



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA,  
BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**INTERACCIONES INMUNOENDOCRINAS EN LA  
TUBERCULOSIS PULMONAR: INFLUENCIA DE LA  
INFECCIÓN SOBRE LA MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN  
GONADAL**

Tesis que presenta:

**M. en C. BRENDA RAMOS ROBLES**

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias en la  
Especialidad de Fisiología Celular y Molecular

**Directores de tesis:** Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Dr. Rogelio Hernández Pando

Ciudad de México

Agosto, 2018

Este trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. Marta Catalina Romano Pardo y la co-dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de Doctorado con el número (CVU/Becario): 288375/243109. También se contó con el apoyo económico para la titulación por parte del CINVESTAV-IPN.

## Resumen

**Introducción:** La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que principalmente afecta los pulmones. En el curso de la tuberculosis pulmonar, hay cambios notables en la producción de citocinas que causa cambios endocrinos. Hasta el momento, no se conocen los cambios fisiológicos e histológicos en los sistemas reproductivos masculinos y femeninos durante la tuberculosis pulmonar.

**Objetivo:** Investigar si la tuberculosis pulmonar produce alteraciones histológicas de los ratones BALB / c en los órganos reproductivos. En machos investigar si la TB pulmonar provoca alteraciones en la espermatogénesis, en las concentraciones de testosterona en suero, si genera alteraciones histológicas en próstata y vesícula seminal y en la expresión de citocinas testiculares. En hembras investigar si la TB pulmonar provoca alteraciones en el número de folículos ováricos, en la concentración de estradiol en el suero y si genera alteraciones histológicas en útero y oviducto y en la expresión de citocinas testiculares.

**Métodos:** Se infectaron ratones machos y hembras de la cepa BALB / c por vía intratraqueal con una dosis alta de la cepa MTB H37Rv. Grupos de seis animales no infectados y de animales infectados fueron sacrificados los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120 después de la infección. Las cargas bacilares en machos y hembras se determinaron contando unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmones, testículos, próstata, vesículas seminales, útero y ovario. Las secciones histológicas se obtuvieron de los mismos órganos. El número y la calidad de los espermatozoides fueron evaluados por espermatobioscopia. Las concentraciones séricas de testosterona y estradiol se determinaron mediante radioinmunoanálisis (RIA) en control y ratones infectados en cada momento de sacrificio. La expresión de citocinas en testículo y ovario se realizaron mediante inmunohistoquímicas y la cuantificación de citocinas mediante la morfometría digital automatizada.

**Resultados:** MTB solo creció en tejido pulmonar. No hubo evidencia de tuberculosis extrapulmonar ni en machos ni en hembras. Con respecto a los machos encontramos que los andrógenos séricos mostraron una tendencia a la disminución en los ratones infectados en comparación para los animales sanos, la diferencia es estadísticamente significativa en el día 120 después de la infección. Sorprendentemente, el peso del testículo no se modificó a lo largo del estudio y no se encontraron cambios histopatológicos. Sin embargo, detectamos una disminución significativa en el peso de las vesículas seminales y la próstata a partir de los 28 días post-infección. La atrofia de las vesículas seminales y el epitelio prostático fue significativa, comenzando después de 60 días de infección. La espermatobioscopia reveló hipospermia en las últimas etapas de la enfermedad. Además, observamos en el testículo un desequilibrio significativo local en el perfil de citocina (aumento de IL-6 y disminución de IL-10 y TGF- $\beta$  niveles). Con respecto a las hembras encontramos que la concentración sérica de estradiol aumento

significativamente a partir del día 60 post-infección. El peso de los ovarios no presentó alteraciones. Sin embargo, al revisar su histología encontramos atrofia ovárica, tal como se presentó en el útero y en las microvellosidades ciliadas del oviducto. En el ovario se presentó una disminución en la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6. En machos y en hembras se observó reducción muy significativa del peso corporal durante la TB pulmonar tardía.

**Conclusión:** La tuberculosis pulmonar afecta la histología del sistema reproductivo masculino y femenino, provocando en machos atrofia en la próstata y en las vesículas seminales y en hembras atrofia en el ovario. Esto se debe a cambios hormonales que desencadenan los ratones por la infección con MTB. Además, encontramos un desequilibrio del perfil de citocinas proinflamatorias y síndrome de desgaste durante la enfermedad tardía.

## ABSTRACT

**Introduction:** Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) that mainly affects the lungs. In the course of pulmonary tuberculosis, there are marked changes in the production of cytokines that cause endocrine changes. Until now, physiological and histological changes in the male and female reproductive systems during pulmonary tuberculosis are not known.

**Objective:** To investigate if pulmonary tuberculosis produces histological alterations of BALB/ c mice in the reproductive organs. In males, investigate whether pulmonary TB cause alterations in spermatogenesis, in serum testosterone concentrations, if it generates histological alterations in prostate and seminal vesicles and in the expression of testicular cytokines. In females, investigate whether pulmonary TB causes alterations in the number of ovarian follicles, in the concentration of estradiol in the serum and if it generates histological alterations in the uterus and oviduct and in the expression of testicular cytokines.

**Methods:** Male and female mice of the BALB/ c strain were infected intratracheally with a high dose of the MTB strain H37Rv. Groups of control animals and infected animals (6 animals per group) were sacrificed on days 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90 and 120 after infection. Bacillary loads in male and females were determined by counting colony-forming units (CFU) in lungs, testes, prostate, seminal vesicles, uterus and ovary. The histological sections were obtained from the same organs. The number and quality of the spermatozoa were evaluated by spermatobioscopy. Serum concentrations of testosterone and estradiol were determined by radioimmunoassay (RIA) in control and infected mice at each time of sacrifice. The expression of cytokines in testis and ovary was performed by immunohistochemistry and quantification of cytokines by automated digital morphometry.

**Results:** MTB only grew in lung tissue. There was no evidence of extrapulmonary tuberculosis in either males or females. With regard to males we found that serum androgens showed a decreasing tendency in infected mice compared to healthy animals, the difference being statistically significant at day 120 after infection. Surprisingly, the weight of the testicle was not modified throughout the study and no histopathological changes were found. However, we detected a significant decrease in the weight of the seminal vesicles and the prostate from 28 days post-infection. The atrophy of the seminal vesicles and prostatic epithelium was significant, beginning after 60 days of infection. Spermatobioscopy revealed hypospermia in the later stages of the disease. In the addition, we observed in the testicle a significant local imbalance in the cytokine profile (increased IL-6 and decreased IL-10 and TGF- $\beta$  levels). With regard to the females, we found that the serum estradiol concentration increased significantly from day 60 post-infection. The weight of the ovaries did not present alterations. However, when reviewing his histology we found ovarian atrophy, as it was presented in the uterus and in the ciliated microvilli of the oviduct. In the ovary there was a decrease in the expression of IL-1 $\beta$  and IL-6. In males and females, a very significant reduction in body weight was observed during late pulmonary TB.

**Conclusion:** Pulmonary tuberculosis affects the histology of the male and female reproductive system, causing male atrophy in the prostate and in the seminal vesicles and in females atrophy in the ovary. This is due to hormonal changes that trigger the mice by the infection with MTB. In addition, we found an imbalance in the profile of pro-inflammatory cytokines and wasting syndrome during late disease.

## DEDICATORIAS

*Dedico este trabajo a las tres mujeres más importantes en mi vida:*

*A Karla, mi hermana por enseñarme que en esta vida mi único objetivo es ser feliz. A pesar del paso de los años tu ausencia sigue doliendo como el primer día pero sé que donde quiera que yo esté tú estás conmigo. Te llevo en mi mente y en mi corazón a cada minuto y estoy segura que tendremos la eternidad para volver a estar juntas. A mi madre y a mi abuela por ser las mujeres más empoderadas e independientes que conozco. Por ser mi ejemplo de esfuerzo y dedicación. Las amo con todo mí ser.*

*Además, dedico este trabajo a mi primo Enrique Ramos Robles, por ser un individuo excepcional que me ha enseñado que no importa lo difícil que se torne la vida, lo único que queda es continuar viviendo. Cuando inicie este proyecto tú estabas en medio de una gran batalla y para mi es una dicha hoy poder plasmar estas líneas sabiendo que tu desde hace tiempo saliste victorioso de aquella situación tan extrema. Te amo primo*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Catalina Romano Pardo por ser mi tutora, por darme la oportunidad de hacer el doctorado en su laboratorio. Han sido varios años de mucho trabajo y sin duda su apoyo y su guía han sido vitales para mi desarrollo profesional. Gracias por creer en mí y por brindarme su confianza. Gracias por darme una oportunidad cuando todo parecía tan oscuro. Gracias a usted todo eso hoy solo es un recuerdo. No pude elegir a una mejor tutora que usted, sin duda ha sido la mejor tutora que he tenido y espero que la vida me permita llegar a ser una doctora como usted tan admirada y respetada. Mi corazón está lleno de agradecimiento y cariño hacia usted.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por aceptar la co-tutoría. Por permitirme trabajar con su modelo animal. Gracias porque desde el día que nos presentaron usted se interesó en mi proyecto. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por darme lo necesario para desarrollar mi investigación. Gracias por todos sus comentarios y sus aportaciones. Gracias por mostrarme el maravilloso mundo de la inmunología.

Mi eterno agradecimiento a mis asesores de tesis, la Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, la Dra. María Esther Orozco Orozco, el Dr. Raúl José Bobes Ruíz y el Dr. José Luis Reyes Sánchez por sus invaluable aportaciones y consejos para mejorar este proyecto de investigación. Gracias por su interés infinito hacia este proyecto. Son personas que admiro mucho y para mí ha sido un honor el poder contar con su ayuda.

Al CONACyT por brindarme la beca de doctorado con registro No. 288375/243109 haciendo posible mi manutención para el desarrollo de este proyecto.

Al CINVESTAV-IPN por el apoyo económico que me otorgo para titularme.

Al Biólogo Ricardo Valdéz por su apoyo incondicional en las técnicas de RIA y cultivo primario. Gracias por permitirme trabajar en equipo con usted. Su ayuda fue vital para lograr el éxito de cada uno de mis experimentos.

A la Dra. Brenda Maquina Castillo por su apoyo en las inmuno-histoquímicas.

A la Dra. Dulce Mata Espinosa por su apoyo en la recuperación de bacterias para la infección de los ratones.

Al Dr. Jorge Barrios Payán por su apoyo en la infección de los ratones.

A la Dra. Guillermina Baay Guzmán por su apoyo incondicional en la Morfometría Digital Automatizada.

Al Dr. Oscar Bello Monroy por brindarme su amistad y conocimiento. Gracias por todos los bellos momentos que compartimos. Gracias por ser un gran compañero y amigo y siempre tener la palabra adecuada para animarme. Te quiero mucho amigo

A la secretaria Luz María Buendía por su apoyo administrativo en el CINVESTAV en estos años de trabajo. Gracias por todo Luzma eres una persona que admiro y respeto por tu capacidad de servicio.

A la secretaria Eréndira Ángeles Romero por su apoyo administrativo en el INCMNSZ en todos estos años de trabajo. Infinitas gracias por todo Ere.

A mi madre, Ninfa Robles Martínez, por darme los dos más grandes regalos que se le pueden otorgar a una persona, que son darme la vida y enseñarme a leer. Mil gracias mi Bicho, gracias por formarme el hábito de la lectura porque con eso me entregaste las llaves del mundo. Gracias por amarme de la forma en que lo haces, por escucharme, por ser mi confidente, mi compañera, mi co-equipera. Mi Bicho este logro en gran parte te pertenece porque sin ti todo hubiera sido mucho más difícil. Gracias por siempre estar, por hacerme sentir ese apoyo incondicional. Tú eres uno de los pilares más importantes y fuertes que me sostienen. Gracias por enseñarme a ser valiente, fuerte y resiliente. No alcanzarían las hojas de papel para poder plasmar todo el agradecimiento que siento por ti mi Bichito, lo único que me queda decir es gracias por existir porque tengo a la mejor mamá del mundo. Siempre lo he dicho y una vez más lo reitero, seguramente en mi vida pasada tuve que hacer algo muy bueno para que me premiaran con una madre como tú. Y si un día tengo la oportunidad de ser madre espero llegar a ser una madre como lo eres tú. Te amo con todo mi corazón mi Bicho.

A mi abuela, Leonila Martínez García, Jefa gracias a ti por todo el amor y cuidado que me has brindado desde que nací. Gracias por hacerme la niña y ahora la mujer más amada y consentida del mundo. Tú eres mi ejemplo de trabajo y entrega. Jefa te agradezco infinitamente todo lo que me das, no te imaginas lo bien que le hace a mi alma escuchar tu voz y saber que siempre estás ahí, y que siempre me traes en tus pensamientos. Gracias por reír y llorar conmigo. Gracias mi Bichito viejito por siempre estar al pendiente de mí y cuidarme como si fuera una niña pequeña. Te amo infinitamente mi Bichito viejito.

A Uriel Juárez Hernández, mi amor porque desde la primera vez que vi mi reflejo en tus ojos supe lo importante que serías en mi vida. Gracias mi amor por compartir conmigo esta aventura, por amarme como lo haces, por compartirme tus mañanas y tus noches. Gracias por querer compartir conmigo este tren que se llama vida. Te amo con toda mi alma mi amor.

A mis tíos Enrique y Tere por ser mis cómplices y compañeros en este viaje. Este logro también les pertenece porque ustedes han estado ahí siempre. Gracias tíos por siempre estar al pendiente de mí, por cuidarme y procurarme como la hacen. Gracias por todo lo que me han dado. Los quiero infinitamente.

A mi familia gracias por ser mi apoyo, nunca me he sentido sola porque sé que detrás de mi hay muchísima gente que me ama y me alienta a seguir adelante. Me siento profundamente honrada de contar con una familia maravillosa que me ha



sacado adelante de todas las formas posibles. Gracias por enseñarme que la familia es lo más importante.

A mis amigos por entender mis ausencias todo este tiempo. Gracias por su apoyo y cariño. Ustedes son parte fundamental en mi existencia. Gracias por compartir conmigo buenos y malos momentos. Gracias por estar. Los amo mucho

Finalmente, quiero agradecer a Dios por permitirme vivir todo lo que he vivido hasta ahora. Por nunca dejarme sola y por siempre darme fuerzas para continuar. En los momentos más oscuros siempre me muestra una luz que me indica el camino. Gracias Dios por amarme y cuidarme como lo haces. Gracias por bendecirme cada día. Amén.

