (3) 193-8, 1996
- Szabo D, Toth IE & Szalay KS: Viscosity of rat adrenocortical lipids in different functional states: morphological characteristics. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58 (3). 329- 335, 1996
- Takao-T, Hashimoto-K, De-Souza-EB: Interleukin-1 receptors in the brain-endocrine-immune axis: Modulation by stress and infection. *Ann-N-Y-Acad-Sci*. 771 (12): 372-85, 1995
- Toossi-Z; Ellner-JJ : Mechanisms of anergy in tuberculosis. *Curr-Top-Microbiol-Immunol*. 215 221-38, 1996
- Toth-IE Hinson-JP. Neuropeptides in the adrenal gland: distribution, localization of receptors, and effects on steroid hormone synthesis. *Endocr-Res*. 21 (1-2) 39-51, 1995
- Toutou Y & Haus E (ed) *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*, 2nd ed, Springer-Verlag, Germany, 1994
- Trapp-T, Holsboer-F: Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends-Pharmacol-Sci*. 17 (4) 145-9, 1996

- Tschanz SA, Dimke BM & Burni PH: Influence of postnatally administered glucocorticoids on rat lung growth. *Biol Neonate* 68: 229-245, 1995
- Tsutsui-H; Nakanishi-K; Matsui-K; Higashino-K; Okamura-H; Miyazawa-Y; Kaneda-K: IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J-Immunol* 157 (9): 3967-73, 1996
- Tuohimaa-P, Blauer-M, Pasanen-S, Passinen-S, Pekki-A, Punnonen-R; Syvala-H, Valkila-J; Wallen-M, Valiaho-J, Zhuang-YH; Ylikomi-T: Mechanisms of action of sex steroid hormones: basic concepts and clinical correlations. *Maturitas* (5) Suppl: S3-12, 1996
- Turek FW. Circadian neural rhythms in mammals. *Annu Rev Physiol* 47: 49-64, 1985
- Tyler WS. Comparative subgross anatomy of lungs, pleuras, interlobular septa and distal airways. *Am Rev Respir Dis* 128 (2 pt 2): S32-36, 1983
- Van Eekelen JAM, Bohn MC, de Kloet ER. Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel and diencephalon. *Dev Brain Res* 61:33-43, 1991
- Van Loveren, H. Use of micrometers. *J Immunol Methods* 67: 311-319, 1984
- Vizi-ES; Orso-E, Osipenko-ON, Hasko-G; Elenkov-IJ: Neurochemical, electrophysiological and immunocytochemical evidence for a noradrenergic link between the sympathetic nervous system and thymocytes. *Neuroscience*, 1995 Oct; 68(4): 1263-76.
- Vordermeier-HM. T-cell recognition of mycobacterial antigens. *Eur-Respir-J-Suppl* 20 (9): 657s-667s, 1995
- Wang-XQ; Imaki-T; Shibasaki-T, Yamauchi-N, Demura-H. Intracerebroventricular administration of beta-endorphin increases the expression of c-fos and of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of the rat. *Brain-Res* 707 (2): 189-95, 1996
- Warwick-Davies-J; Lowrie-DB; Cole-PJ: Growth hormone activation of human monocytes for superoxide production but not tumor necrosis factor production, cell adherence, or action against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect-Immun* 63 (11): 4312-6, 1995
- Waschek-JA: Transgenic targeting of neuroendocrine peptide genes in the hypothalamic-pituitary axis. *Mol-Neurobiol* 10 (2-3): 205-17, 1995
- Watanabe G, Pena P, Albanese C, Wilsbacher LD, Young JB & Pestell RG. Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo. *J Biol Chem*, 272 (32), 20063-20069, 1997
- Watkins-AD: Hierarchical cortical control of neuroimmunomodulatory pathways. *Neuropathol-Appl-Neurobiol* 20(5): 423-31, 1994
- Watts-AG. The impact of physiological stimuli on the expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and other neuropeptide genes. *Front-Neuroendocrinol* 17 (3): 281-326, 1996
- a- Wayne-LG: Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur-J-Clin-Microbiol-Infect-Dis* 13 (11): 908-914, 1994
- b- Wayne-LG & Sramek-HA: Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob-Agents-Chemother* 38 (9): 2054-2058, 1994
- c- Wayne-LG & Hayes LG: An in vitro model for sequential study of shutdown of *M tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 64 (6): 2062-2069, 1996
- Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*, 2nd ed, Academic Press, London, 1995
- Weckmann AL y Cabral AR: Novedades moleculares y clinicas de las colágenas. *Rev Invest Clin* 48: 207-221, 1996
- Weibel ER: Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Review in Cytology* 26: 235-302, 1969
- a- Weigent-DA, Blalock-JE: The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell-Immunol* 135 (1): 55-65, 1991
- b- Weigent-DA, Blalock-JE: Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J-Leukoc-Biol* 58 (2): 137-50, 1995
- Weller-RO; Engelhardt-B; Phillips-MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain-Pathol* 6 (3): 275-88, 1996
- Wilkinson CW, Shinsako, J & Dallman M: Return of pituitary-adrenal function after adrenal enucleation or transplantation: diurnal rhythms and responses to ether. *Endocrinology* 109: 162-169, 1981

- Wright BE, Porter JR, Browne ES, Svec F. Antigluco-corticoid action of dehydroepiandrosterone in young obese Zucker rats. *Int J Obes* 16:579-83, 1992
- Wright-PW, Crutcher-JE; Holiday-DB. Selection of skin test antigens to evaluate PPD anergy. *J-Fam-Pract* 41 (1). 59-64, 1995
- Young DB & Duncan K. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *Ann Rev Microbiol* 49: 641-673, 1995
- Young-J, Corpechot-C; Perche-F, Eychenne-B, Haug-M, Baulieu-EE; Robel-P. Neurosteroids in the mouse brain: behavioral and pharmacological effects of a 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor. *Steroids* 61(3): 144-9, 1996
- Zeiss Carl Inc. ZIDAS Instruction Manual, Thornwood NY, 1984
- Ziegler TR, Barbieri RL, Young LS, et al. Effects of growth hormone administration on dehydroepiandrosterone sulphate, androstenedione, testosterone and cortisol metabolism during nutritional repletion. *Clin Endocrin* 34: 281-287, 1991

A N E X O

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA

1. Realización del corte del tejido de preferencia a 6 μm de grosor en laminillas silanizadas o tratadas con algún otro adhesivo.
2. Las laminillas se deben haber dejado secar en el horno a 37 °C.
3. Poner las laminillas que se van a usar junto con un control negativo en la canastilla y ponerla en el horno a 60 °C, durante 15 a 20 minutos para derretir la parafina.
4. Cuando las laminillas estén calientes, desparafinarlas por inmersión en:
 - 3 cambios de xileno fresco, de 4 minutos cada uno.
 - 2 cambios de etanol al 100%, de 2 minutos cada uno.
5. Bloqueo de la pseudoperoxidasa endógena de los glóbulos rojos, incubando durante **20 min** en metanol con 0.5% de H_2O_2 . Se puede omitir si no hay eritrocitos ni neutrófilos. Preparar 25 ml para vaso de coplin de plástico y 50 ml para vidrio.
6. Rehidratar los tejidos por inmersión en las siguientes soluciones en vasos de Coplin:
 - etanol 100%, etanol 100%, etanol 96%, etanol 70%. Completar la rehidratación poniendo las laminillas en agua desionizada durante 5 min.
7. Lavar 2 veces en TBS, de 5 minutos cada uno. Bloquear durante **30 min** en TBS suplementado con BSA (albúmina sérica bovina) al 3%. Ej. son 3 gr para 100 ml de TBS.
8. Acondicionar la cámara húmeda y colocar las laminillas perfectamente horizontales. Aplicar el 1er. Ac. diluido en TBS cuidando que cubra todo el tejido (~50 a 100 μl) e incubar **2 a 3 hrs** a temperatura ambiente. Previamente se determinó la concentración óptima del Ac. por titulación. Las diluciones van de 1:25 a 1:200. Si se usan Ac's diferentes hay que usar vasos diferentes para cada uno. Recolectar los residuos del Ac en un vaso.
9. Lavar 2 veces en TBS, de 2 min. cada uno, después un lavado de 3 minutos en TBS-BSA al 3%.
10. Aplicar 100 μl del 2o. Ac. e incubar de **30 min. a 1 hr**, a temperatura ambiente en la cámara húmeda. La dilución adecuada también se debe determinar previamente.

11. Recolectar los residuos del Ac en un vaso de precipitado para revisar actividad del cromógeno.
12. Transferir las laminillas a un vaso de coplin y hacer un lavado rápido en TBS, hacer otro lavado en TBS de 5 minutos. Hacer un lavado final en TBS- BSA 3% por 5 minutos. Transferir las laminillas a la cámara húmeda.
13. Aplicar la solución de DAB (200 μ l) con pipeta pasteur desechable de vidrio e incubar a temperatura ambiente. La reacción se desarrolla en minutos; como es variable, hay que revisarla sobre una hoja blanca. Nota: La DAB es un carcinógeno y se debe manejar con cuidado.
14. Detener la reacción poniendo las laminillas en TBS en un vaso de coplin.
15. Contrastar con Hematoxilina de Harris durante 20 seg.
16. Lavar en agua de la llave varias veces.
17. Virarlas a azul con la solución saturada de carbonato de litio.
18. Lavar con agua desionizada.
19. Deshidratar por inmersión en: 3 cambios en etanol 96%, 2 cambios en etanol 100%.
20. Aclarar por inmersión en 2 cambios de xileno.
21. Montar con resina cubriendo con el cubreobjetos

Solución de DAB: 1 mg = 0.0010g, 0.25 μ l de H₂O₂ al 30%, 1 ml TBS = 1000 μ l

TECNICA DE ELISA

Para la preparación de reactivos se siguieron los siguientes pasos:

Buffer de Carbonatos:

1.6 g Na₂CO₃ (15 mM) Carbonato de Sodio
2.9 g NaHCO₃ (35 mM) Bicarbonato de Sodio

Buffer de Fosfatos Salino (Phosphate-buffered saline PBS)

0.23 g NaH₂PO₄ (anhidro) (1.9 mM) Fosfato de sodio monobásico
0.15 g Na₂HPO₄ (anhidro) (8.1 mM) Fosfato de sodio dibásico
9.00 g NaCl (154 mM) Cloruro de sodio
Agregar a 900 ml de agua de irrigación
Ajustar al pH de 7.2 a 7.4 usando una solución 1 M de NaOH o 1 M de HCl.

PBS-Tween 20, 0.05%. (buffer de lavado)

Se añaden 500 μ l de Tween 20 (Polyoxythylen sorbitan monolaurate), para 1 lt de PBS.

Buffer de Citratos.

0.2553 g de ácido cítrico

0.6890 g Na₂ HPO₄ fosfato de sodio dibásico

Añadirle 50 ml de agua de irrigación, pH 5

1. Diluir el antígeno, en el buffer de carbonatos, (en este caso son las proteínas del extracto total de *M. tuberculosis* cepa H37Rv)
 - volumen por pozo: 100 µl, cantidad de proteína por pozo: 1.5 µg (1.25 µg)
 - incubar durante 24 hrs a 4 °C, en cámara húmeda.