## INDICE

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
DEDICATORIAS.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XV
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Generalidades.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Mycobacterium tuberculosis.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1 Mycobacterium tuberculosis y la Historia.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2 Epidemiología de la tuberculosis.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3 Vías de transmisión de tuberculosis.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.4 Desarrollo de la enfermedad.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.5 Signos y síntomas.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.6 Diagnóstico.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.7 Tratamiento.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3 Mecanismos Inmunológicos en la Tuberculosis.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.1 Interacción inmunoendocrina en la Tuberculosis.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2 Activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y su participación en la tuberculosis.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Relación entre el Género y la Frecuencia de la Tuberculosis.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.1 Efectos de la Tuberculosis sobre aspectos reproductivos en el hombre.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.2 Efectos de la Tuberculosis sobre aspectos reproductivos en la mujer.....</b>	<b>28</b>
<b>1.5 Modelo Murino de Tuberculosis Pulmonar Progresiva.....</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Aparato Reproductor Masculino.....</b>	<b>32</b>
<b>1.6.1 Fisiología del testículo en humanos.....</b>	<b>33</b>
<b>1.6.1.1 Tubos Seminíferos.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.1.1.1 Células Germinales.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.1.1.2 Células de Sertoli.....</b>	<b>35</b>
<b>1.6.1.2 Tejido Intersticial.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6.1.2.1 Células de Leydig.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6.1.3 Funciones del testículo.....</b>	<b>38</b>
<b>1.6.1.3.1 Espermatogénesis.....</b>	<b>38</b>
<b>1.6.1.3.2 Función Endocrina del Testículo.....</b>	<b>42</b>
<b>1.6.2 Ductos.....</b>	<b>44</b>
<b>1.6.2.1 Epidídimo.....</b>	<b>45</b>
<b>1.6.2.1.1 Maduración del Espermatozoide en el Epidídimo.....</b>	<b>45</b>



5.6.2	Inmuno-histoquímica de las Citocinas en Tejido.....	68
5.6.3	Cuantificación de la Expresión de Citocinas en Tejido.....	69
5.7	Análisis Estadístico.....	70
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>6.1</b>	<b>EFFECTO DE LA INFECCIÓN PULMONAR CON <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EN ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE RATONES MACHO.....</b>	<b>71</b>
6.1.1	Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) en pulmones infectados con H37Rv así como testículos, vesículas seminales y próstata.....	71
6.1.2	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre el Peso Corporal de los Ratones.....	72
6.1.3	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre el Peso del Pulmón y en los órganos Sexuales Masculinos.....	73
6.1.4	Corrección del Peso de los Órganos por el Peso Corporal de Ratones en el Curso de Tuberculosis Pulmonar.....	75
6.1.5	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre la histopatología de testículos, vesículas seminales y próstata.....	77
6.1.5.1	Testículo.....	77
6.1.5.2	Vesícula Seminal.....	77
6.1.5.3	Próstata.....	79
6.1.6	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre las concentraciones de testosterona en Suero.....	81
6.1.7	Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre la Calidad Espermática.....	82
6.1.8	La Expresión de citocinas en testículo por Inmuno-histoquímica (IHQ).....	84
6.1.8.1	Interleucina 6 (IL-6).....	84
6.1.8.2	Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....	85
6.1.8.3	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ).....	87
6.1.8.4	Interleucina 10 (IL-10).....	89
6.1.8.5	Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ).....	91
6.1.8.6	Interferón Gamma (INF- $\gamma$ ).....	93
<b>6.2</b>	<b>EFFECTO DE LA INFECCIÓN PULMONAR CON <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EN ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE RATONES HEMBRA.....</b>	<b>94</b>
6.2.1	Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) en Pulmones Infectados con H37Rv así como en ovario, oviducto y útero.....	94
6.2.2	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre el peso Corporal de las Ratonas.....	95
6.2.3	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre el Peso del Pulmón y en los Órganos Sexuales Femeninos.....	96
6.2.4	Corrección del peso de los Órganos por el Peso Corporal de Ratonas en el Curso de Tuberculosis Pulmonar.....	97

6.2.5	Efecto de la Infección Pulmonar con H37Rv sobre el grosor del endometrio.....	99
6.2.6	Efecto de la infección Pulmonar con H37Rv sobre la longitud de las microvellosidades ciliadas del oviducto de las Ratonas.....	100
6.2.7	Efecto de la Infección pulmonar con H37Rv sobre la histopatología del ovario.....	102
6.2.8	Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el número de folículos en ovarios.....	104
6.2.9	Efecto de la infección Pulmonar con H37Rv sobre las concentraciones de estradiol en suero.....	106
6.2.10	Expresión de citocinas en ovarios por inmuno-histoquímica (IHQ).....	107
6.2.10.1	Interleucina 6 (IL-6).....	107
6.2.10.2	Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....	109
7.	DISCUSIÓN.....	111
8.	CONCLUSIONES.....	123
9.	PERSPECTIVAS.....	124
9.1	Macho.....	124
9.2	Hembras.....	124
10.	ANEXOS.....	125
10.1	Reactivos .....	125
11.	REFERENCIAS.....	126

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Aparato Reproductor Masculino.....	<b>32</b>
<b>Figura 2:</b> Testículo.....	<b>33</b>
<b>Figura 3:</b> Estructura de los túbulos seminíferos.....	<b>34</b>
<b>Figura 4:</b> Organización de las células germinales en el túbulo seminífero...	<b>35</b>
<b>Figura 5:</b> Síntesis de testosterona en las células de Leydig.....	<b>38</b>
<b>Figura 6:</b> Espermatogénesis.....	<b>41</b>
<b>Figura 7:</b> Esteroidogénesis en humanos.....	<b>43</b>
<b>Figura 8:</b> Aparato Reproductor Femenino.....	<b>48</b>
<b>Figura 9:</b> Funciones del ovario.....	<b>50</b>
<b>Figura 10:</b> Carga bacilar en el pulmón de ratones macho infectados con H37Rv.....	<b>72</b>
<b>Figura 11:</b> Peso corporal de ratones con tuberculosis pulmonar (H37Rv) y animales sanos como control.....	<b>73</b>
<b>Figura 12:</b> Pesos de pulmón y órganos sexuales masculinos de ratones en el curso de tuberculosis pulmonar con H37Rv.....	<b>74</b>
<b>Figura 13:</b> Peso de órganos corregido por peso corporal de ratones en el curso de la TB.....	<b>76</b>
<b>Figura 14:</b> Micrografías representativas de vesícula seminal de ratones sanos e infectados con MTB.....	<b>78</b>
<b>Figura 15:</b> Arquitectura del epitelio de la vesícula seminal de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos.....	<b>79</b>
<b>Figura 16:</b> Micrografías representativas de próstata de ratón.....	<b>80</b>
<b>Figura 17:</b> Arquitectura de epitelio de próstata de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos.....	<b>81</b>
<b>Figura 18:</b> Las concentraciones de testosterona en suero de ratones infectados con H37Rv y de ratones control.....	<b>81</b>
<b>Figura 19:</b> Evaluación de la calidad espermática de ratones infectados con H37Rv vía intratraqueal.....	<b>83</b>
<b>Figura 20:</b> Inmuno-histoquímica y morfometría digital automatizada de la expresión de IL-6 en tejido testicular de ratones con H37Rv y controles.....	<b>84</b>
<b>Figura 21:</b> Cuantificación de la expresión de IL-6 por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos.....	<b>85</b>
<b>Figura 22:</b> Expresión de IL-1B en testículos de ratones infectados con H37Rv y controles.....	<b>86</b>
<b>Figura 23:</b> Cuantificación de la expresión de IL-1B por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos.....	<b>87</b>
<b>Figura 24:</b> Determinación de la expresión de TGF-B en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv y controles sanos por vía intratraqueal.....	<b>88</b>
<b>Figura 25:</b> Cuantificación de la expresión de TGF-B por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos.....	<b>89</b>
<b>Figura 26:</b> Expresión de IL-10 en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal.....	<b>90</b>
<b>Figura 27:</b> Cuantificación de la expresión de IL-10 por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos.....	<b>91</b>

<b>Figura 28:</b>	Expresión de TNF-a en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal.....	<b>92</b>
<b>Figura 29:</b>	Expresión de INf-gamma en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal.....	<b>93</b>
<b>Figura 30:</b>	Carga bacilar de ratonas infectadas con H37Rv y controles sanos.....	<b>95</b>
<b>Figura 31:</b>	Peso corporal de ratonas con tuberculosis pulmonar (H37Rv) y animales sanos como control.....	<b>96</b>
<b>Figura 32:</b>	Peso del pulmón y órganos sexuales femeninos de ratonas en el curso de tuberculosis pulmonar con H37Rv.....	<b>97</b>
<b>Figura 33:</b>	Peso de órganos corregido por peso corporal de ratonas en el curso de la TB.....	<b>98</b>
<b>Figura 34:</b>	Grosor del endometrio del oviducto de ratonas con tuberculosis pulmonar y controles sanos.....	<b>99</b>
<b>Figura 35:</b>	Determinación del grosor del endometrio del útero de ratonas con tuberculosis pulmonar comparada con ratonas sanas.....	<b>100</b>
<b>Figura 36:</b>	Vellosidades del oviducto de ratonas con tuberculosis pulmonar.....	<b>101</b>
<b>Figura 37:</b>	Longitud de las vellosidades del oviducto de ratones con tuberculosis pulmonar comparada con ratonas sanas.....	<b>102</b>
<b>Figura 38:</b>	Micrografías de cortes de ovario de ratonas infectadas con H37Rv y controles teñidos con H&E en los días 28, 60, 90 y 120 post-infección.....	<b>103</b>
<b>Figura 39:</b>	Determinación del número de cada tipo de folículo en ovarios de ratonas que cursan tuberculosis pulmonar y controles sanos en diferentes tiempos de infección.....	<b>105</b>
<b>Figura 40:</b>	Las concentraciones de estradiol en suero de ratonas infectadas con H37Rv y en ratonas control.....	<b>106</b>
<b>Figura 41:</b>	Determinación de la expresión de IL-6 en tejido de ovario de ratonas infectadas con H37Rv por vía intratraqueal.....	<b>107</b>
<b>Figura 42:</b>	Cuantificación de la expresión de IL-6 por morfometría digital automatizada en los ovarios de ratonas infectadas y sanas.....	<b>108</b>
<b>Figura 43:</b>	Determinación de la expresión de IL-1B en tejido de ovario de ratonas infectadas con H37Rv y controles.....	<b>109</b>
<b>Figura 44:</b>	Cuantificación de la expresión de IL-1B por morfometría digital automatizada en los ovarios de ratonas infectadas y sanas.....	<b>110</b>

**ABREVIATURAS**

<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ - hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>ABP</b>	Proteína ligadora de andrógenos
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>ADC</b>	Albúmina, dextrosa, catalase
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosine
<b>BAAR</b>	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette y Guérin
<b>BSA</b>	Albúmina de suero de bovino
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbon
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DHEA</b>	Hormona dehidroxiepiandrosterona
<b>DHT</b>	Hormona dihidrotestosterona
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EHHS</b>	Eje Hipotálamo Hipófisis Suprarrenal
<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento fibroblástico
<b>FSH</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>GH</b>	Hormona del Crecimiento
<b>hCG</b>	Gonadotropina coriónica humana
<b>HEPES</b>	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piprazin-1-il] etanosulfónico
<b>IGF-I</b>	Factor de Crecimiento de insulina Tipo 1
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímicas
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa inducible
<b>LDH-C4</b>	Lactato deshidrogenasa



<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>LHR</b>	Receptor de hormona luteinizante
<b>MHC-II</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>ON</b>	Óxido Nítrico
<b>P1</b>	Protamina rica en tirosina
<b>P2</b>	Protamina rica en arginine
<b>PPD</b>	Derivado Proteico Purificado
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>RPBI</b>	Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos
<b>SGF</b>	Factor de Crecimiento Seminífero
<b>SHBG</b>	Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales
<b>SSE</b>	Solución Salina Estéril
<b>StAR</b>	Proteína Esteroidogénica de Regulación Aguda
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta
<b>Th-1</b>	Linfocitos T cooperadores Tipo 1
<b>Th-2</b>	Linfocitos T cooperadores Tipo 2
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>UFC's</b>	Unidad Formadora de Colonias
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>ZP1</b>	Proteína 1 de Unión a Espermatozoides de Zona Pelúcida
<b>ZP2</b>	Proteína 2 de Unión a Espermatozoides de Zona Pelúcida
<b>ZP3</b>	Proteína 3 de Unión a Espermatozoides de Zona Pelúcida
<b>ZP4</b>	Proteína 4 de Unión a Espermatozoides de Zona Pelúcida



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Generalidades**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Generalmente el bacilo infecta a los pulmones (TB pulmonar); sin embargo, puede infectar a otros órganos como riñón, cerebro, ovarios, testículos, entre otros, a lo que se le ha llamado tuberculosis extra-pulmonar (González Mendoza., 2013). Esta enfermedad es muy compleja, ya que participan factores del huésped como la constitución genética, respuesta inmunológica, así como de la bacteria, genes y factores de virulencia, y el medio ambiente como la pobreza, desnutrición, hacinamiento entre otros.

### **1.2. *Mycobacterium tuberculosis***

Es un bacilo Gram positivo, aerobio estricto, inmóvil, de 4 µm de longitud media; la coraza lipídica de su pared lo hace resistente a la decoloración con ácido y alcohol; de ahí el nombre de Bacilo Ácido Alcohol Resistente (BAAR), y pertenece al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en cual engloba a un grupo de micobacterias con un 95% de homología en su DNA (Ryan, 1992; González Mendoza, 2013).

#### **1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis* y la historia**

Los estudios señalan que MTB se originó hace más de 150 millones de años, en el periodo jurásico, siendo Gutiérrez y cols., en el 2005 los precursores de la idea en la que el inicio de la infección en seres vivos pudo comenzar hace 3 millones de años en los homínidos.

En 1882, Robert Koch describió el agente etiológico de la tuberculosis y lo denominó *Bacterium tuberculosis*. Sin embargo, el nombre inicial fue sustituido por el de *Mycobacterium tuberculosis* en 1896 por Lehmann y Neumann ya que en los cultivos se puede observar una morfología similar a la de los hongos. El término *Mycobacterium* significa hongo-bacteria, siendo un término más adecuado para este agente infeccioso. En 1890, Koch presentó un aislado del bacilo tuberculoso, refiriéndose a éste como... “neutralizante de la patogenicidad de la bacteria...”, el

cual, sería el inicio para el desarrollo de la prueba diagnóstica PPD (Derivado Proteico Purificado) (Thomas, 2006).

Años más tarde, en 1921, Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron la “vacuna contra la tuberculosis” mediante un aislado de la bacteria *Mycobacterium bovis*. Tras la primera guerra mundial, se comenzó con su aplicación a los niños nacidos de madres enfermas de tuberculosis, lográndose la disminución en la incidencia de la tuberculosis. Sin embargo, fue hasta el año de 1928 que comenzó a utilizarse en varios países (Ryan, 1992; Thomas, 2006).

### **1.2.2 Epidemiología de la Tuberculosis**

La tuberculosis es la principal causa de mortalidad en el mundo por un agente infeccioso. En 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0.4 millones de personas con VIH). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos, siendo seis países los que representan el 60% de la mortalidad total; encabeza esta lista la India, seguida de Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. Se estima que en el 2015 enfermaron de tuberculosis un millón de niños y que 170 000 de ellos murieron debido a esta causa (sin incluir los niños con VIH).

Por otro lado, la tuberculosis es una de las causas principales de defunción en las personas VIH-positivas: en 2015, el 35% de las muertes asociadas al VIH se debieron a la tuberculosis. Las estadísticas señalan que la incidencia de la tuberculosis ha disminuido en un 1.5% anual desde 2000. Sin embargo, las personas infectadas por el VIH tienen 20 veces más probabilidades de desarrollar tuberculosis activa. Ese riesgo es más elevado en las personas que padecen otros trastornos que también dañan el sistema inmunitario (OMS, 2017).

La tuberculosis afecta principalmente a los adultos en los años más productivos de su vida, lo que no significa que los demás grupos de edad estén exentos de riesgo. Además, la tuberculosis es la tercera causa de muerte en mujeres entre 15 y 44

años por lo que fallecen aproximadamente 500,000 mujeres por año, la mayoría de ellas en edad reproductiva (OMS, 2017).

Asimismo, se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, lo cual significa que existen personas infectadas por el bacilo pero que aún no se han enfermado y no pueden transmitir la infección (OMS, 2017). MTB puede mantenerse viable por largos periodos de tiempo y en algún momento puede reactivarse produciendo la enfermedad progresiva (Parrish y cols., 1998). Las personas con tuberculosis latente tienen un riesgo a lo largo de la vida de enfermar de tuberculosis de un 10%. En cambio, las personas inmunodeprimidas, por ejemplo las que padecen VIH, desnutrición o diabetes, y los consumidores de tabaco corren un riesgo mucho mayor de enfermar. El consumo de tabaco aumenta considerablemente el riesgo de enfermar de tuberculosis y de morir por esta misma causa, se calcula que a nivel mundial más del 20% de los casos de tuberculosis son atribuibles al tabaquismo (OMS, 2017).

### **1.2.3 Vías de Transmisión de Tuberculosis**

La infección se transmite de persona a persona a través del aire. Cuando un enfermo de TB pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa gotas de agua que contiene MTB que pueden permanecer suspendidos en el aire por varias horas. Basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada (OMS, 2017).

### **1.2.4 Desarrollo de la enfermedad**

Una vez que ocurre la infección solo un 10% de personas inmunocompetentes desarrollan TB activa en ese momento, el otro 90% no se enferma y no transmite la enfermedad. Sin embargo, en personas con inmunodeficiencias causadas por desnutrición, VIH o diabetes la proporción que desarrolla TB es más alta. Por lo tanto, cuando el sistema inmunológico no puede controlar la infección se desarrolla la enfermedad pulmonar (OMS, 2017).

Debido a la vía de infección de MTB es capaz de llegar a los alveolos pulmonares; una vez en el alveolo es capturado por los macrófagos y conducidos a los nódulos

linfáticos desde los cuales la enfermedad puede dispersarse a otros órganos. En consecuencia, son los macrófagos alveolares y las células epiteliales bronquiales y alveolares las primeras que confrontan y son infectadas por el agente infeccioso. Los macrófagos alveolares han sido considerados como las células más importantes para contener inicialmente la infección.

Entre dos u ocho semanas después de la infección se desarrolla la inmunidad mediada por células y la hipersensibilidad, lo cual produce una reacción positiva para el test de tuberculina y se contiene la enfermedad en los individuos inmunocompetentes. Sin embargo la respuesta inmune inflamatoria puede resultar en daño pulmonar (Chen y cols., 2018).

### **1.2.5 Signos y síntomas**

La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunitario actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Sin embargo los síntomas comunes de la tuberculosis pulmonar activa son tos productiva (a veces con sangre en el esputo), dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos, los que pueden ser leves durante muchos meses. Esto puede hacer que la persona afectada tarde en buscar atención médica, con el consiguiente riesgo de que la bacteria se transmita a otros sujetos. Una persona con tuberculosis activa puede infectar a lo largo de un año a entre 10 y 15 personas por contacto directo (OMS, 2017).

### **1.2.6 Diagnóstico**

Son muchos los países que siguen dependiendo de la baciloscopia de esputo para diagnosticar la tuberculosis, una prueba que viene utilizándose desde hace mucho tiempo. Este método consiste en el examen microscópico de muestras de esputo por técnicos de laboratorio para detectar la presencia de la bacteria de la tuberculosis. Sin embargo, la microscopía solo detecta la mitad de los casos de tuberculosis y es incapaz de determinar si hay farmacorresistencia (OMS, 2017).

La OMS en 2010 recomendó el empleo de la prueba rápida Xpert MTB/RIF® como ensayo de diagnóstico inicial en todas las personas con signos y síntomas de

tuberculosis. La prueba consiste en detectar de forma simultánea la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina, que es el fármaco más importante contra esta enfermedad. Este método permite obtener un diagnóstico en el plazo de dos horas; por lo cual, más de 100 países han empezado ya a utilizarlo, y en 2015 se adquirió a nivel mundial un total de 6.2 millones de cartuchos (OMS, 2017).

### **1.2.7 Tratamiento**

La forma activa del bacilo sensible a los antibióticos se trata con una combinación estándar de cuatro medicamentos que se administra durante 6 meses y que debe ir acompañada de las pertinentes tareas de información, supervisión y atención del paciente a cargo de un agente sanitario o de un voluntario capacitado al efecto. Ya que el tiempo de tratamiento es bastante largo, sin ese apoyo el cumplimiento terapéutico puede resultar difícil, lo que propiciaría la propagación de la enfermedad (OMS, 2017).

Es importante mencionar que la tuberculosis es una enfermedad curable, pero es necesario un diagnóstico temprano. Se logra prevenir mediante una vida sana e higiénica y buena nutrición, con la aplicación de la vacuna BCG; así como, con la identificación oportuna de los enfermos asegurando su curación para no contagiar a otras personas (SSA, 2017; OMS, 2017)

### **1.3 Mecanismos inmunológicos en la TB**

Una vez iniciada la infección, comienzan las interacciones iniciales de las bacterias con el macrófago, y se llevan a cabo mediante los receptores de la membrana celular, tales como los receptores para la porción Fc de anticuerpos o para ciertos factores del complemento (Schlesinger y cols., 1990), así como para azúcares como la manosa (Schlesinger y cols., 1993) y proteínas surfactantes (Zimmerli y cols., 1996), CD14 (Peterson y cols., 1995) y CD43 (Randhawa y cols., 2005). Además, MTB reside en compartimientos vesiculares citoplásmicos específicos; por lo cual, los antígenos específicos son presentados por los macrófagos en un contexto de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) a los linfocitos T CD4+ de clase 1 (Th-1), los cuales tienen una participación esencial en la

respuesta protectora en contra de MTB, por lo que cuando no están presentes no es posible controlar el crecimiento bacteriano (Muller y cols., 1987; Caruso y cols., 1999). Por lo tanto, los participantes esenciales en el control del crecimiento bacteriano son los macrófagos activados por la interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) producidos por las células Th-1. Las células Th-1 también contribuyen a la eliminación de las bacterias a través de la apoptosis de macrófagos infectados por la intermediación del receptor de FAS y su ligando (Oddo y cols., 1998). Además, los linfocitos Th-1 activan a los linfocitos CD-8 (Serbina y cols., 2001), que eliminan a las bacterias por su actividad citolítica y por la producción de citocinas, pues son capaces de secretar IFN- $\gamma$  a través de la activación de su receptor de antígenos y por interaccionar con las células dendríticas (Serbina y Flynn., 1999). Por su parte, los mecanismos citolíticos de las células CD-8 se asocian con la exocitosis de sus gránulos que contienen las proteínas líticas: perforinas y granzimas (Stenger y cols., 1997; Stenger y cols., 1998).

Por otro lado, debido a la localización intracelular del MTB, con frecuencia se ha considerado a la inmunidad humoral como no protectora. Sin embargo, sobre todo al inicio de la infección, anticuerpos solos o acompañados de citocinas pueden evitar la infección de la mucosa respiratoria (Teitelbaum y cols., 1998; Willians y cols., 2004; De Valliere y cols., 2005). Por lo tanto, parece ser que la inmunidad humoral también participa en la respuesta protectora en contra de MTB y puede ser utilizada como una forma nueva de inmunoterapia.

Las células epiteliales son otra población que interactúa tempranamente con MTB, ya que el número de células epiteliales triplica al de los macrófagos y por lo tanto la capacidad que estas células tienen de interaccionar con las bacterias es muy alta (Bermúdez y Goodman., 1996; Hernández-Pando y cols., 2000). Las células epiteliales son capaces de conformar un ambiente pro-inflamatorio al secretar la quimocina IL-8 e inducir producción de óxido nítrico (Wickremasinghe y cols., 1999).

Por otro lado, las defensinas, moléculas de la inmunidad innata que son producidas por células epiteliales (Diamond y Bevins., 1998), tienen actividad antibacteriana (Bals, 2000), anti-fúngica (Selsted y cols., 1985) y antiviral (Daher y cols., 1986).



Las defensinas representan el componente principal de destrucción de microorganismos, independientemente de los radicales de oxígeno que se producen en las células fagocíticas (Miyakawa y cols., 1993; Ogata y cols., 1992).

Sin embargo, durante el desarrollo de la TB existe una importante y prolongada supresión de la respuesta específica inmunoprotectora contra MTB, que permite la progresión de la enfermedad. Muchos de los factores que inducen esta regulación inmunológica a la baja son potentes moléculas anti-inflamatorias cuyo rol es evitar el daño tisular (Hernández-Pando y cols., 1998).

### **1.3.1 Interacción inmunoendocrina en la TB**

Es bien conocida la interacción bidireccional entre el sistema inmunológico y el neuroendocrino, la que se afecta significativamente en diversas enfermedades infecciosas conduciendo a alteraciones reproductivas y/o del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (EHHS), como sucede en mujeres y hombres con neurocisticercosis (Sacerdote y cols., 2012; Cárdenas y cols., 2012) o malaria (Davis y cols., 1997) y en hombres con TB (del Rey y cols., 2007), y también alteraciones en hormonas relacionadas con la reproducción en la toxoplasmosis y tripanosomiasis (Lim y cols., 2013).

### **1.3.2 Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su participación en la tuberculosis**

Durante los procesos de estrés crónico, como el que ocurre en la tuberculosis pulmonar, las neuronas del núcleo paraventricular son activadas en gran parte por las citocinas proinflamatorias IL-1, TNF e IL-6, para las cuales estas células tienen receptores (Rook y cols., 1996). Al activarse, las neuronas hipotalámicas secretan la hormona estimulante de corticotrofina, la cual es liberada y circula a través del sistema porta hipofisiario hasta llegar a la hipófisis anterior, en donde estimula a las células adrenocorticotrofas para que estas secreten a la hormona estimulante de la corteza suprarrenal (ACTH). Esta hormona viaja a través de la circulación sanguínea sistémica hasta alcanzar a las células fasciculares de la corteza suprarrenal estimulando la secreción de cortisol (Tresguerres, 2010; Hall., 2016).

El cortisol es una hormona anti-inflamatoria potente, con efecto supresor de la inmunidad celular, por lo tanto es una hormona inhibitoria eficiente de la respuesta Th-1 (Rook y Hernández-Pando, 1997). Además, el cortisol promueve la diferenciación de las células Th-2 (Rook y cols., 1997). En el modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva se ha demostrado que las citocinas macrofágicas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y el TNF se producen en gran cantidad en los pulmones infectados y que ejercen acciones locales fundamentales en la protección antibacteriana. Además, estas citocinas circulan sistémicamente, logrando la estimulación de la producción de proteínas de fase aguda y activando a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (Hernández-Pando y cols., 1995; Hernández-Pando y cols., 1998). Es tan intensa la estimulación que las glándulas suprarrenales duplican su peso aumentando enormemente el cortisol plasmático, con lo cual estimula vigorosamente a las células Th-2 (Hernández-Pando y cols., 1995). Por otro lado, otro glucocorticoide que se libera junto al cortisol es la corticosterona que puede convertirse en cortisol a través de la actividad de la enzima 11-b-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, contribuyendo así a generar una mayor concentración de cortisol en los pulmones enfermos (Rook y cols., 2000).

Una de las funciones principales de las glándulas suprarrenales es la síntesis de hormonas androgénicas esteroideas como la dehidroepiandrosterona (DHEA). La DHEA es una hormona que tiene efectos antagonistas al cortisol, ya que es un eficiente estimulador de los linfocitos Th-1 (Rook y Hernández-Pando., 1994; Rook y Hernández-Pando, 1994). Esta hormona se secreta como un precursor sulfatado, el cual se activa en el citoplasma de los macrófagos por la participación de la enzima sulfatasa (Rook y cols., 1994). En pacientes tuberculosos se ha encontrado una disminución acentuada en las concentraciones plasmáticas de la DHEA (Rook y cols., 1997; Rook y Hernández-Pando., 1997; Rook y cols., 2000) lo que favorece a la respuesta Th-2 que permite la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, otros trabajos muestran que la infección con MTB altera los metabolitos urinarios relacionados a esteroides de la corteza adrenal (Hernández-Pando y cols., 1995); sin embargo, no se ha estudiado la relación de estos cambios

con la salud reproductiva. Este punto es relevante dado que existe abundante información en la literatura sobre productos de las células inmunológicas como las citocinas, y de los corticosteroides, sobre el funcionamiento del ovario y testículo. Por la misma razón es importante correlacionar los cambios en citocinas que ocurren en la tuberculosis con los niveles plasmáticos de hormonas esteroides e investigar cómo afectan el funcionamiento del ovario y testículo.

#### **1.4 Relación entre el género y la frecuencia de la tuberculosis**

Se ha encontrado relación entre el género y la frecuencia de TB pulmonar. La frecuencia de hombres con TB es más del doble que en las mujeres (con una tasa hombre/mujer de  $1.9 \pm 0.06$  por las tasas de notificación mundial), sobre todo en los países subdesarrollados lo que se ha atribuido a factores biológicos, epidemiológicos, y también a aspectos socioeconómicos (Uplekar y cols., 1999; Borgdorff y cols., 2000). Es interesante anotar que estas diferencias ligadas al género no se observan en niños y adolescentes (Neyrolles y cols., 2009) lo que sugiere la participación de las hormonas esteroides sexuales, que como se ha reportado son moduladoras de la actividad de células inmunitarias, y tienen receptores para estas hormonas (Bouman y Heineman, 2005). Debemos considerar que existen muchos factores que determinan que tanto hombres y mujeres desarrollen la enfermedad pulmonar tales como: la virulencia de la cepa infectante, el estatus nutricional, higiene, edad, antecedentes étnicos y genéticos, estatus de inmunosupresión, así como el sexo del hospedero infectado (Neyrolles, 2009).

En modelos experimentales de TB se ha demostrado que los machos son más susceptibles que las hembras a la TB pulmonar producida por la infección con la cepa H37Rv. Las hembras intactas y los machos castrados mostraron mayor inflamación en todos los compartimientos pulmonares, formación más temprana de granulomas y neumonía comparados con los machos intactos, y también diferencias significativas en la respuesta inmunológica evaluada por la producción de citocinas (Bini y cols., 2014).