2. Al día siguiente, se sacan las placas, se sacuden para tirar el contenido y se lavan 3 veces con el PBS- tween 20 0.05%, cada lavado dura 3 minutos.
 - volumen por pozo 350 µl
 - solución de lavado PBS-Tween 20 al 0.05%

3. Poner el buffer de bloqueo, **PBS con albúmina sérica bovina al 1%**.
 - volumen por pozo 200 µl
 - tiempo 1 hr a 37 °C, tapar las placas para evitar la evaporación

4. Sacar placas, sacudirlas, realizar 3 lavados de 3 minutos cada uno, con buffer de lavado.
 - volumen por pozo 350 µl

5. Añadir **sueros** problema:
 - Dilución suero problema 1: 2000
 - volumen por pozo 100 µl
 - incubación 2 hrs a temperatura ambiente

6. Sacudir las placas y realizar 3 lavados de 3 minutos cada uno con el buffer de lavado.
 - volumen por pozo 350 µl

7. Añadir el **anticuerpo** anti Ig G1 o anti Ig G2a, marcados con la enzima peroxidasa, se usó conejo anti-ratón
 - Dilución anticuerpo anti-isotipo 1:1000
 - volumen por pozo 100 µl
 - incubación 1 hr a 37 °C

8. Sacudir las placas y realizar 3 lavados de 3 minutos cada uno, con el buffer de lavados
 - volumen por pozo 350 µl

9. Añadir el **Ac. 2o.**, cabra anti conejo peroxidado, se usó diluido 1:2
 - volumen por pozo 100 µl
 - incubación 30 min a 37 °C

10. Preparar el buffer de citratos con el sustrato, OPD, sólo poner el peróxido de hidrógeno hasta que ya se vaya a añadir a los pozos.

volumen por pozo 100 μ l

proteger de la luz, meter a incubar a la estufa a 37 °C

ver que haya reacción de color amarillo, generalmente sucede a los 3 a 5 minutos.

Añadir el **sustrato** OPD (ortho phenil diamine dihydrochloride, para 50 ml de buffer de citratos son 20 mg = 0.0200 g.

Peróxido de Hidrógeno (Perhydrol H₂O₂) al 30 %, para 50 ml de buffer de citratos usar 20 μ l.

11. Detener la reacción con ácido sulfúrico al 2.5 M. volumen por pozo 50 μ l

12. Limpiar el fondo de la placa con una gasa húmeda y luego con una seca.

Realizar la lectura a 492 nm, es la observancia del OPD.

Se usó un lector de ELISA, Marca Labsystems Multiskan MS.

13. Obtener los cálculos con ayuda del programa Excel versión 5.0 , de Microsoft. Restarle al promedio de cada suero el promedio de los blancos.

14. Construir una curva con los valores obtenidos y darles una interpretación.

FIGURAS.

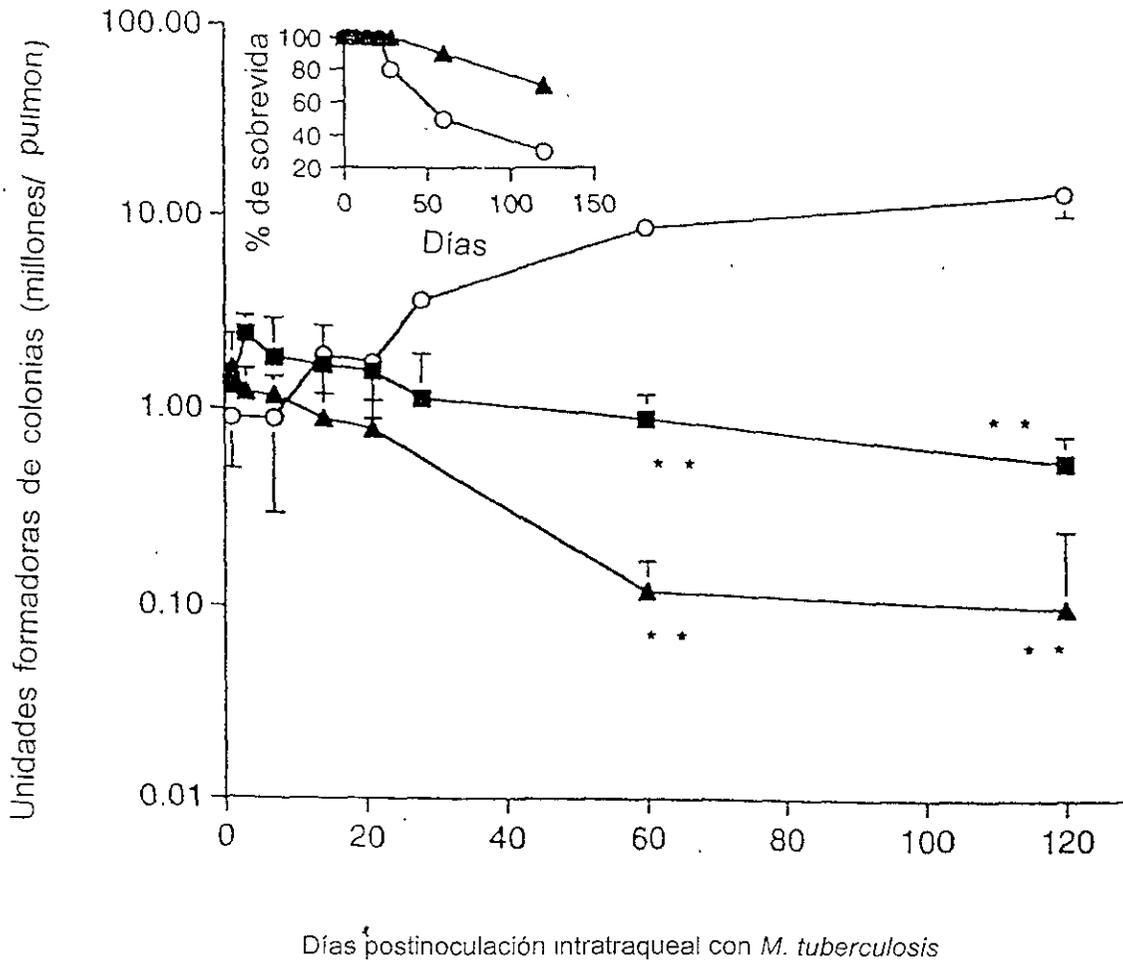


Fig. 1 Porcentaje de sobrevivida y Unidades Formadoras de Colonias (millones de bacterias/pulmón) en ratones inoculados con *M. tuberculosis*
 Simbología: --o-- Control, --■-- DHEA, --▲-- AED

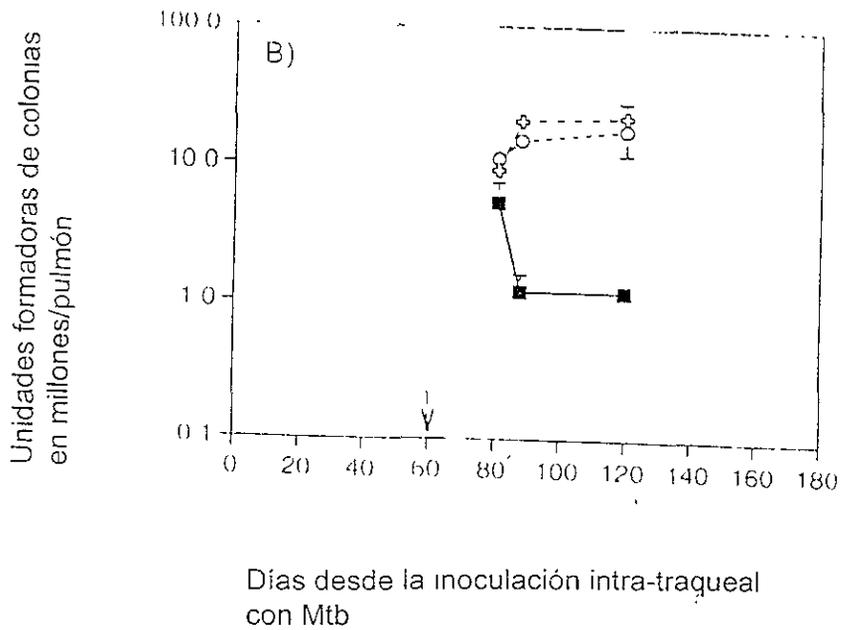
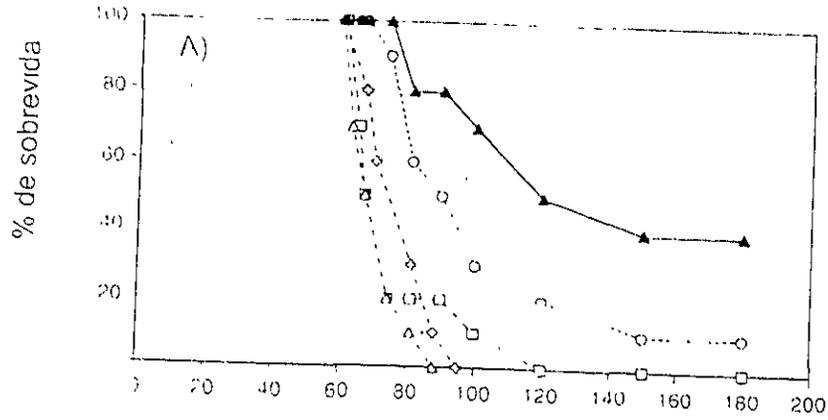


Fig. 2 Curva de sobrevivencia y Unidades Formadoras de Colonias.

A) Al día 60 post infección, los animales se organizaron en los siguientes grupos: --○-- control (sólo el vehículo), --□-- DHEA sola, --△-- AED, --◇-- corticosterona sola, --▲-- AED+C

B) Al día 60 post infección, los animales se organizaron en los siguientes grupos: --○-- control (sólo el vehículo), --■-- DHEA+C, --◇-- corticosterona sola

La combinación de DHEA+C ocasionó una reducción de log en las UFC en el día 88 que se mantuvo, pero no disminuyó al día 120.

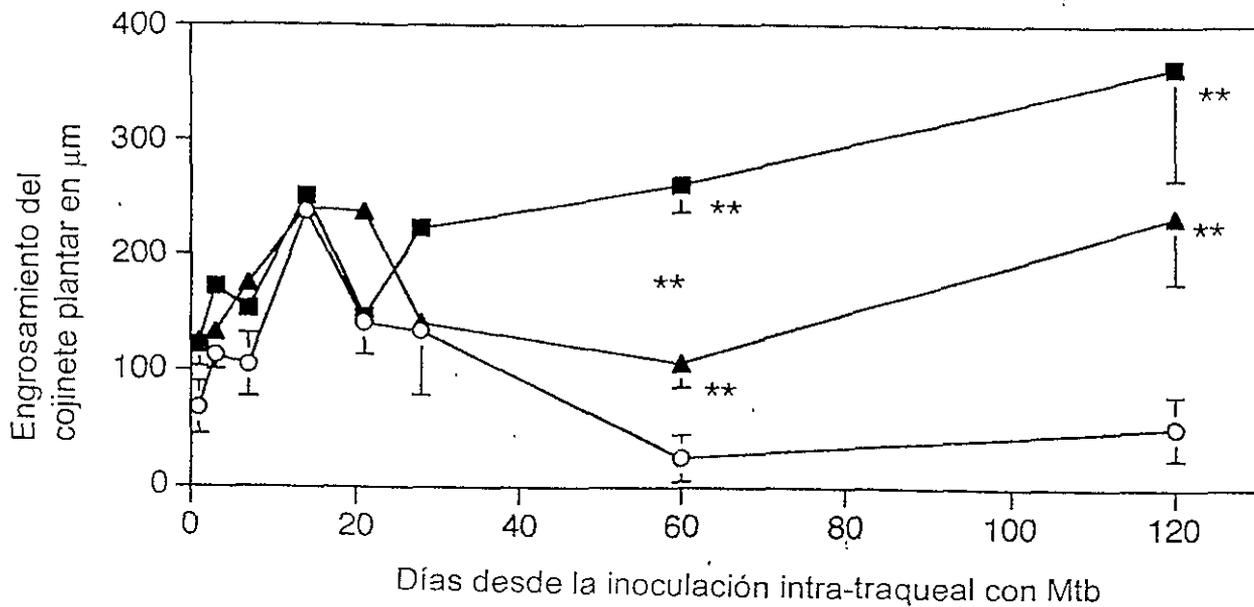


Fig. 3 Respuesta de DTH a antígenos solubles de Mtb

El engrosamiento se midió a las 24 hrs del desafío. Tanto el AED como la DHEA incrementaron la respuesta al día 60 y 120. Al día 60 la DHEA tuvo un incremento más significativo que el AED.