#### **1.4.1 Efectos de la tuberculosis sobre aspectos reproductivos en el hombre**

En el caso de hombres que cursan TB pulmonar se ha demostrado que disminuyen las concentraciones séricas de testosterona y de dehidroepiandrosterona (DHEA), hormonas que tienen además de efectos endocrinos un papel importante en la inmunidad, conjuntamente con elevación de las citocinas IFN-gamma, IL-10 e IL-6. Los autores sugieren que las complejas interacciones inmunoendocrinas que se presentan en estos pacientes podrían ser nocivas para el curso de la enfermedad (del Rey y cols., 2007).

#### **1.4.2 Efecto de la tuberculosis sobre aspectos reproductivos en la mujer**

Las alteraciones relacionadas a la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis referidas más arriba pueden ocasionar alteraciones en el ciclo menstrual, sangrados intermenstruales, ovario poliquístico, así como problemas en la gestación con el consecuente aumento del estrés; sin embargo, este aspecto se ha estudiado muy poco. Al respecto se ha reportado que mujeres con TB pulmonar presentaron en la historia clínica alteraciones en el ciclo menstrual, amenorrea e hipomenorrea (Fallhian y Ilkhani, 2006; Hassan y Darwish, 2009). No se encontraron estudios que investiguen las causas de estas alteraciones ni que intenten explicar el mecanismo por el que se producen; además no se han estudiado a las hormonas que se encuentran involucradas ni la relación inmunoendocrina que podría estar detrás de los cambios del ciclo menstrual o de alteraciones de la fertilidad antes referidos. Asimismo, las interacciones inmunoendocrinas patológicas podrían afectar el desarrollo de la respuesta inmune y el control de la inflamación que desencadena la presencia de MTB en el tejido pulmonar.

Al respecto, se conoce que varias citocinas pueden alterar la producción de hormonas esteroides por el ovario, como por ejemplo IL-1 y IL-6, que estimulan la síntesis de estrógenos actuando sobre la aromatasa y el TGF- $\beta$  entre otras. Por todo esto es necesario investigar en profundidad las alteraciones inmunoendocrinas

que ocurren durante la infección pulmonar con MTB para poder corregirlas adecuadamente.

### **1.5 Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva**

El modelo experimental de tuberculosis progresiva se caracteriza por usar animales genéticamente idénticos (cepa singénica Balb/c) los cuales se infectan por la vía natural (inyección intratraqueal con bacterias vivas y virulentas; cepa prototipo H37Rv). La dosis empleada de bacterias para infectar a los ratones es elevada ( $2.5 \times 10^5$ ) puesto que estos animales no son huéspedes naturales de las micobacterias (Hernández-Pando y cols., 1995).

La inyección intratraqueal permite un mejor control de la dosis y garantiza que la mayoría, sino es que todas las bacterias se depositen en el pulmón. Estas son ventajas sobre el uso de nebulizadores como instrumento de infección, pues con estos instrumentos se puede permitir la deglución de las bacterias y en consecuencia la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa digestiva, lo que modifica significativamente la respuesta inmunológica sistémica.

Este modelo experimental corresponde a un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, el cual se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad (Hernández-Pando y cols., 1996). La primera fase es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, y por la formación de granulomas en la segunda semana de infección (Hernández-Pando y cols., 1996).

Los granulomas son las estructuras histopatológicamente distintivas de la tuberculosis y corresponden a un tipo de inflamación crónica producida por la presencia de material poco o nada biodegradable (Hernández-Pando y cols., 2000). Los granulomas están constituidos por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos organizados en estructuras redondas de límites precisos y se les considera como las estructuras fundamentales para contener a las bacterias. Durante la fase

temprana de la infección en este modelo experimental, específicamente en la segunda semana postinfección, los granulomas empiezan a formarse y una semana después alcanzan su máxima madurez (Hernández-Pando y cols., 1996). Estos granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio intersticial y perivenular coexistente están constituidos principalmente por linfocitos T CD-4 de tipo 1 productores de las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF e IL-1 (Hernández-Pando y cols., 1996; Hernández-Pando y cols., 1997).

Desde hace mucho tiempo se ha demostrado que la protección en TB depende de la inmunidad celular constituida por linfocitos T y macrófagos (Rook y Hernández-Pando, 1996). Debido a que los granulomas producidos en la segunda y tercera semana post-infección están constituidos predominantemente por células Th-1 se presenta una elevada producción de IFN que activa a los macrófagos, estimulándolos a sintetizar gran cantidad de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Hernández-Pando y cols., 2001).

La iNOS genera la producción de óxido nítrico (ON), el cual reacciona con radicales libres de oxígeno que también son producidos en gran cantidad, al mismo tiempo generan la producción de peroxinitrilos, compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, como las proteínas que son blancos principales de los mismos (en particular el aminoácido tirosina). Las proteínas nitrosiladas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuye a activar a los macrófagos y además estimula la producción de IL-2 y sus receptores (Hernández-Pando y cols., 1997). La IL-2 que al igual que el IFN es producida por linfocitos Th-1, induce la proliferación celular linfocitaria incrementando así el número de células inmunocompetentes que contribuyen a mantener bajo control a la TB, pues fagocitan y destruyen a las bacterias, además de que también regulan al sistema inmunológico a través de la secreción de diversas citocinas (Rook y Hernández-Pando, 1996; Hernández-Pando y cols., 2001). Por lo tanto, durante la fase temprana de la infección existe predominio de la actividad de linfocitos Th1 y macrófagos activados lo cual permite el control temporal de la infección.

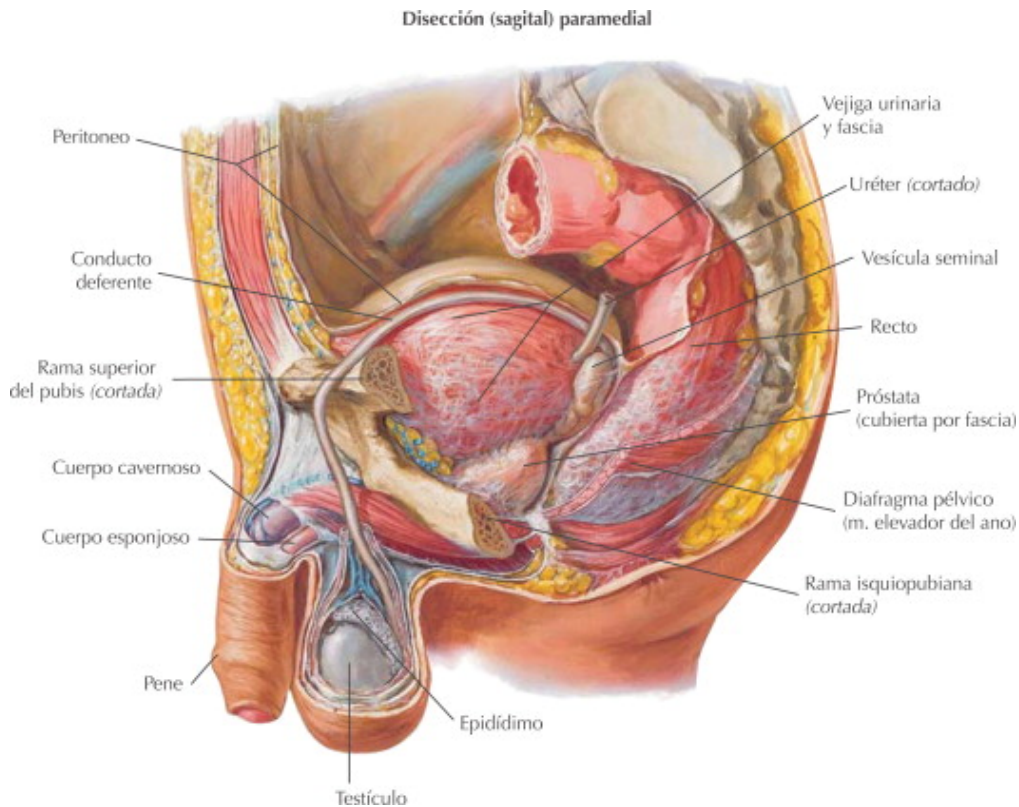
La segunda etapa de la enfermedad en este modelo experimental corresponde a la fase avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por el gran incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conduce a la muerte (Hernández-Pando y cols., 1995; Hernández-Pando y cols., 1996; Hernández-Pando y cols., 2001). Desde el punto de vista inmunológico, durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2) (Hernández-Pando y cols., 1996), los cuales se caracterizan por producir las IL-4, 5, 6, 10, y 13. En particular, IL-4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, que se consideran como no protectores en la tuberculosis. Además la IL-4 al igual que la IL-10 y la IL-13 son eficientes antagonistas de las células Th-1. En consecuencia, la emergencia de los linfocitos Th-2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th-1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad (Hernández-Pando y cols., 1996).

Por otro lado, los macrófagos experimentan modificaciones morfo-funcionales muy importantes, ya que el citoplasma de estas células se llena de bacterias y de numerosas vacuolas que contienen lípidos bacterianos, en particular lipoarabinomano (Hernández-Pando y cols., 1997), un lípido de la pared bacteriana que es muy eficiente para desactivar a los macrófagos. Además, estos macrófagos vacuolados disminuyen significativamente la producción de TNF, IL-1 e iNOS, e incrementan notablemente su capacidad productora de potentes citocinas anti-inflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el factor de transformación tumoral (TGF) y la IL-10 (Hernández-Pando y cols., 1997; Hernández-Pando y cols., 2001). El TGF es también una eficiente citocina inductora de la proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena, contribuyendo así a generar fibrosis. Por lo que en la fase progresiva de la enfermedad existen importantes anomalías inmunológicas que permiten la supervivencia y la proliferación bacteriana, tales como mayor actividad de los linfocitos Th-2 (con menos actividad de los Th-1) y

macrófagos desactivados que secretan citocinas supresoras de la inmunidad celular como el TGF; estas alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria.

### 1.6 Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino de los mamíferos está constituido por un pene, dos testículos, ductos (2 conductos eferentes, 2 epidídimos y 2 conductos deferentes) y las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo uretrales) (Figura 1) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).



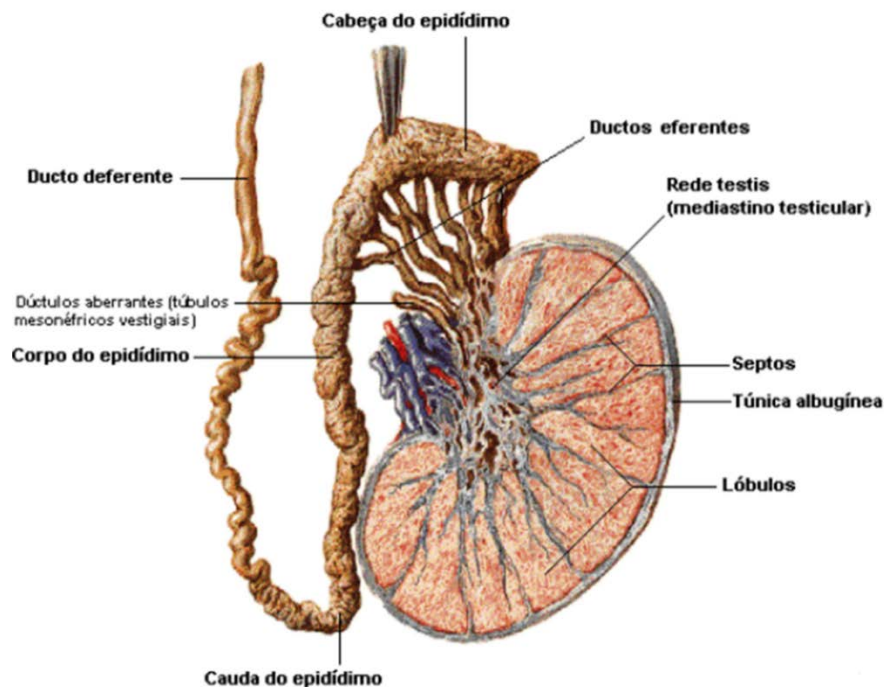
**Figura 1.** Aparato Reproductor Masculino. Imagen tomada de Netter, Frank H. "Atlas de anatomía humana", Elsevier Masson, 4ª edición. 2007



### 1.6.1 Fisiología del testículo en el humano

Los testículos son órganos ovoides con un diámetro de alrededor de 5 cm, que pesan cerca de 15 g y se encuentran fuera de la cavidad abdominal envueltos individualmente en un saco externo llamado escroto, conformado de piel, tejido conectivo y músculos conocidos como dartos y cremáster (músculo de la pared abdominal que se inserta en el dartos). Los testículos presentan una temperatura de aproximadamente 36 °C, por lo que si existe algún cambio de temperatura en el ambiente, la regulación de la temperatura en el órgano se lleva a cabo con la ayuda de dichos músculos; cuando hace frío los testículos se suben hacia la pared abdominal para que estos órganos alcancen la temperatura corporal.

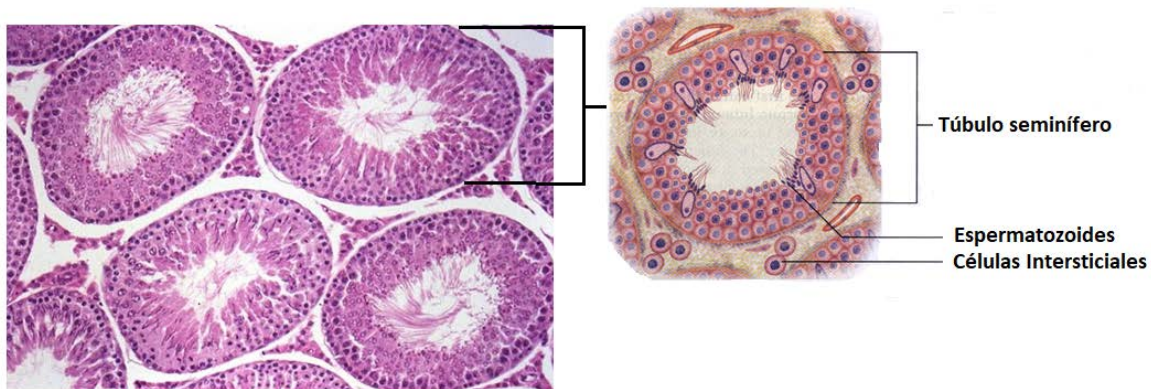
En su interior, cada testículo se encuentra rodeado por una cápsula o cubierta fibrosa, la túnica albugínea, desde cuya superficie interna se extiende tejido conectivo hacia una región denominada mediastino. La túnica albugínea envuelve al parénquima testicular, el cual está compuesto de túbulos seminíferos separados por tejido intersticial (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).