--o-- control, --■-- DHEA, --▲-- AED

* $p < 0.025$, **

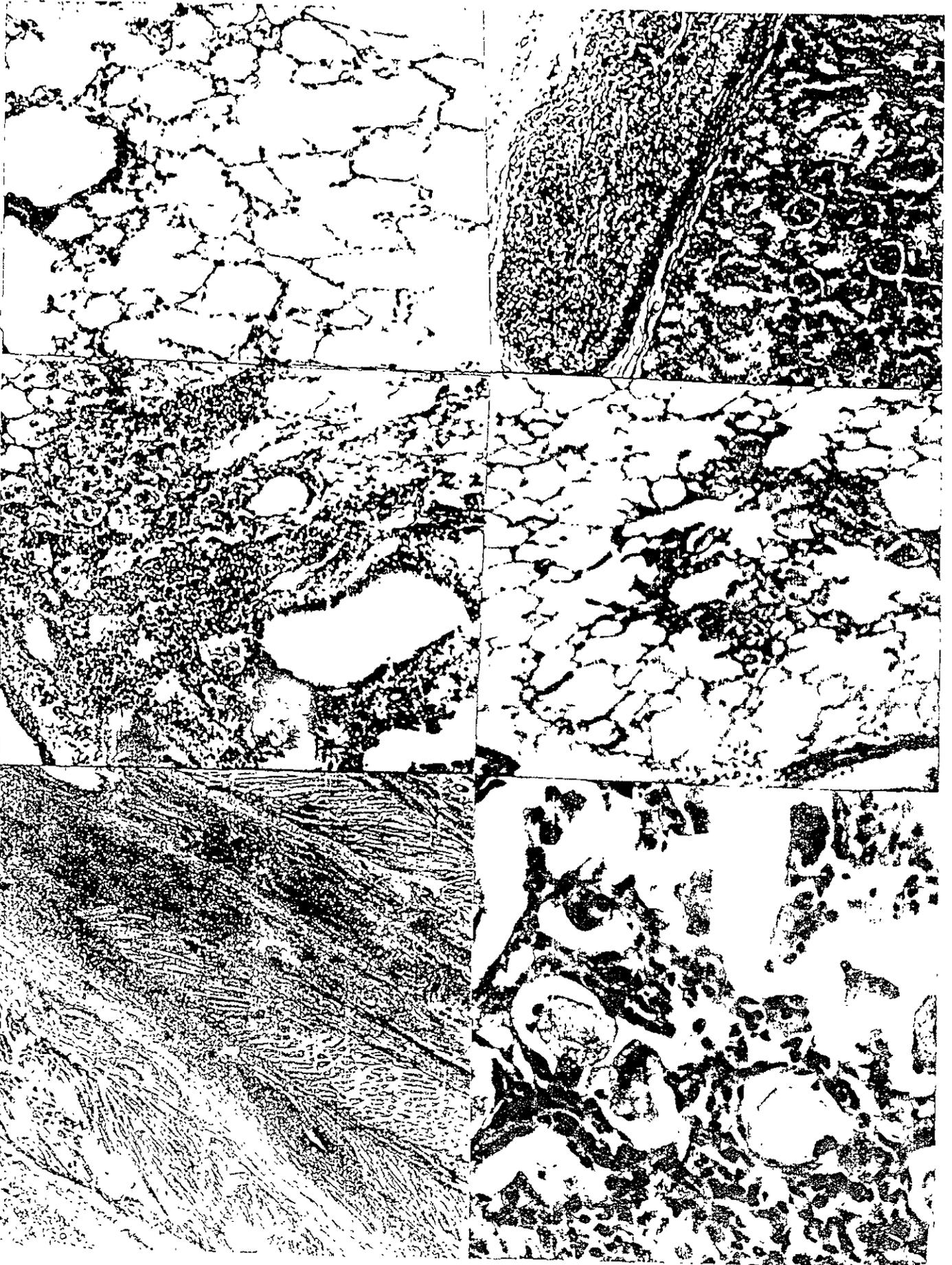
$p < 0.005$

Fig. 4 Microfotografías.

En el **panel A** se muestran en H&E en el siguiente orden:

- a b
- c d
- e f

- a. Pulmón de un ratón sano (2.4x 20x)
- b. Adrenal trasplantada debajo de la cápsula de un riñón en el día 81, se puede apreciar la integridad del trasplante (2.5x 10x)
- c. Una extensa zona neumónica con infiltrado linfocitario perivascular y peribronquial en un animal control al día 180 (2.5x 10x)
- d. Una zona neumónica más compacta con escasa necrosis en un animal del grupo AED+C al día 180 (2.5x 10x)
- e. El corte de un cojinete plantar con infiltrado linfocitario y ligero edema, del grupo de trasplante adrenal al día 180 (2.5x 4x)
- f. Detalle de un granuloma donde se muestran algunas células gigantes intraalveolares, grupo AED+C al día 180 (2.5x 4x)



panel A

Fig. 4 Microfotografías.

En el **panel B** de inmunohistoquímica se muestran en el siguiente orden:

a b
c d
e f

a. Pulmón de un ratón control al día 120, los macrófagos resultaron negativos a IL-1 α (2.4x 40x)

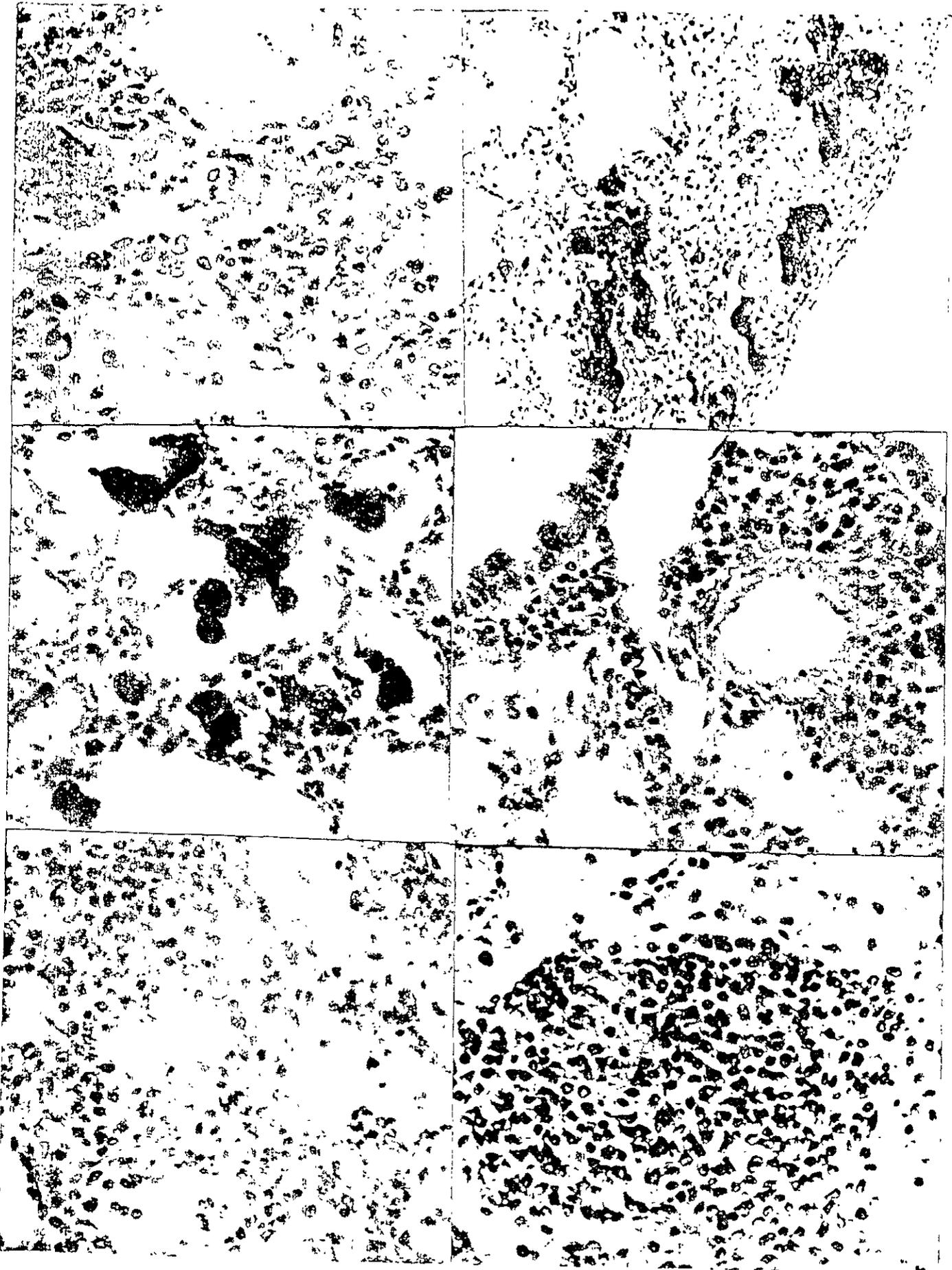
b. Macrófagos inmunomarcados positivamente a IL-1 α en un animal del grupo DHEA+C al día 120 (2.5x 20x)

c. Una intensa inmunoreacción positiva en macrófagos al TNF en el día 81 de animales del grupo AED+C (2.5x 40x)

d. Linfocitos positivos a IL-2 en el infiltrado perivascular y peribronquial en animales del grupo DHEA+C del día 81 (2.5x 40x)

e. Linfocitos positivos a IL-4 en una zona neumónica de un animal control del día 180 (2.5x 40x)

f. Intensa positividad a IL-4 en los linfocitos que forman un centro germinal en el pulmón de un animal del grupo Mtb+C en el día 88 (2.5x 40x)



panel B

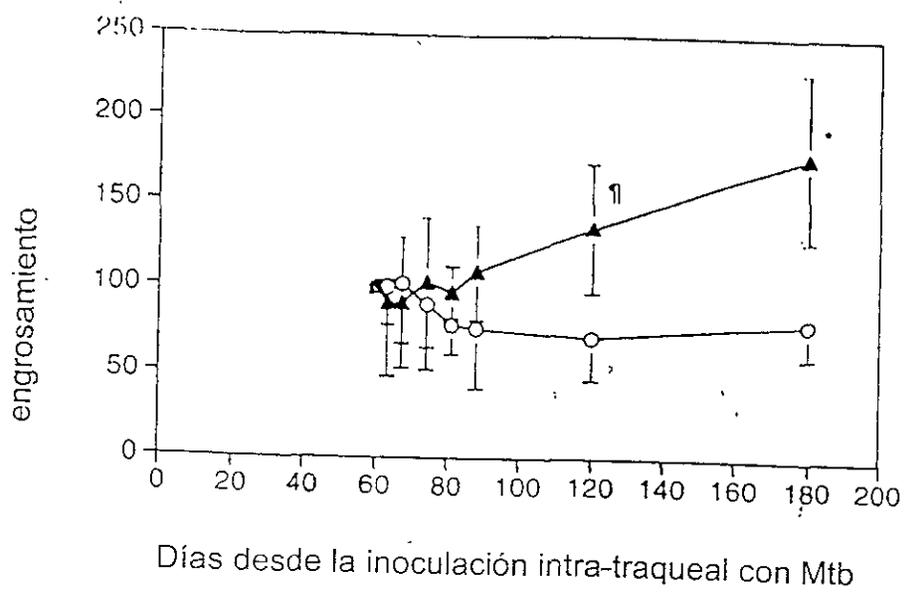


Fig. 5 Respuesta de DTH a antígenos solubles de Mtb

El engrosamiento se midió a las 24 hrs del desafío. El tratamiento con AED+C a partir del día 60 incremento la respuesta de DTH al día 120 y 180.

--o-- control (sólo el vehículo), --▲-- AED+C, Φ $p < 0.05$, * $p < 0.025$, ** $p < 0.005$

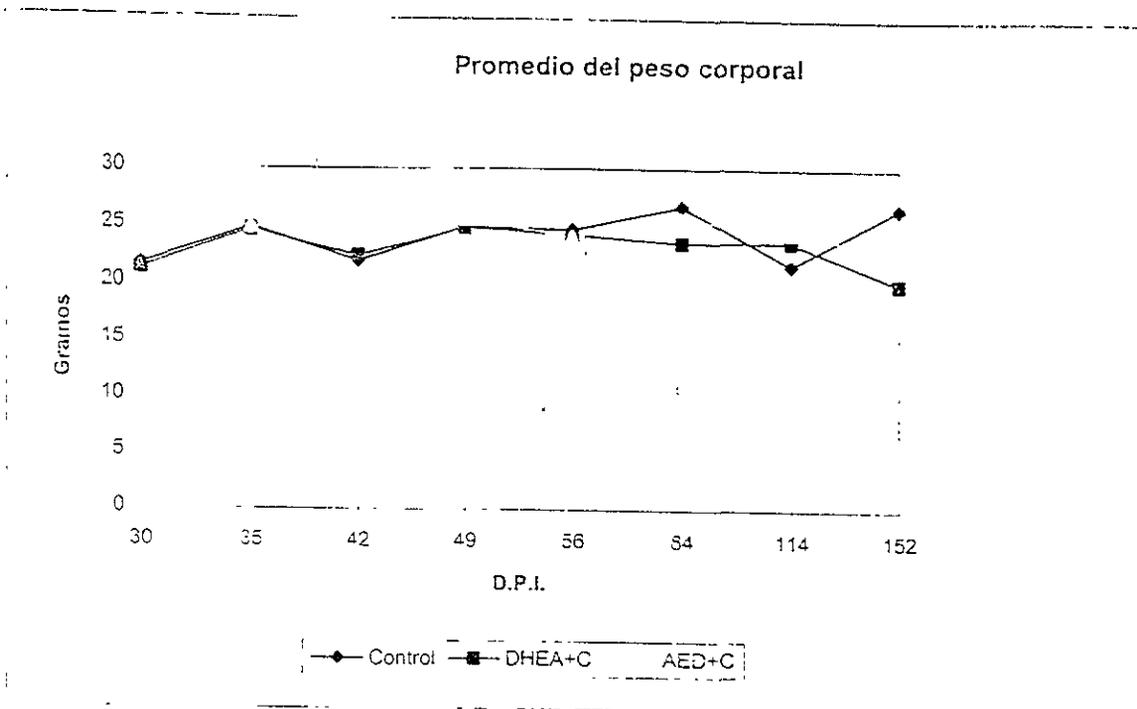


Fig. 6 Análisis comparativo del peso corporal de los ratones inoculados con Mtb y que recibieron o no tratamiento.

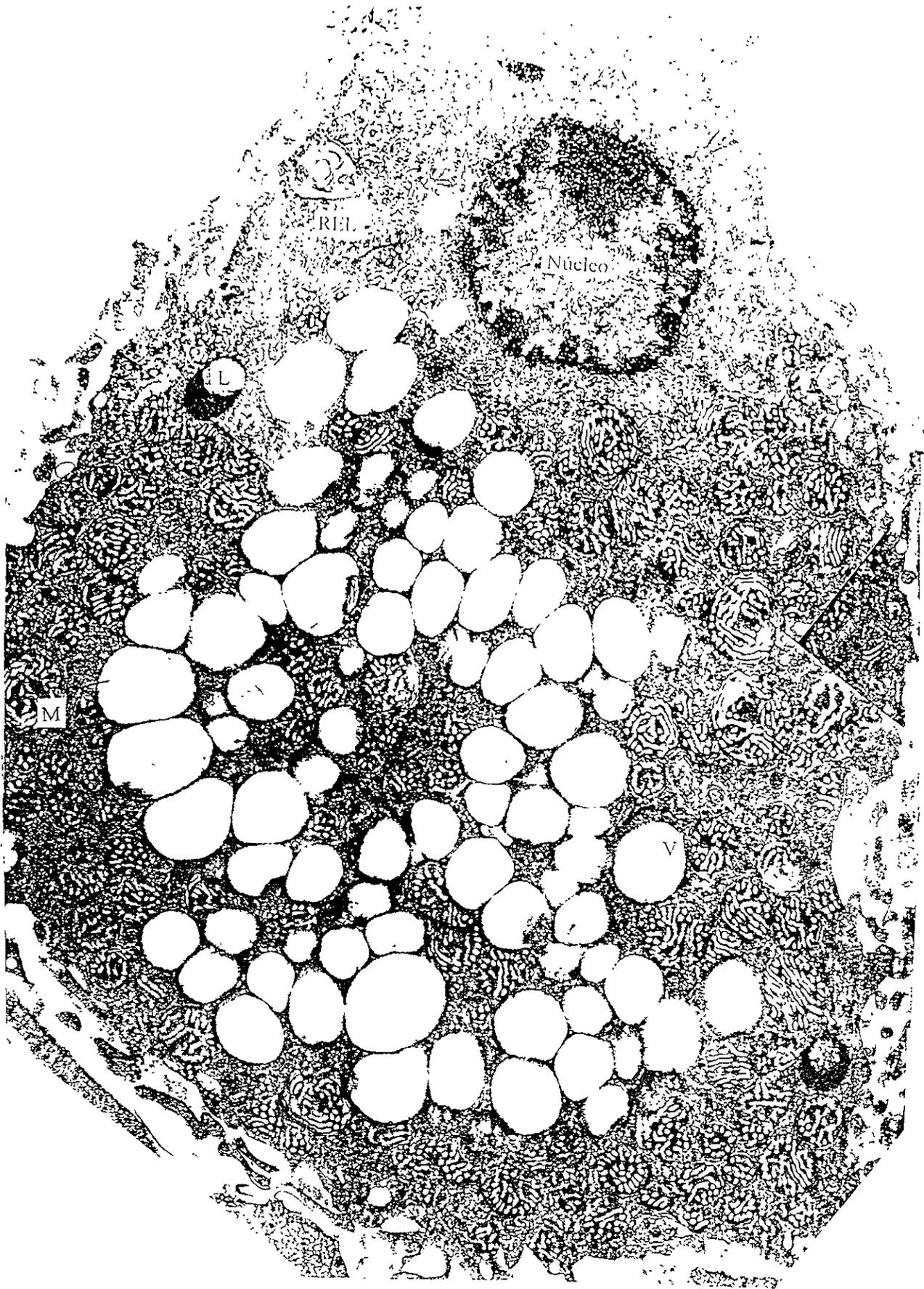


Fig. 7 Electromicrofotografía de una célula de la capa fascicular de adrenal derecha al día 21. Técnica de uranilo-plomo
M= mitocondrias, V= vacuolas, REL= retículo endoplasmico liso, L= lisosomas

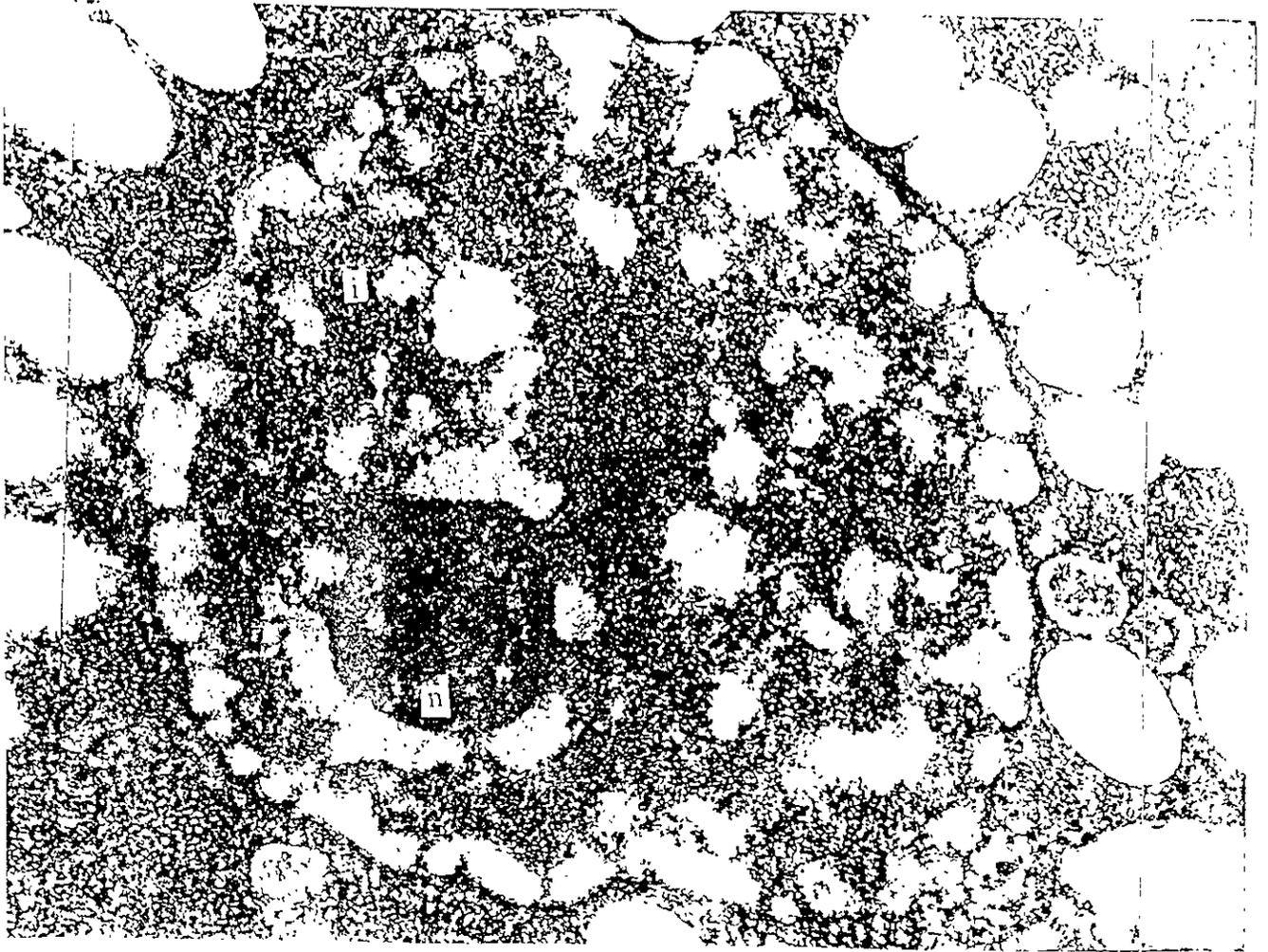


Fig. 8 Electromicrofotografía del núcleo de una célula de la capa fascicular de adrenal izquierda al día 120. Técnica de EDTA para RNP.
n= nucleolo, i= gránulos intercromatinianos en cúmulos