**Figura 2.** Testículo. Imagen tomada de Netter, Frank H. “Atlas de anatomía humana”, Elsevier Masson, 4ª edición. 2007

### 1.6.1.1 Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos son tubos largos con un diámetro aproximado de 200  $\mu\text{m}$ . y en su interior se encuentra el epitelio seminífero (llamado también epitelio germinal) (Figura 3). El epitelio seminífero descansa sobre la membrana basal y está compuesto de células de Sertoli y células germinales. Las células de Sertoli brindan soporte físico a las células germinales y forman la barrera hemato-testicular a través de uniones estrechas. Mientras que las células germinales se desarrollan hasta espermatozoides mediante el proceso de espermatogénesis, los cuales son liberados hacia el lumen tubular y dirigidos hacia el epidídimo. Las células del epitelio germinal proliferan de manera constante a lo largo de la vida del hombre adulto, ya que se requiere un continuo aporte de células germinales precursoras (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

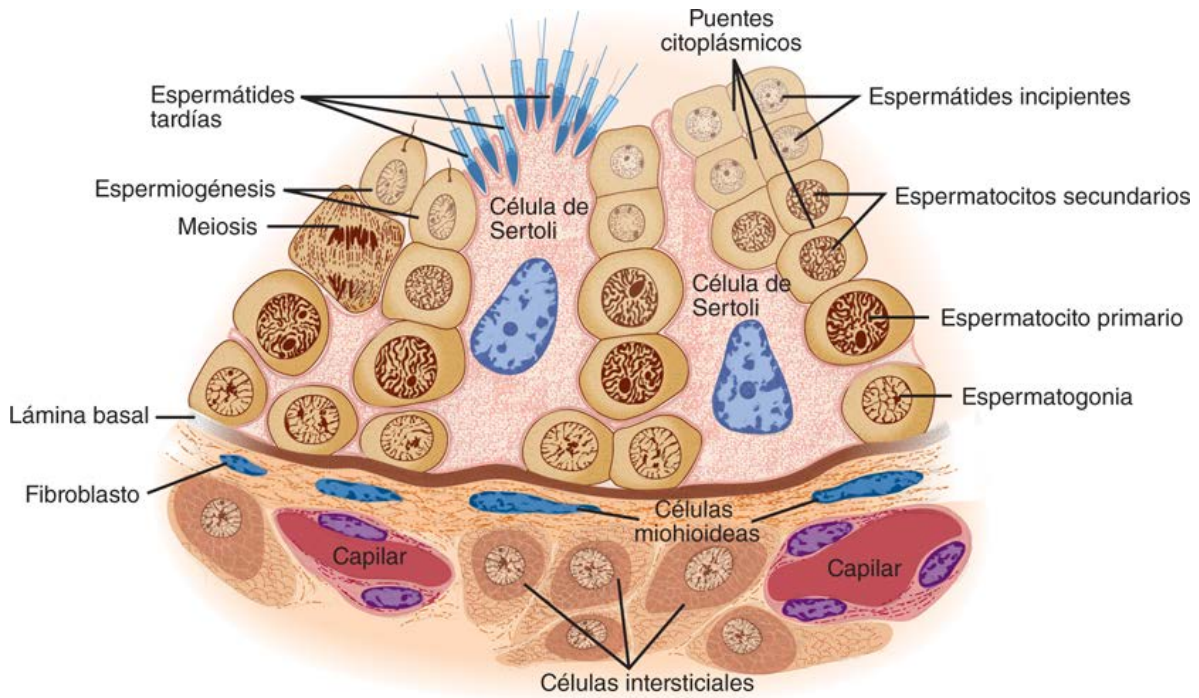


**Figura 3.** Estructura de los túbulos seminíferos. Imagen tomada de Netter, Frank H. “Atlas de anatomía humana”, Elsevier Masson, 4ª edición. 2007

#### 1.6.1.1.1 Células germinales

Se conocen como células germinales a los estadios previos al espermatozoide: las espermatogonias, los espermatocitos primarios y secundarios y las espermátides. Constituyen la mayor parte del túbulo seminífero y se distribuyen en forma ordenada desde la membrana basal al lumen tubular, diferenciadas de menos a más. Las que descansan sobre la membrana son las espermatogonias, de las que pueden distinguirse tres tipos según sus propiedades tintoriales: A oscuras, B claras y C,

que se encuentran en distinto estadio de madurez. Las espermatogonias son de tamaño pequeño, redondeadas y aparentemente tienen una profase más larga que otras células (Tresguerres., 2010; Hall., 2016) (Figura 4).



**Figura 4.** Organización de las células germinales en el tubo seminífero. Imagen tomada de Ganong. Fisiología Médica. McGraw-Hill. 2007

#### 1.6.1.1.2 Células de Sertoli

Las células de Sertoli son células altas, extendidas en forma radial desde la membrana basal en dirección a la luz tubular y desempeñan tres funciones principales: la formación de la barrera hemato-testicular, fagocitosis y secreción del fluido tubular.

Las células de Sertoli están conectadas a las células germinales (es decir, éstas células se encuentran embebidas entre las células de Sertoli) y entre sí por una serie de uniones estrechas, para formar la barrera hemato-testicular y proteger a las

células germinales de cualquier daño o del paso de sustancias. Esta barrera presenta permeabilidad altamente selectiva basada en los sistemas de transporte de estas células. Las células de Sertoli también tienen la función de fagocitosis. Durante la espermiogénesis, el volumen citoplasmático de las espermatídes es eliminado como cuerpo residual y es fagocitado por las células de Sertoli.

Las células de Sertoli presentan receptores para la hormona folículo estimulante (FSH), que estimula la espermatogénesis, y sintetizan inhibina y activina, sustancias que intervienen en la regulación negativa y positiva en el eje hipotálamo-pituitaria-gónada. Además, las células de Sertoli producen proteína ligadora de andrógenos (ABP), sustancia capaz de unir testosterona y dihidrotestosterona (DHT) con gran afinidad. La ABP actúa como transportadora a través de la barrera hemato-testicular e introduce en el túbulo seminífero grandes cantidades de testosterona que es convertida a estradiol en las células de Sertoli por acción de la enzima aromatasa. El estradiol estimula la producción de espermatozoides. Las células de Sertoli también producen otra serie de sustancias cuya finalidad es diversa y que incluyen factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la somatomedina C (IGF-I), péptido de 70 aminoácidos estimulante del crecimiento que actúa de forma sinérgica con la FSH. También producen el factor de crecimiento seminífero (SGF), proteína que estimula la proliferación de las propias células de Sertoli de forma autocrina.

Existen interacciones entre las células germinales (espermatogonia, espermatocono primario y espermatocono secundario) y las células de Sertoli donde estas últimas, además de brindarles soporte mecánico, producen sustancias que son sustratos que utilizan las células germinales para su supervivencia. Por ejemplo, las células de Sertoli sintetizan lactato, el cual es convertido a ATP por las células germinales mediante la acción de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH-C4), y sorbitol (un polyol) que es utilizado por las células germinales para producir fructuosa y utilizarla como fuente de energía (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

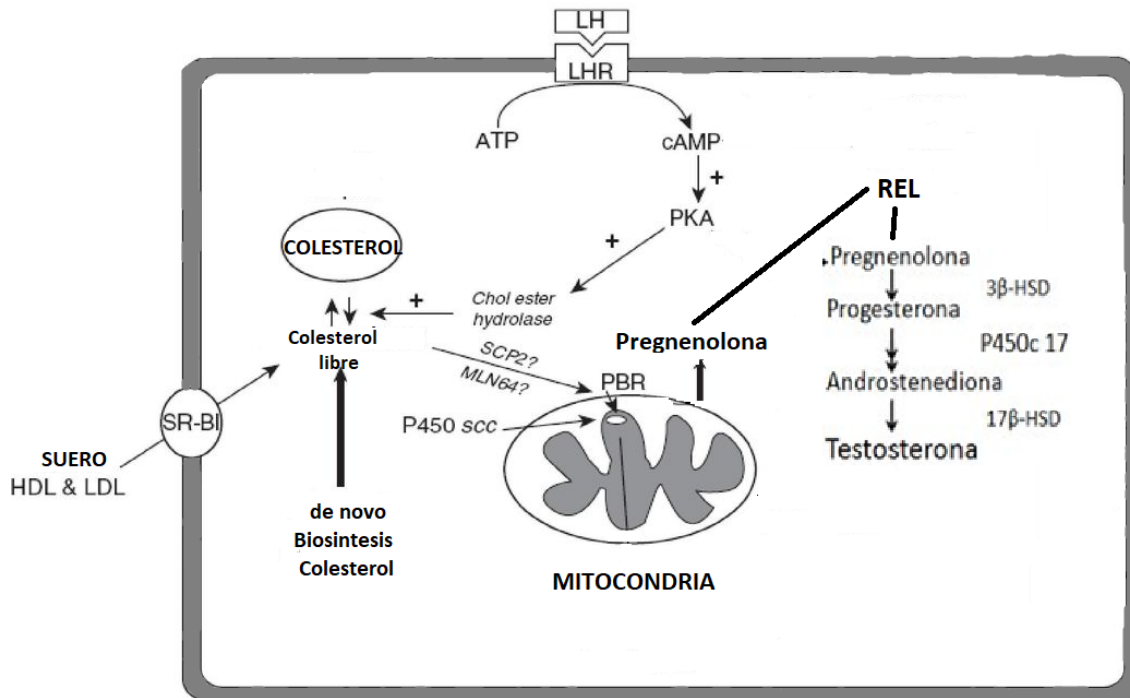
### **1.6.1.2 Tejido intersticial**

El tejido intersticial está compuesto de células de Leydig (células secretoras de testosterona), así como de macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos y canales linfáticos (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### **1.6.1.2.1 Células de Leydig**

Las células de Leydig o células intersticiales constituyen el órgano endocrino del testículo. Estas células forman racimos que están asociados con los vasos sanguíneos y linfáticos. Derivan de los fibroblastos y como tales las células de Leydig no se dividen. Tienen forma poligonal con un núcleo grande y ovalado, abundancia de retículo endoplásmico liso en forma de túbulos interconectados y mucho menos retículo endoplásmico rugoso. Constituyen el 1% de la población celular del testículo y son el principal sitio de síntesis de la hormona esteroidea masculina predominante, la testosterona.

Las células de Leydig poseen toda la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de testosterona. Inicialmente, el colesterol extracelular entra a la célula de Leydig y se traslada a la mitocondria, proceso facilitado por una proteína denominada Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) para formar pregnenolona. Posteriormente, fuera de la mitocondria se producen una serie de reacciones subsecuentes que son catalizadas por enzimas de la familia del citocromo p450 y otros tipos de enzimas hasta formar testosterona. Finalmente, la testosterona puede ser convertida a estradiol por acción del CYP19 (Figura 5) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).



**Figura 5.** Síntesis de testosterona en las células de Leydig

### 1.6.1.3 Funciones del Testículo

El testículo posee dos funciones diferentes pero a la vez íntimamente relacionadas con la reproducción: la primera el almacenamiento de las células germinales y la producción y desarrollo de espermatozoides (espermatogénesis); y segundo, es responsable de la síntesis y secreción de hormonas sexuales masculinas (andrógenos) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### 1.6.1.3.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el conjunto de transformaciones citológicas que sufren las espermatogonias para convertirse en espermatozoides. Las células del epitelio germinal proliferan de manera constante a lo largo de la vida del hombre adulto, ya que se requiere un continuo aporte de células germinales precursoras. La espermatogénesis en el hombre inicia en la pubertad y se mantiene durante toda la vida. El proceso completo dura  $74 \pm 5$  días. Este proceso consta de 3 fases en cualquier especie mamífera: 1) espermatocitogénesis, que comprende a una serie

de divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias para dar lugar a los espermatocitos, 2) meiosis, divisiones de los espermatocitos para formar a las espermatídes haploides, y 3) espermiogénesis, que consiste en la diferenciación morfológica de las espermatídes en espermatozoides.

La primera fase de la espermatogénesis consiste en la replicación de la célula germinal, es decir, la proliferación por mitosis de las espermatogonias para mantener el número de estas células y obtener espermatocitos primarios. Al principio de cada ciclo espermatogénico las espermatogonias localizadas en el epitelio seminífero del testículo sufren divisiones mitóticas para dar lugar a más espermatogonias tipo A (de reserva) y a las espermatogonias tipo B (destinadas a la diferenciación).

Las espermatogonias tipo B (células diploides con 22 pares de cromosomas y el par de cromosomas sexuales) mediante mitosis forman a los espermatocitos primarios (también diploides); inmediatamente después se lleva a cabo la segunda fase de la espermatogénesis, la meiosis.

En esta segunda etapa, los espermatocitos primarios deben sufrir cambios nucleares característicos para obtener células haploides a partir de células diploides. Esto se logra cuando los espermatocitos primarios sufren la primera división meiótica para dar lugar a la formación de los espermatocitos secundarios (células con la mitad de los cromosomas y un cromosoma sexual), los cuales sufren una segunda división meiótica que da como resultado a las espermatídes haploides.

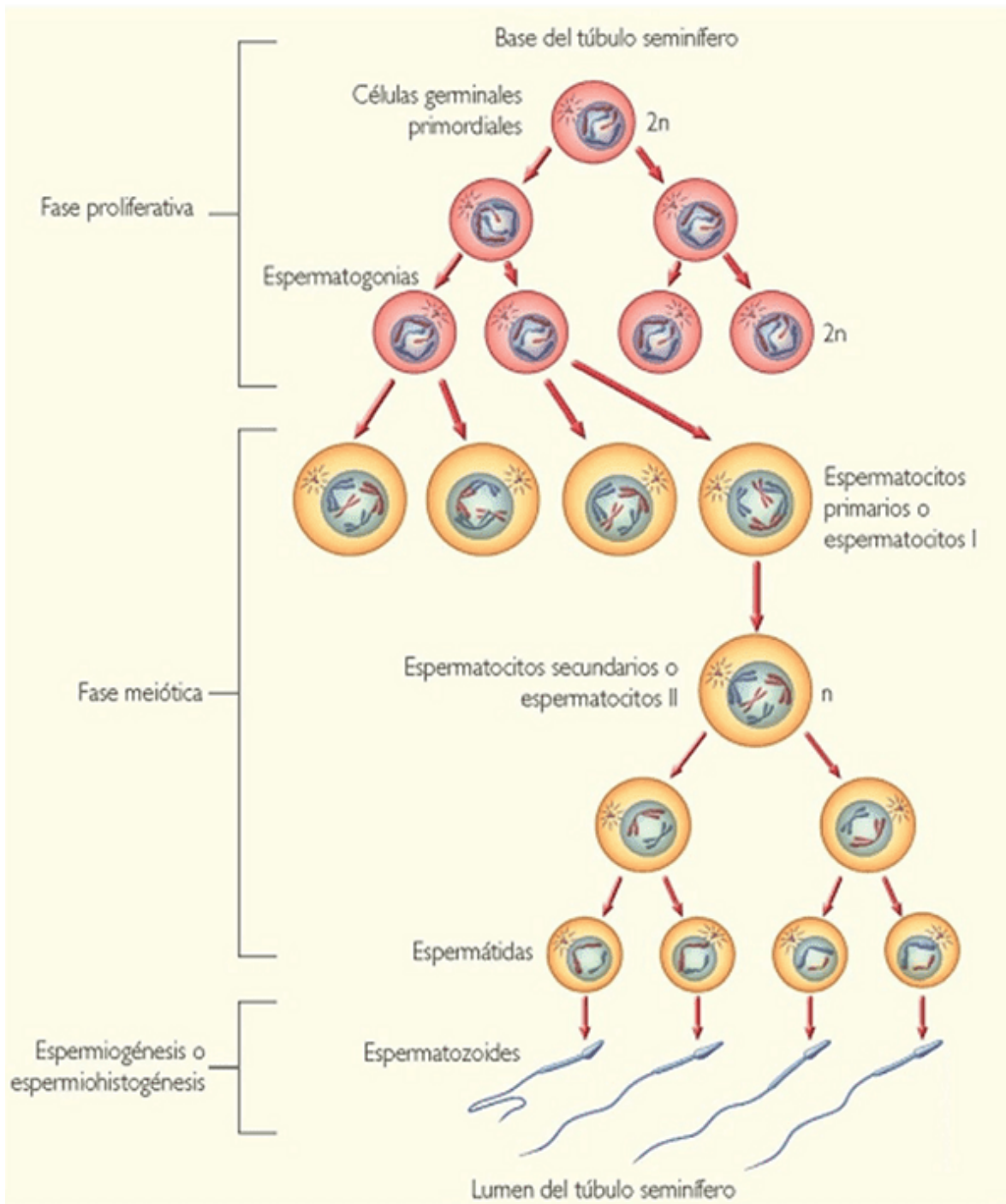
Durante la tercera etapa ya no se producen más divisiones celulares, sólo cambios morfológicos. En la espermiogénesis comienza un remodelamiento gradual del núcleo y de los componentes celulares de la espermatíde, esto es, la espermatíde se alarga para desarrollar la cola, la mitocondria migra hasta quedar en la región media del espermatozoide, el aparato de Golgi deriva gránulos secretorios que finalmente dan lugar a la formación de un organelo especializado, el acrosoma.