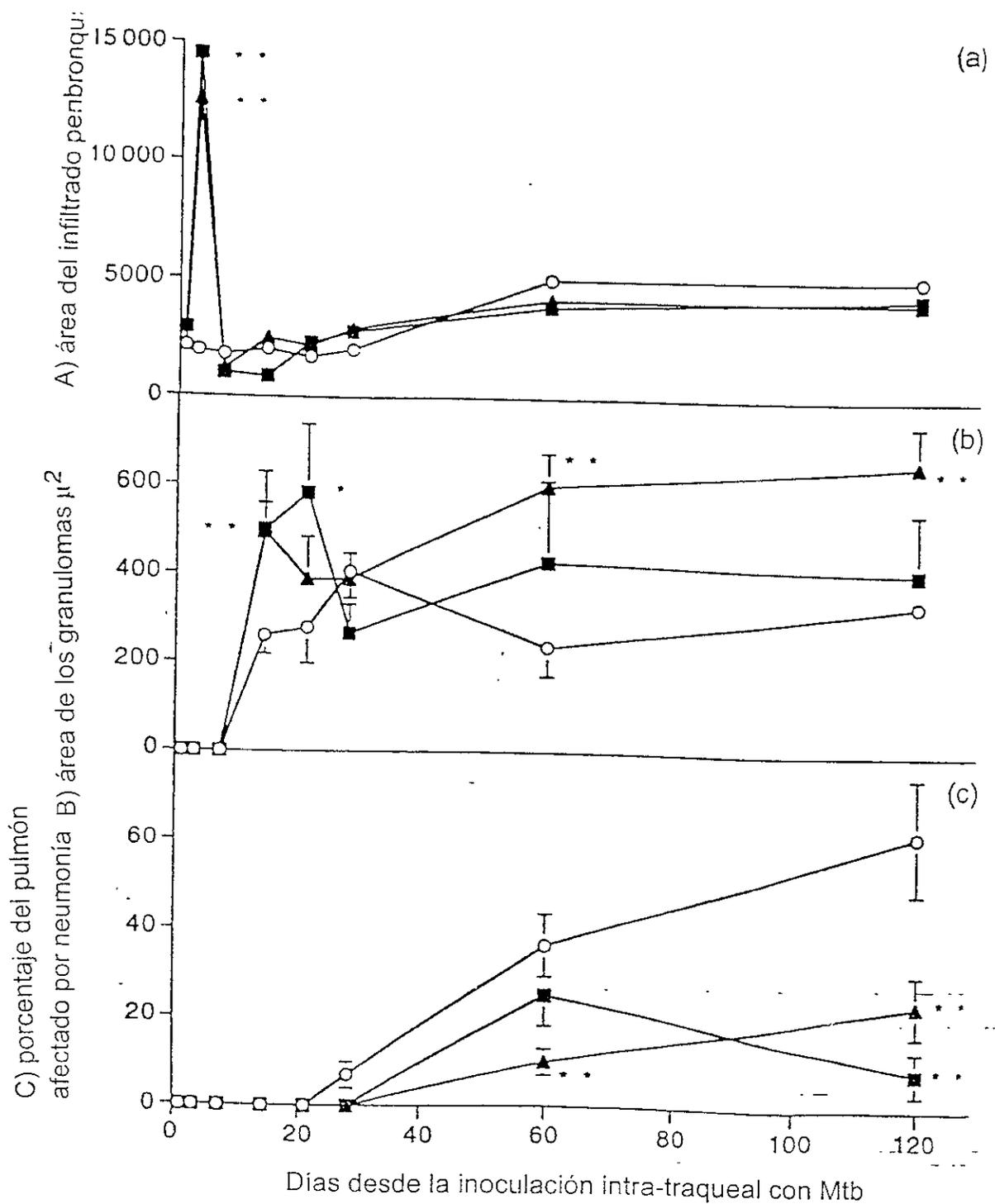


Fig. 9 Análisis morfométrico de los pulmones inoculados con Mtb.

A) área del infiltrado peribronquial

B) área de los granulomas

C) porcentaje del pulmón afectado por neumonía

El tratamiento con AED y DHEA induce un pico a los 3 días de infiltrado peribronquial y un incremento en la formación de granulomas entre el día 14 y 21 y posteriormente una inhibición en el progreso de la neumonía en los días 60 y 120

--○-- control, --■-- DHEA, --▲-- AED

* p<0.025, ** p<0.005

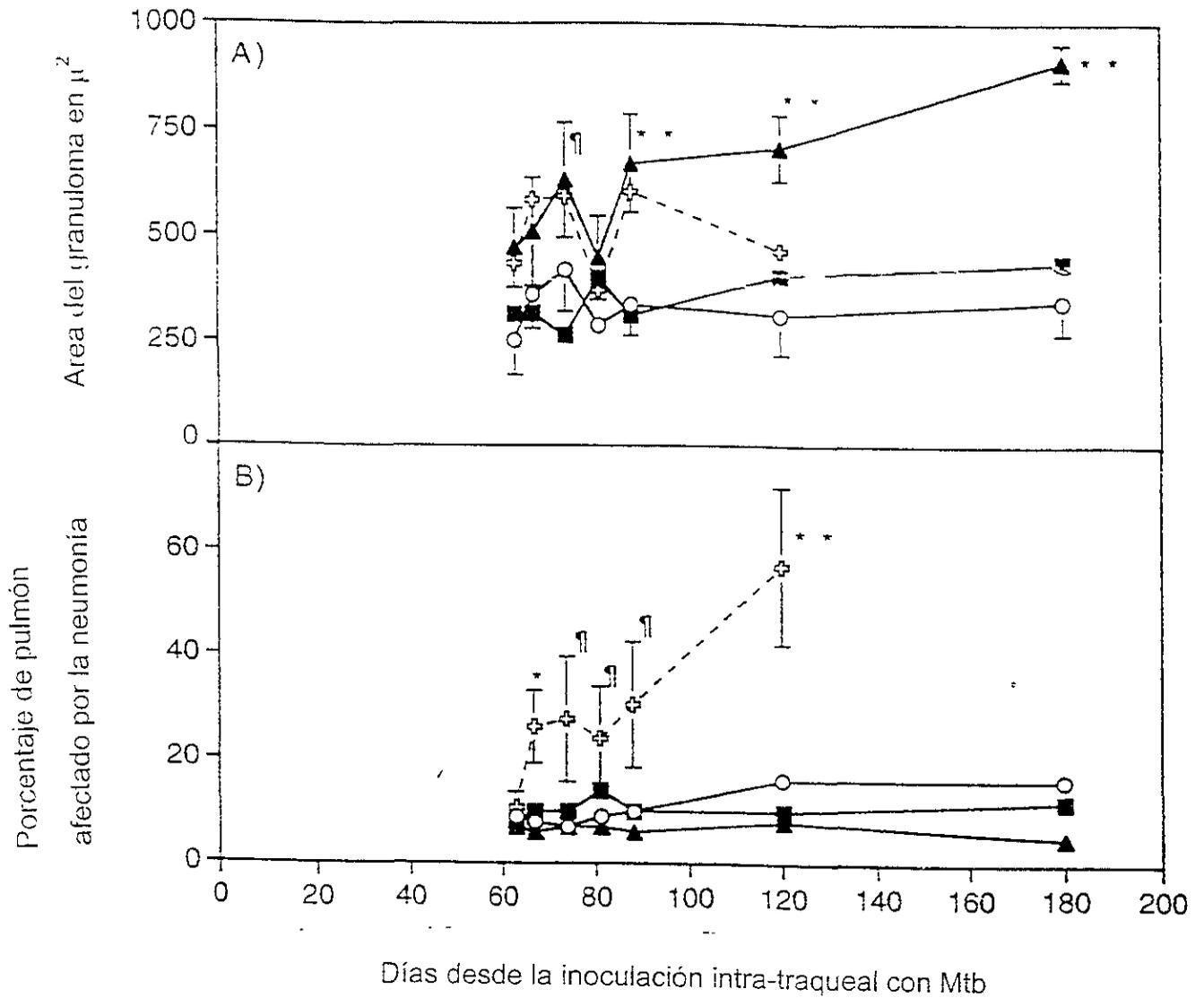


Fig. 10 Análisis morfométrico de los pulmones inoculados con Mtb en animales con y sin tratamiento.

A) Area del granuloma en μ^2

B) Porcentaje de pulmón afectado por la neumonía

El tratamiento de AED+C incrementó el área de granuloma, mientras que la corticosterona sola incrementó el área de neumonía.

--o-- control.

⊕-- corticosterona sola.

--▲-- AED+C.

--■-- DHEA+C

¶ p<0.05, * p<0.025, ** p<0.005

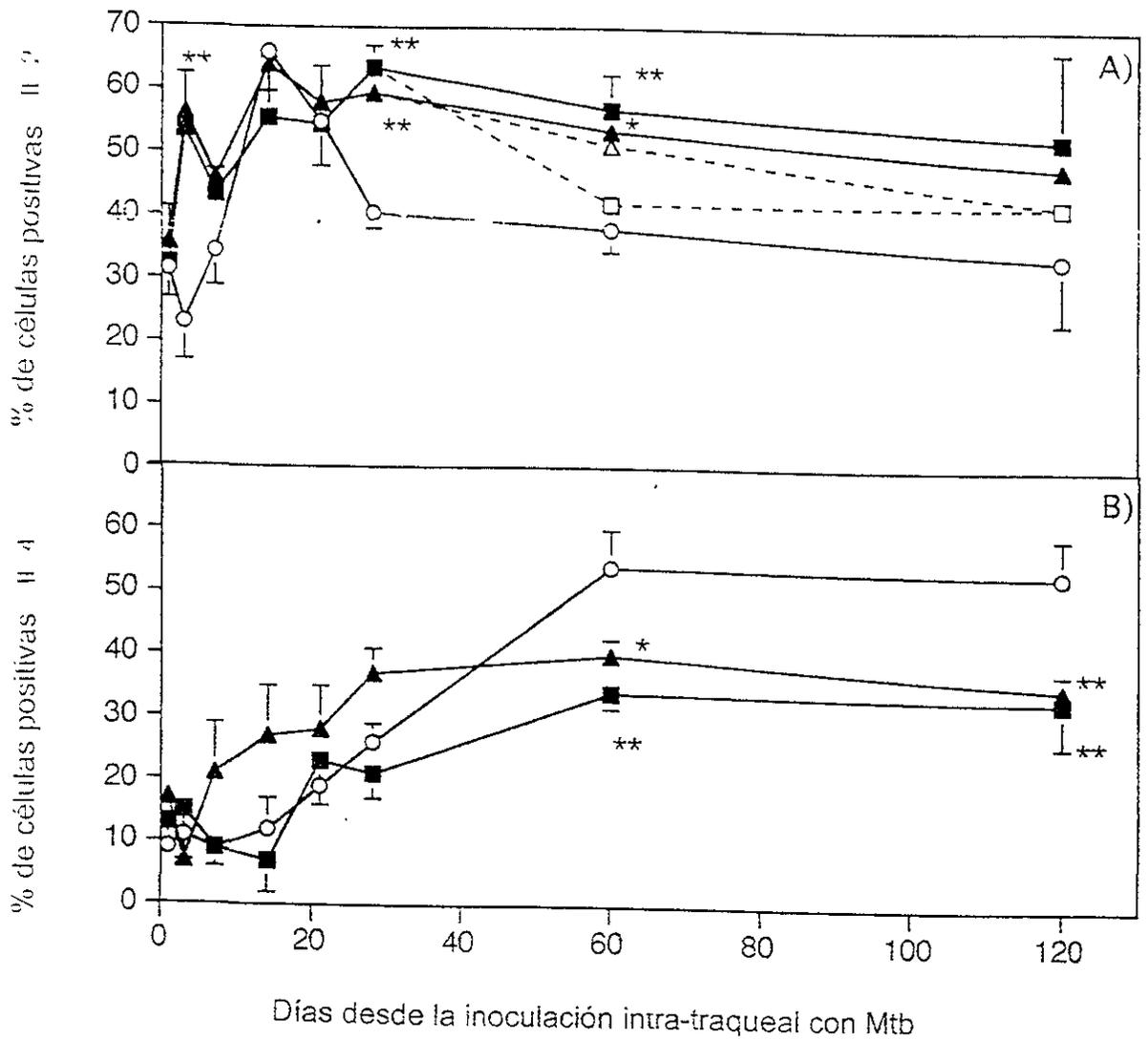


Fig. 11 Análisis inmunohistoquímico de células positivas a IL-2 (a) y para IL-4 (b) en el espacio perivascular de los pulmones de ratones inoculados con Mtb con y sin tratamiento a partir del día 1.

Los datos son las medias \pm DS de 9 a 18 campos aleatorizados.

El tratamiento con AED o DHEA induce una expresión temprana de IL-2 al día 3, además de los días 28 y 60. Ambos por otro lado indujeron un decremento en el porcentaje de células positivas a IL-4 en los días 60 y 120.