Asimismo, durante la espermiogénesis la cromatina se condensa a una forma mucho más compacta cuando las histonas que empaquetan el ADN son

reemplazadas por las protaminas, proteínas pequeñas, altamente básicas, ricas en arginina y cisteína. En el humano hay dos familias de protaminas, P1 (rica en tirosina) y P2 (rica en arginina), que empaquetan y protegen al ADN del espermatozoide. La P2 es una proteína dependiente de zinc y se ha propuesto que tiene un papel importante en la fertilidad. En la mayoría de las especies mamíferas el ADN es empaquetado solamente por la protamina P1; mientras que en el hombre, en el hámster y en el ratón, el ADN además de ser empaquetado por la P1, también es empaquetado por la otra familia de protaminas, la P2.

Finalmente, las espermátides pierden el citoplasma, a través de la cola, como una gota citoplasmática o cuerpo residual. Todos estos cambios hacen que la célula redonda se convierta en la forma madura que se conoce como espermatozoide, que es liberado hacia el lumen del túbulo seminífero. Sin embargo, estas células aún no son maduras desde el punto de vista funcional, por lo que deben completar su maduración durante su paso a través del epidídimo (Figura 6) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).





**Figura 6.** Espermatogénesis. Imagen tomada del libro *Biología del Desarrollo*. McGraw-Hill. 2008

### 1.6.1.3.2 Función endocrina del testículo

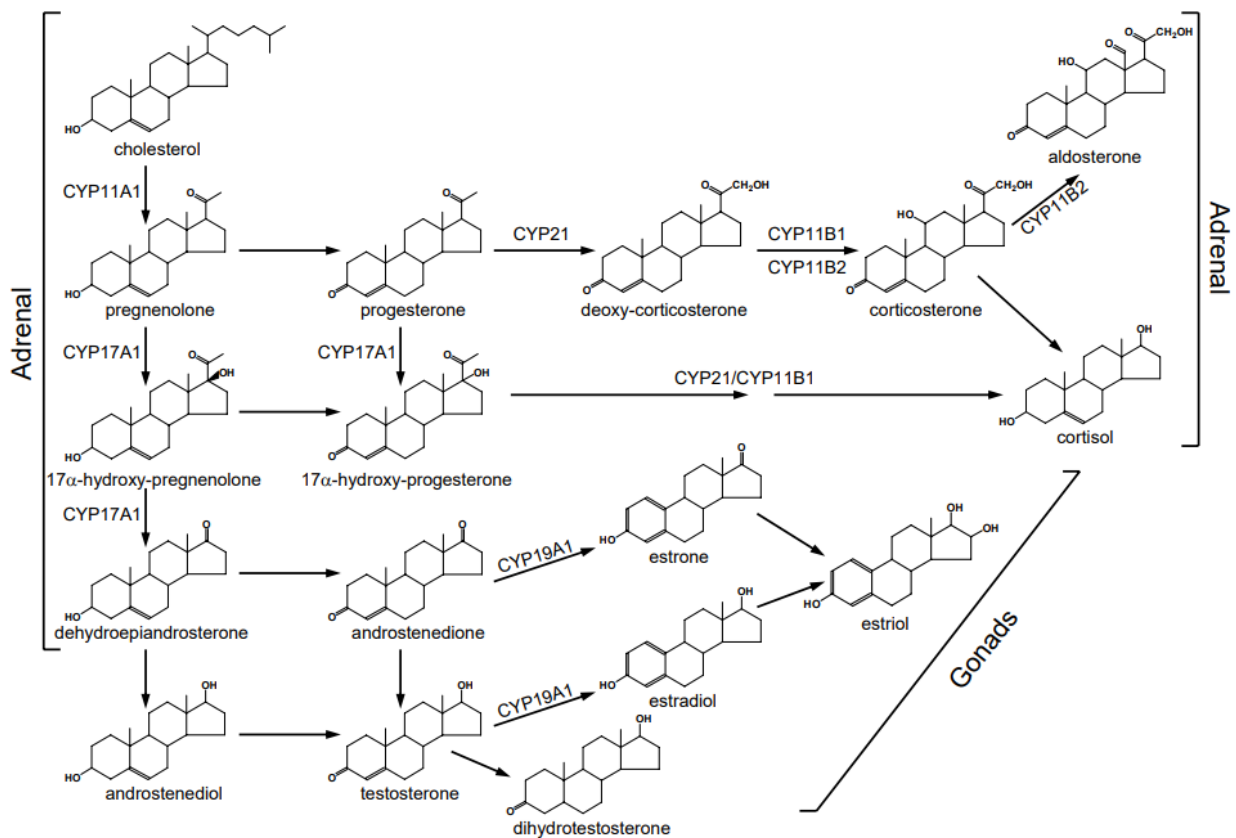
Las células de Leydig sintetizan y secretan varias hormonas esteroideas que se conocen como andrógenos, que son las hormonas que estimulan el crecimiento del tracto reproductor masculino. Sin embargo, en estas células también se sintetizan pequeñas cantidades de estrógenos.

Entre los andrógenos producidos por el testículo los más importantes son la testosterona, la dihidrotestosterona y la androstenediona. La cantidad de testosterona sintetizada es tan grande en relación con las otras dos hormonas, que puede considerársele como el principal andrógeno testicular, representando el 95% de la testosterona presente en el plasma de hombres normales.

El comienzo de la esteroidogénesis se da en las células de Leydig y se induce por la unión de la hormona luteinizante (LH) a su receptor. Las células de Leydig poseen receptores de membrana específicos para LH lo cual permite que ésta ejerza su acción reguladora sobre la producción de testosterona. La unión de la LH a la porción extracelular de su receptor en las células de Leydig genera la activación de una proteína G que, a su vez activa la transcripción del gen de las proteínas StAR. Las proteínas StAR son una familia de fosfoproteínas mitocondriales inducidas por las hormonas tróficas que estimulan la aparición de lugares de contacto entre las membranas mitocondriales, generando un puente lipídico que permite el paso del colesterol entre las membranas externa e interna.

Las células de Leydig, aunque pueden sintetizar colesterol a partir de acetil-CoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma, a partir de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL se introducen dentro de la célula por endocitosis mediada por receptor; los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre para ser utilizado en la síntesis de esteroides sexuales. La transformación del colesterol en pregnenolona, es el paso limitante de esta ruta de biosíntesis, se realiza en la mitocondria, por lo que el colesterol debe ser transportado e internalizado en la mitocondria con ayuda de la proteína StAR. En el transporte desde la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna, donde se realiza el paso de

colesterol a pregnenolona, intervienen los fosfolípidos de membrana y un péptido activador de la esteroidogénesis. La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta  $\Delta 5$ , y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o  $\Delta 4$ ; los esteroides intermedios de la ruta  $\Delta 5$  pueden convertirse en  $\Delta 4$  correspondiente. La importancia relativa de estas dos rutas varía según la especie; en el testículo humano la más importante es la  $\Delta 5$ , mientras que en los roedores es la  $\Delta 4$ . La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos. Por acción de la  $5\alpha$ -reductasa se transforma primero a dihidrotestosterona (DTH) y a continuación en  $3\beta$ -diol, y por la acción de la aromatasa, la testosterona se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona (Figura 7).



**Figura 7.** Esteroidogénesis en humanos (Monostory y Dvonak, 2011)

Por otro lado, la acción de la LH consiste, además de activar las proteínas StAR, en estimular la enzima desramificante que elimina la cadena lateral del colesterol para que se transforme en pregnenolona, aunque también estimula la C<sub>17-20</sub> liasa y la 17- $\alpha$  hidroxilasa. Estas acciones están mediadas por el AMP cíclico que no sólo activa la biosíntesis de testosterona sino también la síntesis de proteínas celulares y participa en la renovación de las propias células de Leydig. Existen otros factores distintos de la LH que modulan la capacidad de respuesta de la célula de Leydig.

La testosterona en el hombre normal se transporta 60% unida a la SHBG (globulina transportadora de hormonas sexuales), 20-40% a la albúmina y 1-3% permanece en estado libre. Sola esta fracción libre es capaz de intercambiarse en los compartimientos extravascular e intracelular y, por ende ser activa desde el punto de vista biológico. Tanto ésta como la unida a la albúmina son susceptibles de ser metabolizadas en el hígado. La SHBG es una proteína de transporte muy específica para testosterona, dihidrotestosterona y 17- $\beta$ -estradiol; además, actúa como depósito circulante de hormona, regula la concentración de hormona libre y el balance de andrógenos/estrógenos y, por último, parece intervenir en la entrada del esteroide en la célula diana. La concentración en plasma de SHBG es influenciada por las concentraciones de otras hormonas; así, los estrógenos y las hormonas tiroideas la aumentan, mientras que la prolactina, la GH, los glucocorticoides y los andrógenos la disminuyen. El catabolismo de la testosterona que no entra en las células diana se realiza fundamentalmente en el hígado, y tras un proceso de oxidación, reducción y conjugación con sulfato y glucuronato se elimina por la orina (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

### **1.6.2 Ductos**

Cuando los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero hacia el lumen tubular, son rápidamente transportados a un ducto colectivo común llamado rete testis. El espermatozoide pasa luego a través de los ductos eferentes hacia el epidídimo, formado por una red de conductos altamente contorneados (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

### 1.6.2.1 Epidídimo

Puede dividirse en tres partes: la cabeza (caput), el cuerpo (corpus) y la cola (cauda). Cuando el espermatozoide permanece en el epidídimo, se llevan a cabo cambios metabólicos y estructurales que ocurren principalmente en la cola de éste conducto y es un proceso andrógeno dependiente. Además se produce allí otro proceso, la estabilización de la cromatina por la formación progresiva de los puentes disulfuro entre las protaminas del espermatozoide.

El epidídimo absorbe más del 90% del fluido que viene de los testículos, concentrando a los espermatozoides. Se ha calculado que la relación espermatozoide/plasma epididimario es de 1:1 en la cabeza del epidídimo; en cambio en la cola del epidídimo la relación puede ser hasta de 70:1. En este proceso, el pH disminuye a lo largo del epidídimo (desde 7.4 a 6.6), lo que favorece la oxidación de los grupos tioles (formación de puentes disulfuro –s-s-). Así mismo, se produce un cambio en la composición iónica (disminuye el Na<sup>+</sup> y aumenta K<sup>+</sup>).

Las células epiteliales del epidídimo secretan y sintetizan muchas macromoléculas incluyendo glicoproteínas, reabsorben un volumen considerable de fluido tubular y están involucradas en el transporte activo de iones. La mayor parte de la reabsorción de fluido se lleva a cabo en la cabeza y el cuerpo del epidídimo. En la cola se almacenan los espermatozoides (además del almacenamiento que se da en el conducto deferente) por lo que se forma una estructura gruesa distintiva por la dilatación producida por almacenamiento. Finalmente, el ducto epididimal lleva a los espermatozoides hacia una porción recta llamada conducto deferente (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### 1.6.2.1.1 Maduración del espermatozoide en el epidídimo

Cuando los espermatozoides llegan al epidídimo todavía están “inmaduros” ya que sólo tienen una movilidad vibratoria y no tienen capacidad fertilizante. Sin embargo, a lo largo del paso de los espermatozoides a través del epidídimo, adquieren la motilidad de la cola o flagelo y la capacidad fertilizante, proceso conocido como maduración epididimal. La capacidad fertilizante la adquieren gracias a la

estabilidad de la cromatina, por la formación de puentes disulfuro en el núcleo. Además, muchas de las moléculas del acrosoma y de la membrana plasmática son modificadas para que el espermatozoide adquiera la capacidad fertilizante cuando llega a la región distal epididimaria (cola del epidídimo) y al conducto deferente. Sin embargo, para que pueda fertilizar, el espermatozoide aún debe ser capacitado (proceso que se discutirá posteriormente). Respecto a la motilidad, conforme el espermatozoide alcanza la cola del epidídimo, adquiere la capacidad de moverse en una dirección progresiva, también gracias a la formación de puentes disulfuro de las proteínas de la parte media del espermatozoide. Por lo tanto, la motilidad puede verse afectada cuando hay alguna anomalía en el epidídimo, sin descartarse que también puede afectarse durante la eyaculación (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

### **1.6.3 Glándulas Sexuales Accesorias**

Las especies mamíferas poseen glándulas sexuales accesorias que secretan su contenido en el tracto reproductivo masculino, sin embargo, la cantidad de glándulas, la estructura y la anatomía de las mismas varía de especie a especie. Por esta razón, los componentes de la secreción de las glándulas entre especies también varían. En general, las glándulas sexuales accesorias principalmente incluyen a: las vesículas seminales, la próstata, las glándulas coagulantes, las glándulas bulbouretrales y las glándulas prepuciales (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### **1.6.3.1 Vesículas Seminales**

Son órganos alargados y pareados, llenos de fluido viscoso. Estas vesículas están situadas lejos de la ampulla del conducto deferente y vacían su contenido en la uretra durante la eyaculación. El fluido seminal es una secreción viscosa que constituye del 50 a 80% del volumen del eyaculado. El fluido seminal es ligeramente alcalino (8.0), por lo que neutraliza el pH ácido de la vagina.

La composición del líquido vesicular es principalmente de proteínas y de azúcares como la fructosa y la glucosa, que sirven como fuente de energía para el espermatozoide. De hecho, la fructosa se utiliza como un biomarcador de

secreción vesicular; es decir, como indicador de daño de las vesículas seminales. Entre los componentes proteicos más importantes que se han descrito están las proteínas de alto peso molecular (PAPM) con un peso molecular aproximado de 250 kDa, las cuales tienen un papel importante en el equilibrio del zinc (Zn) en el eyaculado, además de otras proteínas de menor tamaño (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

### **1.6.3.2 Próstata**

La próstata está formada por múltiples lóbulos que se encuentran alrededor de la uretra. En el hombre, la próstata contribuye con menor volumen al eyaculado (aproximadamente con un 15 a 30% del volumen) en comparación con las vesículas seminales. El líquido prostático es rico en Zn, fosfatasa ácida y ácido cítrico, entre otros componentes, por lo que estos tres componentes se utilizan como biomarcadores de la secreción prostática. Aunque la contribución para el volumen del eyaculado por parte de la próstata es poca, la aportación del Zn es en cantidades mili molares (de 2 a 5 mM) y se ha descrito que este ion tiene la función de conservar la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

### **1.6.3.3 Glándulas Prepucales**

Difieren de otras glándulas en que no secretan ningún fluido

### **1.6.3.4 Glándulas Bulbouretrales**

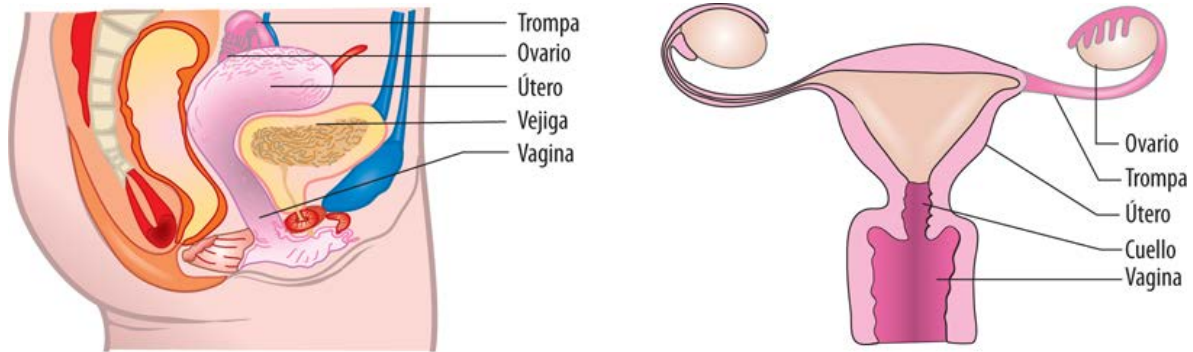
Glándulas de Cowper y Mery, son glándulas tubo-alveolares pareadas que secretan un material mucoide en la uretra penil. Secretan una cantidad pequeña de un fluido viscoso que en el hombre es liberado antes de la eyaculación y puede funcionar como lubricante.

### **1.6.3.5 Glándulas Coagulantes**

Se encuentran únicamente en los roedores y secretan proteínas que se unen a la membrana plasmática del espermatozoide. Estas proteínas no están bien estudiadas pero que se les ha atribuido un papel importante en la fertilización.

## 1.7 Aparato Reproductor Femenino

El aparato reproductor femenino se compone de dos ovarios, dos tubas o trompas de Falopio, el útero, la vagina y la vulva (Figura 8) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).



**Figura 8.** Aparato Reproductor Femenino. Imagen tomada de Netter, Frank H. “Atlas de anatomía humana”, Elsevier Masson, 5ª edición. 2009

### 1.7.1 Ovario

Los ovarios humanos son dos cuerpos ovalados que están alojados en la pelvis, fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario. Su aporte nervioso, vascular y linfático ocurre precisamente a través del mesovario (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

En el ovario se pueden distinguir tres zonas bien diferenciadas. La zona más grande es la corteza, que contiene los folículos en diferentes estadios de maduración con los ovocitos. Entre los folículos se encuentran el tejido conectivo de sostén y las células intersticiales (estroma). Las otras dos zonas del ovario son la médula, que contiene una rica red vascular y tejido conectivo, y el hilio, donde se encuentran la arteria y la vena ovárica, los vasos linfáticos, las terminales nerviosas y las células intersticiales. El ovario está recubierto por una sola capa de células epiteliales (epitelio germinal).

El ovario adulto está constituido por tres unidades funcionales diferentes: el tejido intersticial, los folículos y el cuerpo lúteo. Estas estructuras están en constante transformación. Así, mientras algunas de ellas regresan (los folículos atrésicos



pasan a formar parte del estroma), otras pueden formarse (el folículo tras la ovulación se transforma en cuerpo lúteo) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### **1.7.1.1 Funciones del ovario**

El ovario es el órgano reproductor femenino que tiene dos funciones importantes, la primera es que es el responsable del desarrollo folicular, diferenciación del folículo y de la liberación del ovocito para su posterior fertilización. Segundo, es responsable de la síntesis y secreción de las hormonas esteroideas sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos) que son esenciales para mantener el desarrollo de los folículos, así como el ciclo menstrual y estral (Seeley y cols., 1995).

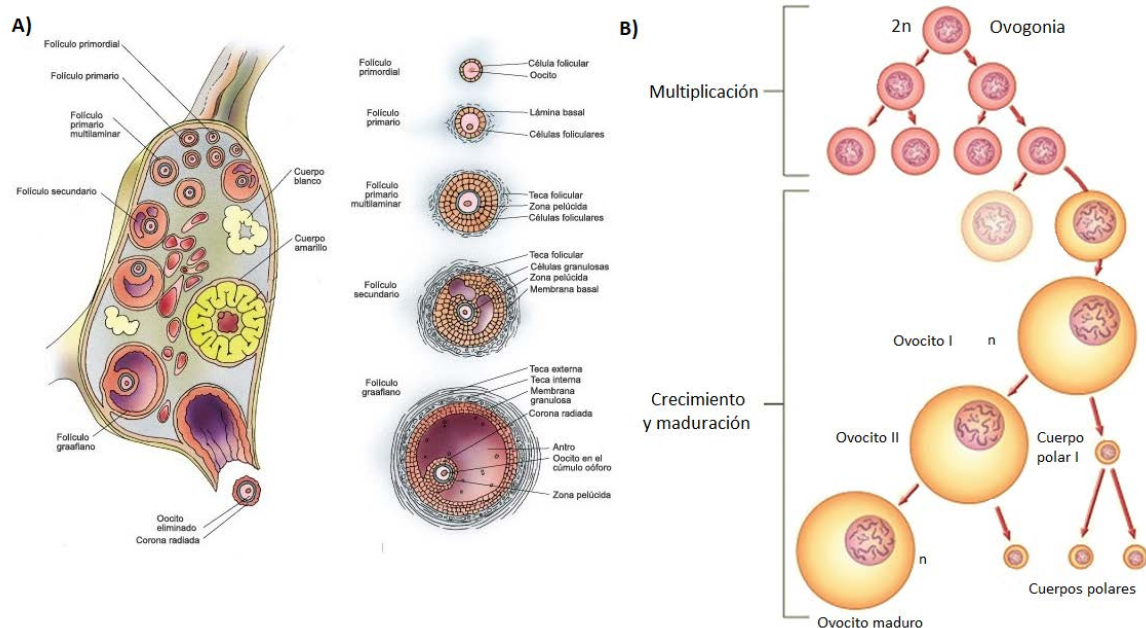
##### **1.7.1.1.1 Folliculogénesis y ovogénesis**

En la vida adulta, el ovario posee folículos (unidad funcional del ovario que contiene al ovocito que será liberado durante la ovulación) en distintos estadios de desarrollo: el folículo primordial (folículo más inmaduro), folículo primario, folículo preantral y folículo antral (Figura 9A) (Eppig y cols., 2004).

El folículo primordial se forma durante la vida fetal y representa a la reserva de folículos que posee la mujer para asegurar su reproducción. Durante la formación del folículo primordial, el ovocito inicia división meiótica que se detiene en la última etapa de la primera fase de la meiosis (profase I) (Makabe y cols., 2006). Durante la vida reproductiva de las mujeres, los folículos primordiales permanecen detenidos en profase I de la meiosis durante meses o años, hasta que se activan para iniciar el crecimiento y diferenciación. Una vez que los folículos primordiales se activan, las células de la granulosa que rodean al ovocito proliferan y forman al folículo primario (Griffin y cols., 2006; Makabe y cols., 2006). Este folículo se desarrolla a folículo antral a través de cambios que incluyen, proliferación de las células de la granulosa para formar capas múltiples e incremento de tamaño. Además, las células del estroma ovárico comienzan a formar una capa de células fusiformes llamadas células de la teca que rodean al folículo antral y lo delimitan (Hirshfield y cols., 1991; Makabe y cols., 2003). El folículo antral tiene capacidad endócrina para hormonas

sexuales esteroideas, como la progesterona, andrógenos y estrógenos (Hirshfield y cols., 1991) (Figura 7).

El folículo antral se desarrolla a preovulatorio a través del incremento en la proliferación de las células de la granulosa, aumento de tamaño y aparición de receptores a la hormona luteinizante (LHR) en las células murales (células de la granulosa que se localizan cerca de las células de la teca). Durante la ovulación, la LH secretada por la pituitaria se une a los LHR en el folículo preovulatorio y desencadena la expansión de las células de la cúmula alrededor del ovocito. Esta expansión se logra por el incremento de los niveles de cAMP en las células de la cúmula y la síntesis de ácido hialurónico, proteínas de matriz extracelular y proteoglicanos (Nagyova y cols., 1999; Ochi y cols., 1999; Shimada y cols., 2002; Russell y cols., 2006). De forma simultánea, el ovocito sale del arresto en profase I, progresa a metafase II y se arresta de nuevo en esta última fase; en este evento aparece el primer cuerpo polar en el ovocito (Jamnongjit y Hammes, 2005). Posteriormente, el ovocito rodeado de las células de la cúmula es liberado al oviducto por el proceso conocido como ovulación (Figura 9B).



**Figura 9.** Funciones del ovario. **A)** Folliculogénesis. **B)** Ovogénesis. Imagen tomada de Netter, Frank H. "Atlas de anatomía humana", Elsevier Masson, 5ª edición. 2009

### **1.7.1.1.2 Ovulación**

Un ovocito maduro rompe la membrana folicular permitiendo su salida hacia el oviducto durante la ovulación, liberando al folículo que está constituido por una membrana plasmática, una capa llamada zona pelúcida (capa que rodea al ovocito) y células de la cúmula que lo rodean (Knobil y Neill's, 2006). La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que se constituye de cuatro proteínas, la ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Johnson y Everitt, 1995).

La ruptura de la membrana folicular parece ocurrir por acción de un activador del plasminógeno presente en el líquido folicular, que catalizaría la conversión del plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica capaz de romper la membrana basal, y que actuaría sobre el tejido conjuntivo de la teca. El proceso de la ruptura folicular podría estar mediada también por una especie de "reacción inflamatoria" local dependiente de histamina, por colagenasas o por la contractura folicular inducida por prostaglandinas (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

### **1.7.1.1.3 Función endocrina del ovario**

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el estradiol y progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona, testosterona, 17- $\alpha$ - hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como inhibina, relaxina y algunos factores locales. Todos los esteroides ováricos se producen sobre todo en las estructuras foliculares y en el cuerpo lúteo. Al igual que los producidos en los testículos, en las glándulas suprarrenales o en la placenta, derivan del colesterol que se obtiene a partir de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre como lipoproteínas, el que se sintetiza de novo dentro del ovario a partir de acetilcoenzima A, y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas.

La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario se deriva de la captación del colesterol lipoproteico, en concreto de las lipoproteínas de baja densidad o LDL. Existen receptores para las LDL en las células ováricas y también hay sistemas enzimáticos capaces de sintetizar el colesterol. El colesterol, independientemente

de su origen, se transporta después a las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis esteroidea. Este proceso tiene como elemento limitante la producción de pregnenolona catalizada por la enzima desramificante del colesterol (citocromo P450 CYP desramificante), que utiliza como cofactores a la adrenodoxina y flavoproteínas.

La biosíntesis sigue después la vía  $\Delta$ -4 en el cuerpo lúteo, que lleva emparejada la conversión de pregnenolona en progesterona, mientras que en el folículo es preferente la vía  $\Delta$ -5, ya que las células tecales son capaces de metabolizar con más eficiencia la 17-hidroxipregnenolona que la 17-hidroxiprogesterona.

Los lugares principales de producción esteroidea en el ovario son la granulosa, la teca y las células del cuerpo lúteo, que poseen el sistema enzimático complementario y/o completo requerido para la formación de las hormonas esteroideas. La producción de esteroides durante el ciclo menstrual está en función del contenido de cuatro enzimas clave: la CYP desramificante, 3- $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- $\beta$ HSD), CYP 17-hidroxilasa y p450-aromatasa. Estas enzimas catalizan la conversión de colesterol a pregnenolona, de pregnenolona a progesterona, de ésta a andrógenos y, por último, de los andrógenos a estrógenos (Figura 7).

Tanto las células tecales como el cuerpo lúteo son capaces de sintetizar elevadas concentraciones de andrógenos, característica de la que carecen las células granulosas. El último paso para la biosíntesis de los estrógenos es la aromatización del anillo A de los andrógenos a partir de la enzima CYP 19 aromatasa, que está presente en grandes cantidades en las células granulosas, por lo que éstas son capaces de transformar los andrógenos en estrógenos.

Las células tecales, con suficiente vascularización y dotación de receptores para LDL, disponen de los sistemas enzimáticos capaces de transformar la pregnenolona en andrógenos, pero carecen de las enzimas aromatizantes para llegar a la biosíntesis del estradiol. Por su parte las células de la granulosa, con poco acceso al LDL colesterol, que disminuye en gran medida su capacidad de biosintetizar pregnenolona y progesterona son, sin embargo, capaces de sintetizar

cantidades elevadas de estrógenos, siempre que los andrógenos precursores les sean suministrados por otro tipo celular, en concreto por las células tecaes. Es justo la colaboración entre las células de la teca y las células de la granulosa lo que permite el proceso de biosíntesis del estradiol tal como ocurre en el ovario durante el crecimiento folicular (Tresguerres., 1999; Hall., 2016).