--○-- control, --■-- DHEA, --▲-- AED --□-- DHEA sola * $p < 0.025$, ** $p < 0.005$

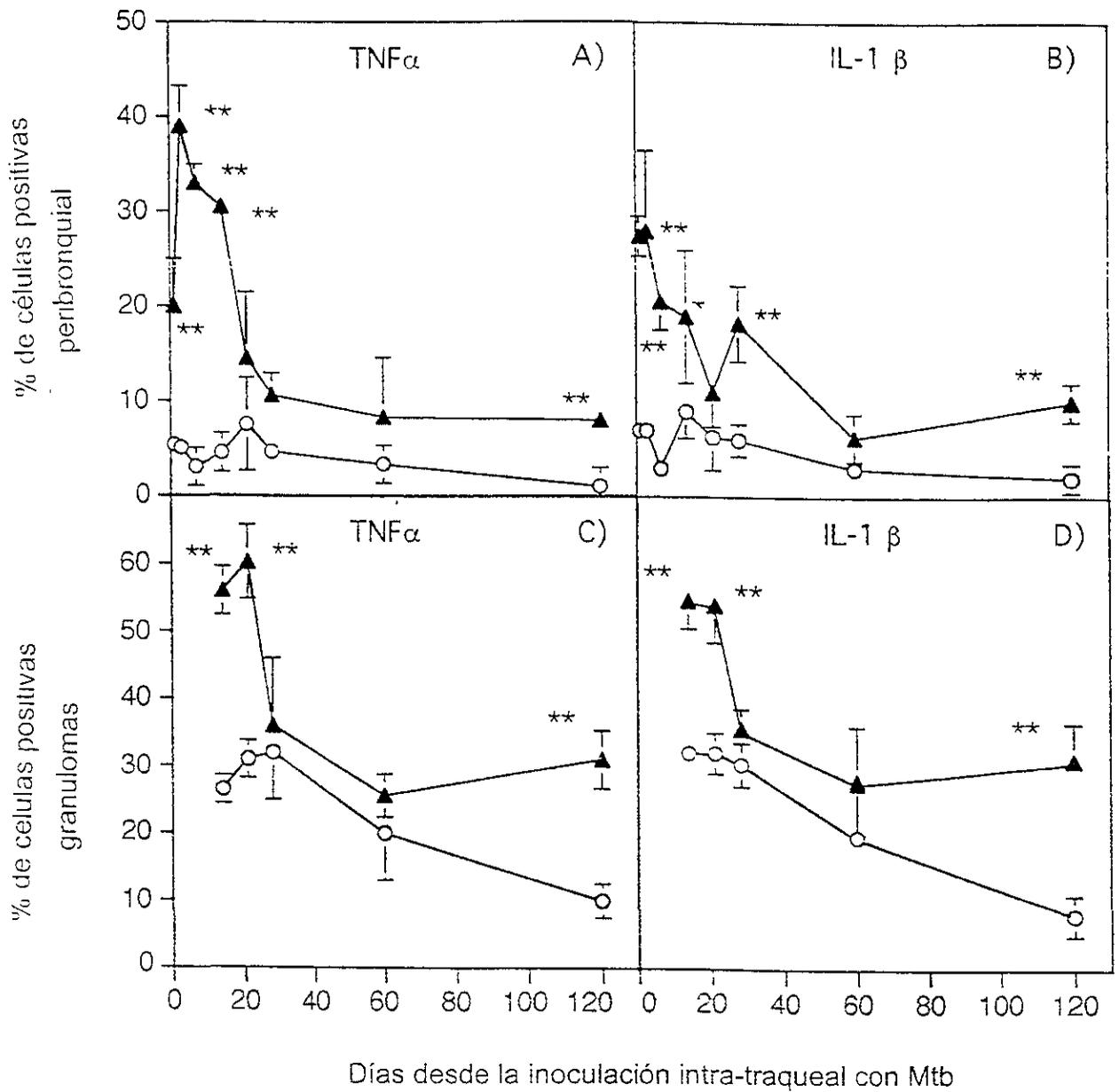


Fig. 12 Análisis inmunohistoquímico de células positivas a TNF- α (a y c) y a IL-1 α (b y d) alrededor de los bronquios (a y b) y granulomas (c y d) de pulmones de ratones inoculados con Mtb con y sin tratamiento a partir del día 1.

Los datos son las medias \pm DS de 12 a 18 campos aleatorizados.

El tratamiento con AED indujo un pico en los días 3 al 21 de ambas citocinas además de un incremento del porcentaje de células positivas al día 120.

--o-- control,

., -- \blacktriangle -- AED

* $p < 0.025$, ** $p < 0.005$

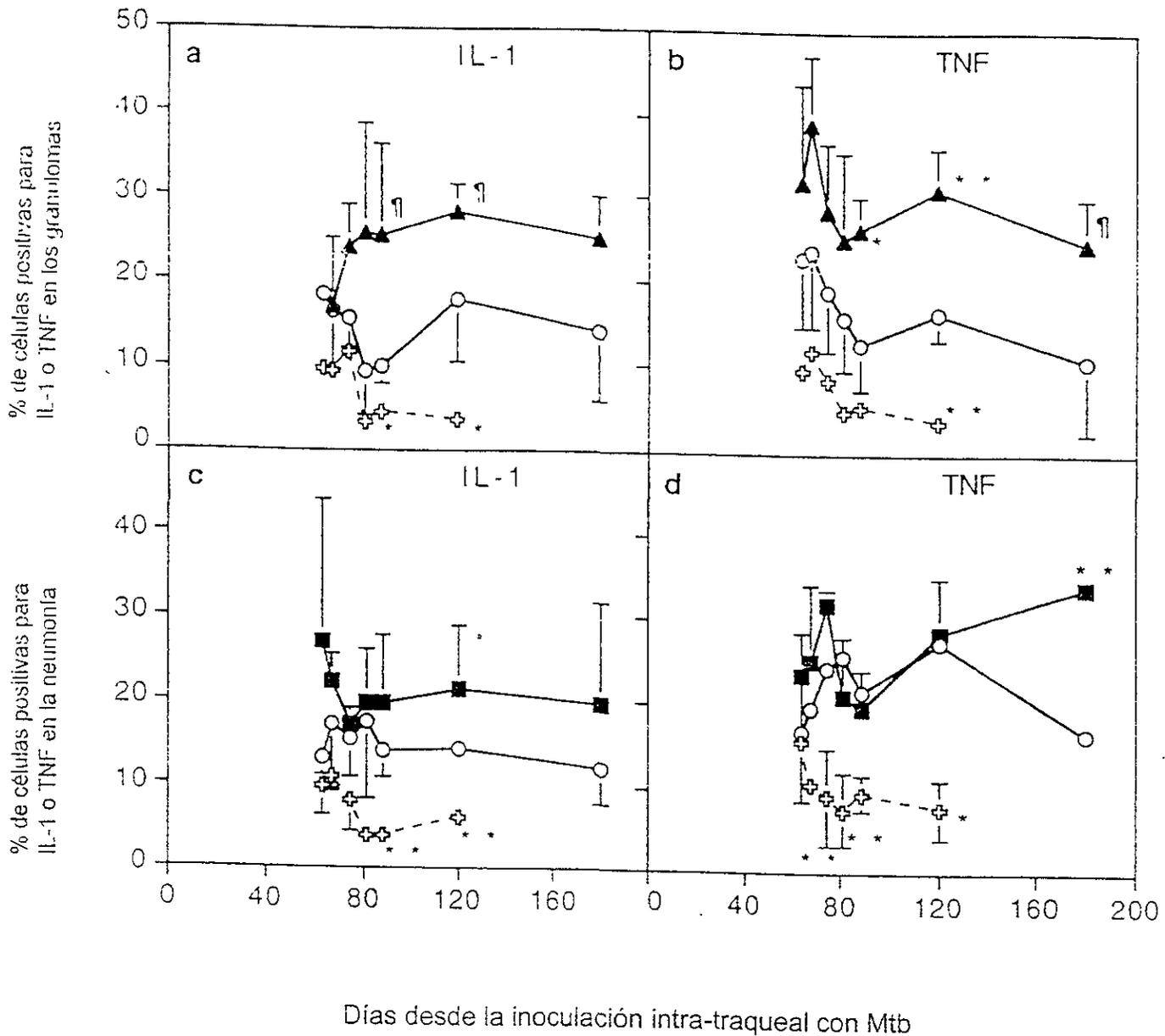


Fig. 13 Análisis inmunohistoquímico de células positivas a IL-1 α (a y c) y el TNF- α (b y d) en las áreas de granulomas (a y b) y neumonía (c y d) de pulmones de ratones inoculados con Mtb con y sin tratamiento a partir del día 60.

Los datos son las medias \pm DS de 12 a 18 campos aleatorizados.

El tratamiento con AED+C incrementa el porcentaje de células positivas para ambos IL-1 y TNF. El efecto fué aparente, más no significativo al primer día (61) después de iniciado el tratamiento. La corticosterona administrada sola disminuye la expresión tanto de IL-1 como de TNF y este efecto se abate con AED O DHEA.

--○-- control, --□-- corticosterona sola, --▲-- AED+C, --■-- DHEA+C

† p < 0.05, * p < 0.025, ** p < 0.005

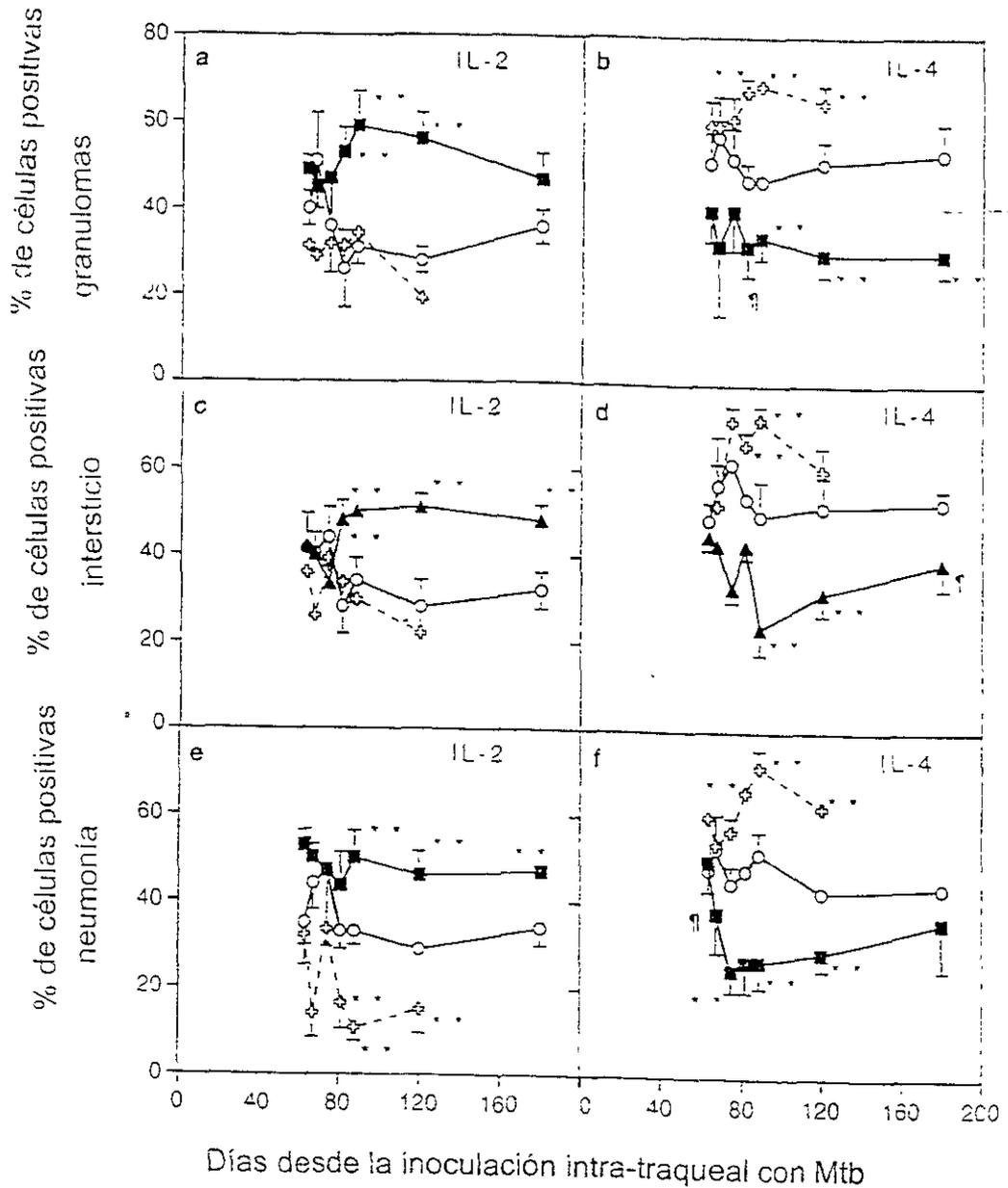


Fig. 14 Análisis inmunohistoquímico de células positivas a IL-2 (a, c y e) y para IL-4 (b, d y f) en los granulomas (a y b) y intersticio (c y d) y neumonía (e y f) de pulmones de ratones inoculados con Mtb con y sin tratamiento a partir del día 60.

Los datos son las medias \pm DS de 12 a 18 campos aleatorizados.

El tratamiento con AED+C ó con DHEA+C ocasionó un incremento en las células positivas a IL-2 con una disminución de las células positivas a IL-4. Al usar la corticosterona sola, se produjo el efecto contrario.

--○-- control, --◇-- corticosterona sola, --▲-- AED+C, --■-- DHEA+C

† p < 0.05, * p < 0.025, ** p < 0.005

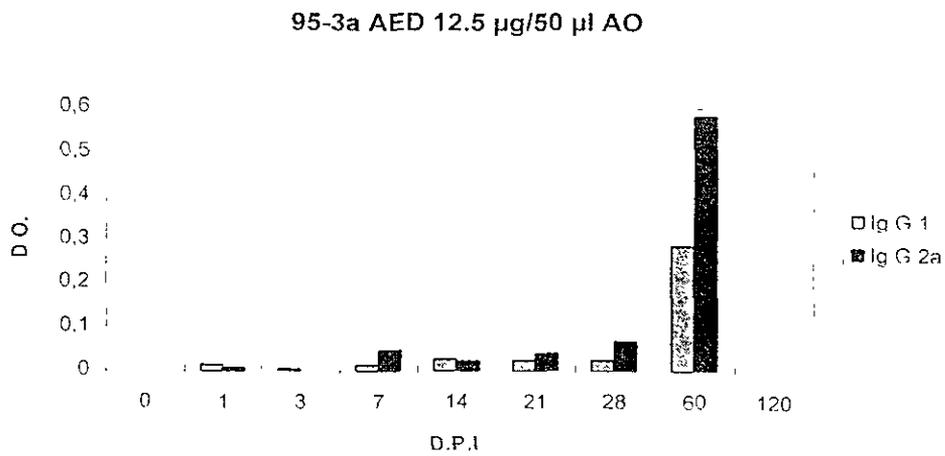
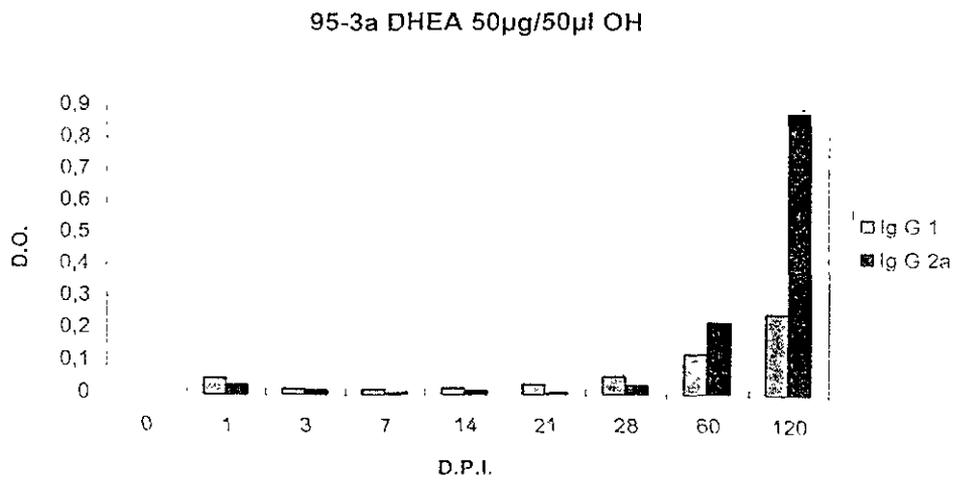
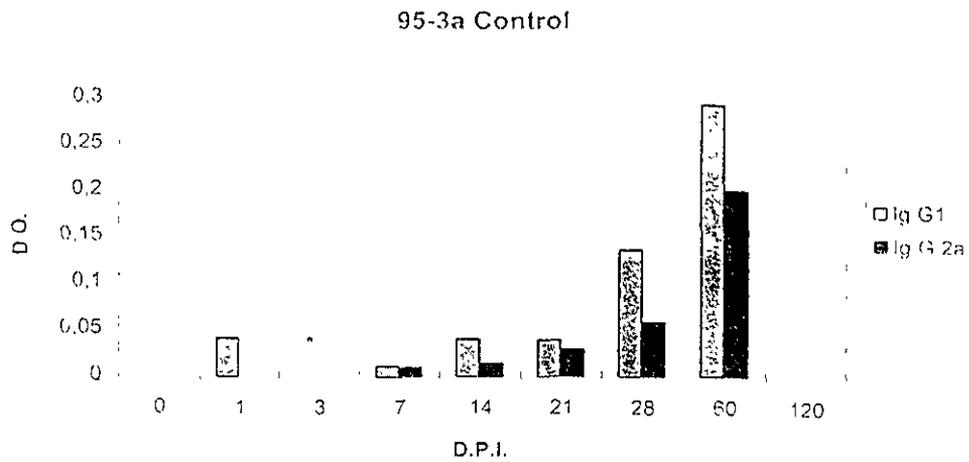
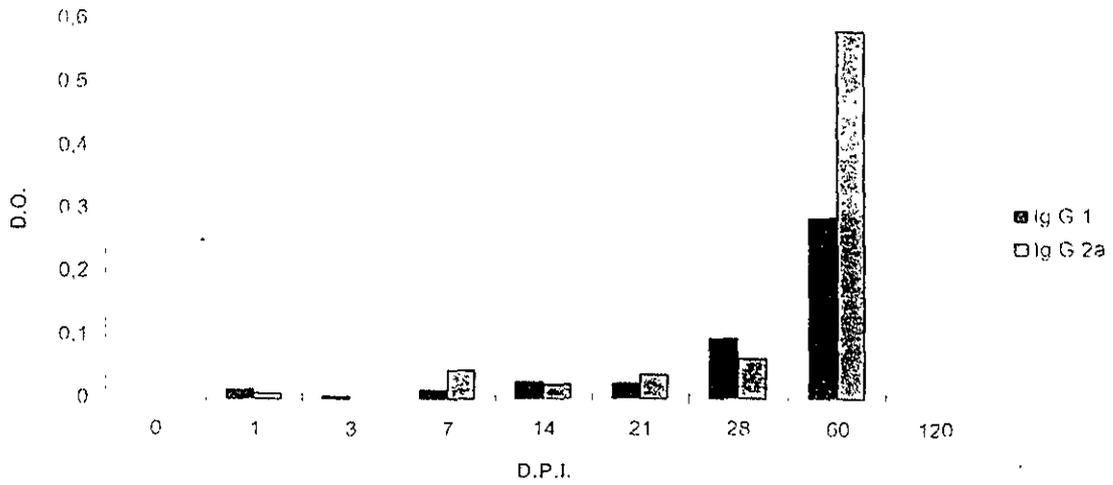


Fig. 15 Prueba de FLISA para subclases de inmunoglobulinas

95-3a Aguda AED 12.5µg/50µl A.O. (promedio de sueros)



95-3a Aguda AED 25µg/50µl A.O. (promedio de sueros)

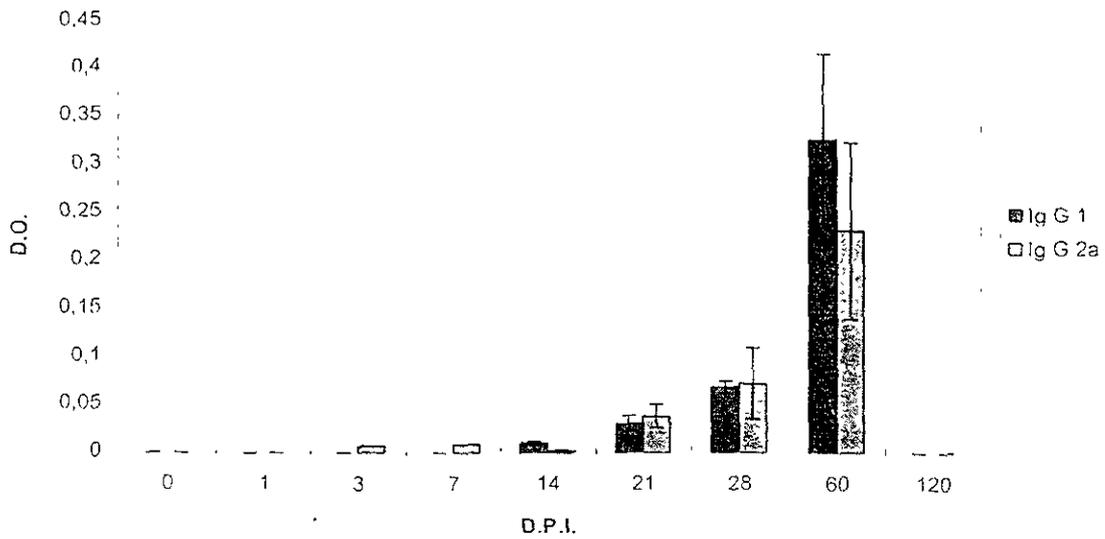
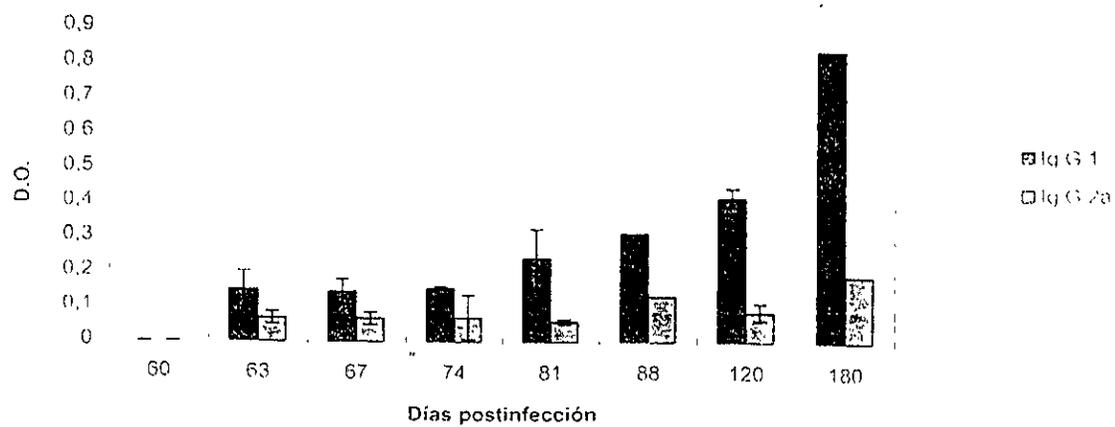


Fig. 16 Prueba de ELISA para subclases de inmunoglobulinas

Fase Crónica Control (promedio de sueros)



Fase Crónica Trasplante de Adrenales (promedio de sueros)

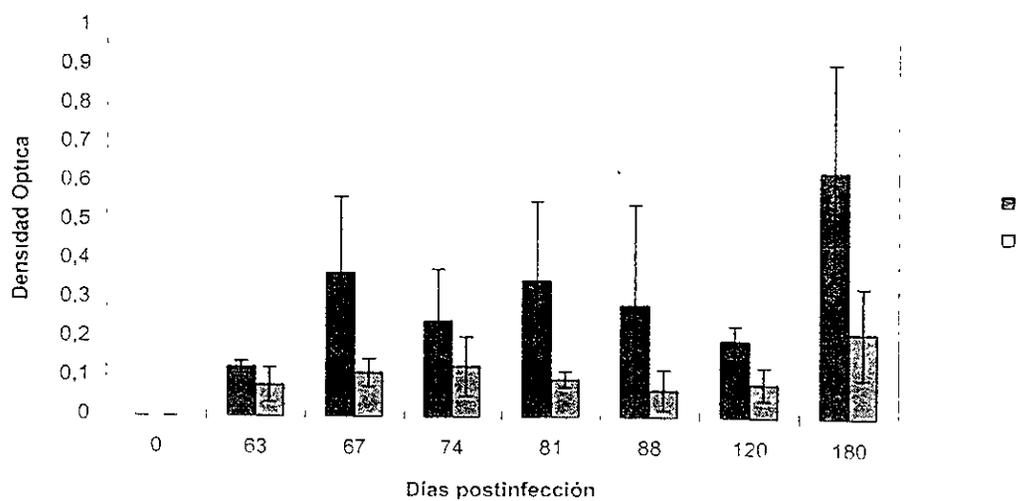
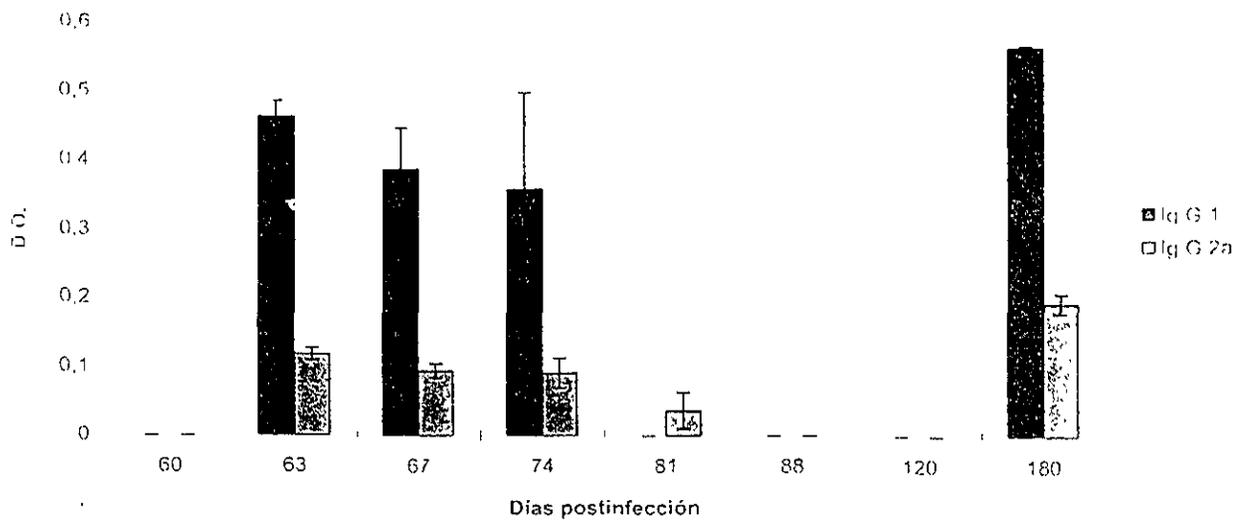


Fig. 17 Prueba de ELISA para subclases de inmunoglobulinas

DHEA 50 µg/ 50 µl A.O. + Corticosterona (promedio de sueros)



AED 25 µg/ 50 µl A.M. + Corticosterona (promedio de sueros)

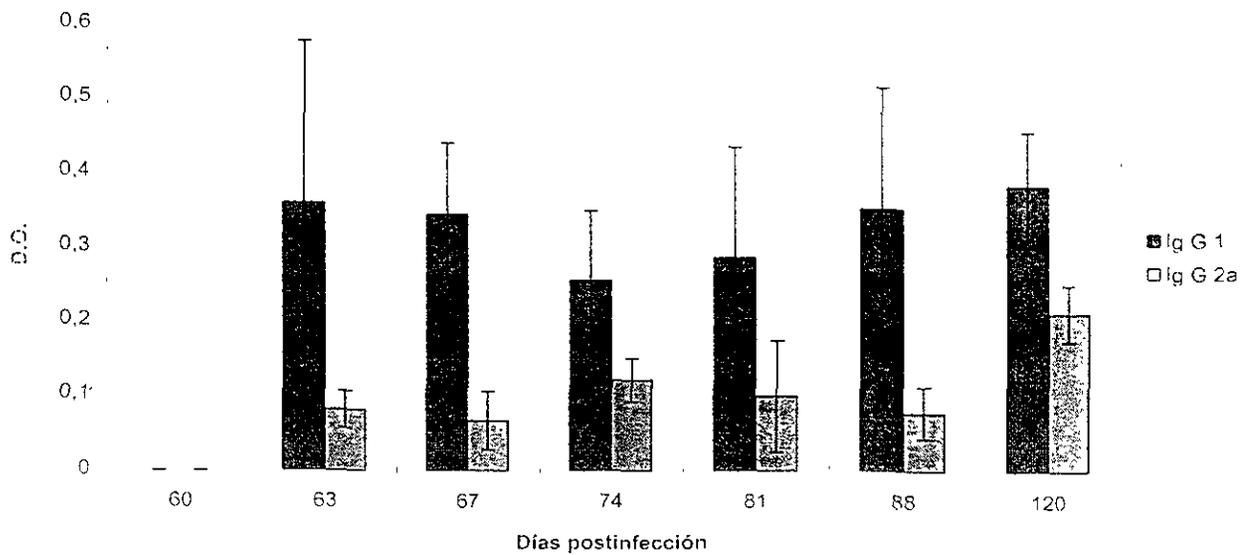


Fig. 18 Prueba de ELISA para subclases de inmunoglobulinas

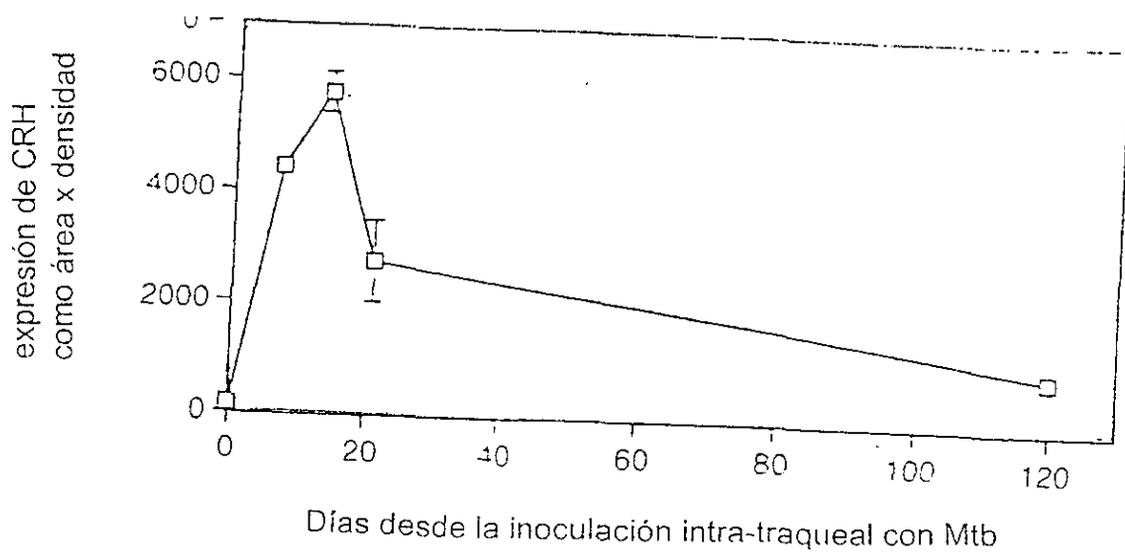


Fig. 19 Expresión de CRH en los núcleos paraventriculares de ratones inoculados con *Mtb*.

El valor para la expresión de CRH en el día 0, es difícil verlo con la escala que se usó, dicho valor fué 157 ± 41 . Se muestran las medias \pm DS.

Niveles de corticosterona en suero.

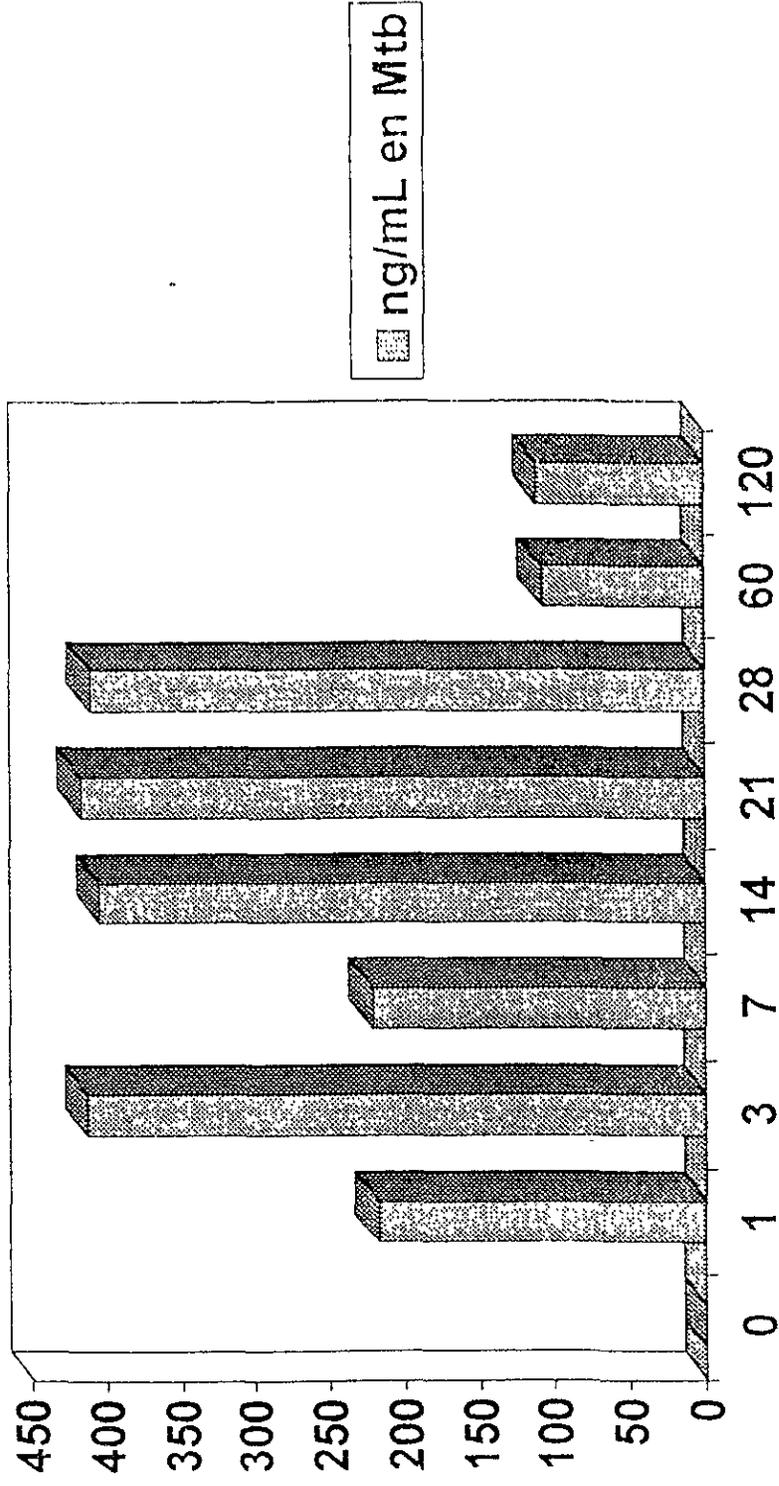


Fig. 20 Niveles de corticosterona en sueros de ratones inoculados con *Mtb*.