### **1.7.1.2 Ciclo menstrual**

Durante el comienzo de la pubertad, y hasta la menopausia, el ovario de la mujer produce una serie de secreciones hormonales cíclicas que darán lugar al ciclo menstrual que se traduce en toda una serie de cambios hormonales. Como hecho más importante de estos ciclos menstruales cabe destacar la liberación de un óvulo fecundable cada mes aproximadamente; siendo evidente por el sangrado menstrual, que aparece con la misma periodicidad y que es consecuencia de la acción coordinada hormonal ovárica sobre el endometrio uterino. Convencionalmente se designa día 1 del ciclo al primer día de hemorragia menstrual. El ciclo menstrual se divide en las siguientes fases: folicular, ovulatoria, lútea y de regresión (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### **1.7.1.2.1 Fase preovulatoria o folicular (Fase proliferativa)**

La foliculogénesis de cada ciclo menstrual comienza en los últimos días de la fase lútea del ciclo precedente y termina con el comienzo de la secreción ovulatoria de gonadotropinas en la mitad del ciclo menstrual. El incremento de los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) durante la fase tardía provoca el crecimiento de varios folículos (días 1 a 4). Durante los días 5 a7 se selecciona un sólo folículo de entre todos los reclutados, mientras que los restantes entran en fase de atresia. Por último, el folículo dominante madura (días 8 a 12). Durante toda la fase que culmina con la ovulación (días 13 a 15), el aparato folicular, y especialmente el folículo seleccionado, producen gran cantidad de estrógenos (principalmente estradiol). La producción de estradiol por el folículo destinado a ovular es el resultado de la actividad de las células de la teca y de la granulosa controladas por las gonadotropinas LH y FSH. Durante esta fase, y por acción de los estrógenos, el endometrio prolifera (fase proliferativa) (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### **1.7.1.2.2 Fase ovulatoria**

Durante la fase folicular, los estrógenos, por medio de efecto de retroalimentación negativa, han estado inhibiendo la secreción de gonadotropinas. Por el contrario, durante la fase ovulatoria (días 13 a15), el folículo preovulatorio secreta grandes cantidades de estrógenos que ejercen un efecto de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisiario, lo que produce la secreción ovulatoria de LH y FSH. Tras la liberación ovulatoria de gonadotropinas se produce la ovulación y se inicia la luteinización (Tresguerres., 1999; Hall., 2016).

#### **1.7.1.2.3 Fase lútea (Fase secretora)**

Con la ovulación-luteinización, el folículo post-ovulatorio luteinizado experimenta un cambio en la esteroidogénesis y pasa a ser una glándula productora de progesterona, además de estradiol. La máxima producción de progesterona se alcanza hacia el día 21 y se mantiene hasta el día 25. A partir de esta fecha, y hasta el comienzo de la menstruación, la secreción de progesterona disminuye gradualmente. Para la correcta secreción de progesterona y estradiol por el cuerpo lúteo es necesaria la secreción pulsátil de LH. A su vez, los productos de secreción del cuerpo lúteo inhiben la secreción de gonadotropinas (Tresguerres., 1999; Hall., 2016).

#### **1.7.1.2.4 Fase de regresión**

La menstruación se produce tres días después de iniciado el proceso luteolítico y es causada por la disminución de la secreción de esteroides por el cuerpo lúteo en regresión. La disminución de estradiol y progesterona induce un aumento en la concentración de prostanglandinas en el endometrio. La liberación de prostanglandinas provoca constricción de las arteriolas espirales en la base del endometrio, que ocasiona necrosis endometrial y lesión del endotelio de los vasos endometriales. El proceso hemorrágico es facilitado por la presencia en el endometrio de sustancias con actividad fibrinolítica, lo que evita que la sangre menstrual se coagule (Tresguerres., 1999; Hall., 2016).

#### **1.7.1.2.5 Cuerpo lúteo**

Tras la ruptura del folículo, tanto los capilares como los fibroblastos de la teca interna proliferan y penetran la lámina basal. Las células granulosas murales se someten a cambios morfológicos, que en su conjunto determinan el proceso de luteinización. Todas estas células granulosas transformadas, más las células tecales y los vasos se entremezclan para dar lugar al cuerpo lúteo, que será responsable de la secreción de las hormonas sexuales durante la fase post-ovulatoria del ciclo.

Por lo general, el cuerpo lúteo de los primates dura alrededor de  $12 \pm 2$  días, transcurridos los cuales regresan espontáneamente, quedando reducido a una cicatriz blanquecina denominada corpus albicans. Esto es así siempre y cuando no se produzca la fecundación, en cuyo caso la rápida producción de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) por el trofoblasto embrionario precursor de la placenta, transformaría el cuerpo lúteo menstrual en un cuerpo lúteo gravídico, prolongando y aumentando las secreciones hormonales del mismo, sobre todo de progesterona, necesaria para el mantenimiento del embarazo en sus fases iniciales (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).

#### **1.7.1.3 Ciclo estral**

El ciclo estral de la rata o ratón, dura entre 4 a 5 días y puede ser influenciado por factores exteroceptivos como la luz, la temperatura y las sustancias químicas percibidas por el sentido del olfato. Se divide en cuatro fases: estro, metaestro, diestro y proestro.

Estro es la fase de celo en que la hembra se encuentra receptiva y presenta los patrones de conducta sexual característicos como la lordosis entre otros. El acercamiento, la monta por el macho y la cúpula con el macho se permiten. Como la ovulación ha sucedido pocas horas antes, los óvulos se encuentran en el oviducto. El folículo post-ovulatorio comienza a estructurarse como cuerpo lúteo mientras una nueva serie de folículos primarios comienza a desarrollarse. En la mucosa vaginal se encuentran numerosas células en mitosis que desplazan a las capas más superficiales (epitelio escamoso y cornificado) que son exfoliadas a la

luz de la vagina. La presencia de estas células en el frotis vaginal es indicativa de estro y señal probable de ovulación.

Al día siguiente aparece el metaestro, que tiene aproximadamente la misma duración que la fase de estro. La monta y la cópula por el macho ya no se permiten. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y la de estradiol por los folículos inhiben la secreción de gonadotropinas. La vascularización y la motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se aprecia infiltración leucocitaria junto con algunas células cornificadas.

Durante la fase de diestro se produce la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis), siempre y cuando no haya cópula; en algunos roedores la copulación estimula la liberación de prolactina, hormona que estimula la producción de leche. La secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando. Al igual que en la fase de metaestro, los esteroides ováricos inhiben la secreción basal de gonadotropinas pero mantienen el crecimiento folicular. El útero es pequeño, anémico y no contráctil.

La última fase del ciclo estral es la de proestro. Los folículos han adquirido el estadio de folículos pre-ovulatorios y secretan grandes cantidades de estradiol. Esta hormona ejerce ahora un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas. La LH induce la ovulación y la luteinización del folículo post-ovulatorio. El útero, por acción del estradiol, se hace extremadamente contráctil y en la vagina aparecen células epiteliales nucleadas. La cópula sólo se permite en el proestro tardío, con el comienzo de la fase de oscuridad. La secreción de FSH en la mañana del día del estro, que ocurre por la disminución de la secreción ovárica de inhibina, estimula el crecimiento folicular (Tresguerres., 2010; Hall., 2016).



## **2. JUSTIFICACIÓN**

La tuberculosis pulmonar no diseminada, es una enfermedad infecciosa en la que para que ocurra el control de la bacteria se requiere de la actividad del sistema inmunológico, y también del sistema endocrino. Se ha descrito que el éxito o fracaso de la respuesta inmunológica que se monta frente al reto infeccioso depende de las hormonas sexuales.

A pesar de que existe evidencia de la interacción de ambos sistemas, no existen reportes sobre las posibles alteraciones que ocasiona el sistema inmune sobre el sistema reproductivo durante la tuberculosis pulmonar.

Por todo esto es necesario investigar en profundidad las alteraciones en la histopatología y función de los órganos reproductivos que ocurren durante la infección pulmonar no diseminada con *Mycobacterium tuberculosis*, conocimiento que ayudaría a corregirlas.

## **3. HIPÓTESIS**

La infección pulmonar con *Mycobacterium tuberculosis* en ratones causa alteraciones inmunoendocrinas que modifican la histopatología y la función del testículo y el ovario.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la influencia de la infección pulmonar con *Mycobacterium tuberculosis* en la histopatología y función del testículo y ovario.

### **4.1 Objetivos particulares para ratones macho**

1. Determinar el peso y evaluar la morfología del testículo, próstata y vesículas seminales de ratones infectados con H37Rv y controles.

2. Estudiar la influencia de la infección en la espermatogénesis: número de espermatozoides, movilidad, viabilidad.
3. Determinar la concentración de testosterona en suero de ratones infectados y los controles mediante RIA.
4. Determinar la expresión en tejido testicular de citocinas relacionadas a cambios endocrinos como IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  en ratones infectados y ratones controles mediante inmunohistoquímicas.

#### **4.2 Objetivos particulares para ratones hembra**

1. Determinar el peso corporal, además del peso de útero y ovario, de ratonas infectadas y controles con H37Rv.
2. Estudiar la histología del ovario, oviducto y útero de ratonas infectadas y controles con H37Rv.
3. Determinar el número de folículos (primordiales, primarios, antrales, preovulatorios, atrésicos y cuerpos lúteos) de ovario en ratonas infectadas y controles con H37Rv.
4. Determinar la expresión en tejido ovárico de las citocinas IL-1B e IL-6 en ratonas infectadas y controles por medio de inmunohistoquímicas.
5. Determinar la concentración de estrógenos en suero de ratonas infectadas con H37Rv y controles mediante RIA.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Animales

Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y 22 g de peso, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se alojaron en cajas de polisulfonato con microaislador en un equipo con ventilación individual positiva (Allentown, USA), en un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con alimento y agua *ad libitum*. Las prácticas experimentales a las que se sometieron los animales para este proyecto estuvieron de acuerdo a las directrices de la Ley Constitucional Mexicana NOM 062-200-1999, y aprobadas por el Comité Ético de Experimentación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición en México (CINVA). Toda la cirugía se realizó bajo anestesia con sevoflurano, y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento.

### 5.2 Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)

Para la infección con *M. tuberculosis*, se utilizó la cepa H37Rv que creció en medio líquido Middlebrook 7H9 adicionado con glicerol, tween-80 y enriquecido con ADC (albúmina, dextrosa y catalasa) a 37 °C. En cada experimento se usaron 4 botellas de cultivo para el crecimiento de la bacteria, de las cuales, una botella de cultivo con medio líquido se utilizó para determinar el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica usando un espectrofotómetro (BIOMATE 3, Thermo Spectronic) realizando lecturas a una longitud de onda de 600 nm cada tercer día. Los cultivos finalmente se recuperaron cuando se encontraban en fase logarítmica de crecimiento; es decir al alcanzar una DO<sub>600</sub>. Para la identificación de la bacteria se realizó tinción de Ziehl-Neelsen. Para corroborar la pureza del cultivo, los bacilos se sembraron en placa de agar sangre y se incubaron por 48 horas en una atmósfera de 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.1 Recuperación de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)

Después de la identificación del bacilo por la tinción de Ziehl-Neelsen, comprobada la pureza del cultivo en agar sangre y lograda la fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{600}$ ), se realizó el protocolo para recuperar las bacterias. El volumen total de las 3 botellas de cultivo restantes (180 ml) se dividió en 4 tubos Falcon de 50 ml, teniendo en cada tubo un volumen de 45 ml. Los tubos Falcon se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. De cada tubo se desechó el sobrenadante y se agitaron mediante Vortex por 3 segundos; posteriormente se agregaron perlas de vidrio de 3 mm estériles hasta la marca de 5 ml y se adicionaron 15 ml de PBS 1x-Tween 80 al 0.05% estéril a cada tubo. Nuevamente los tubos se agitaron mediante Vortex por un minuto, y se interrumpió la agitación durante un minuto, proceso que se realizó en 5 ocasiones (5 minutos de agitación y 5 minutos de descanso, de manera intercalada). Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se etiquetaron los tubos de 50 ml con el nombre "Tubo de Lavado", en los cuales se depositó cada uno de los sobrenadantes obtenidos. Colocados los sobrenadantes en cada "Tubo de Lavado" se aforó a 45 ml de PBS-1X estéril. Los tubos aforados a 45 ml (Tubos de lavado) se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Finalizada la centrifugación de los tubos de lavado, se desechó el sobrenadante, el pellet permaneció en el fondo del tubo; el primer tubo se agitó mediante Vortex por 3 segundos y se vació el contenido en el segundo tubo; éste, se agitó mediante Vortex por 3 segundos y el contenido se pasó al tercer tubo, el cual, se agitó y su contenido se agregó al cuarto tubo; el último tubo, se agitó por 3 segundos en Vortex y su contenido se colocó en un tubo falcon de 50 ml identificado con el nombre de "Pool"(contiene la mezcla de los 4 tubos de lavado), colocándose inmediatamente en hielo para formar alícuotas de 0.5 ml en criotubos (13 criotubos), los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. 3 de estos criotubos se marcaron como inicial, medio y final.

### 5.2.2 Conteo de micobacterias para infección de ratones

Las bacterias se tomaron de alícuotas al azar y se descongelaron gradualmente. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de la muestra hasta tener 6 diluciones, se incubaron a 37 °C con una atmosfera al 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante 21 días, al término de este tiempo se contaron las colonias en cada dilución y se determinó el número de micobacterias presentes por ml de concentrado para ajustar a 250,000 unidades formadoras de colonias (UFC's) vivas por cada 100 µl de SSE.

Los animales se infectaron por vía intratraqueal con 250,000 unidades formadoras de colonias (UFC's) vivas por cada 100 µl de SSE.

### 5.3 Modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones de la cepa Balb/C

El modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva que se utilizó es el descrito previamente por Hernández-Pando y colaboradores en 1996. Un grupo de 54 ratones macho y 54 ratonas hembra de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y de aproximadamente 22 gr de peso, fueron sedados en una cámara de acrílico con Sevoflurano (Sevorane) y se infectaron por vía intratraqueal con *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv (250,000 bacterias/por animal). Otro grupo de 54 ratones macho y 54 ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y de aproximadamente 22 gr de peso, fueron sedados con sevoflurano y sólo se les introdujo la cánula por vía intratraqueal, sin bacterias, para ser nuestro grupo control simulado. Los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación (presencia de reflejos y contracción muscular); posterior a su recuperación se agruparon en 10 a máximo 12 animales por microaislador. Los animales se mantuvieron con las luces encendidas desde las 6:00-18:00 horas y se alimentaron con comida esterilizada *ad libitum*, bebieron agua de autoclave. Grupos de seis animales infectados y no infectados de cada grupo (6 machos, 6 hembras) fueron

sacrificados en un gabinete de bioseguridad nivel III a las días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120 post-infección por sedación con sevoflurano.

### **5.3.1 Obtención y preservación de tejidos**

Para el sacrificio, dos grupos de 6 animales cada uno (6 ratones infectados y 6 ratones control) fueron sacrificados en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120 post-infección. Fueron anestesiados en una cámara con éter anhidro, se realizó incisión en la región axilar para cortar la vena subclavia e inducir la muerte por exanguinación; la sangre fue recolectada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y una vez coagulada se centrifugó a 3000 rpm para la obtención del suero. Posteriormente se hizo una pequeña incisión a la altura del pubis, seguida de un corte a través de la línea media hasta la zona del orificio torácico superior; se cortó la capa muscular desde la región pélvica hasta la apófisis xifoides para exponer la cavidad abdominal. Se movieron las vísceras para exponer los órganos del aparato reproductor masculino y así poder extraerlos.

En los ratones macho, los testículos y las vesículas seminales que se localizan del lado derecho se colocaron en tubos para el equipo homogenizador FastPrep® de MP BIOMEDICALS al igual que 3 próstatas por grupo de sacrificio. El testículo y la vesícula seminal del lado izquierdo se colocaron y preservaron en etanol absoluto para su posterior inclusión en parafina, junto con las 3 próstatas restantes por grupo de sacrificio. Además, se extrajeron los epidídimos junto con parte del conducto deferente, el cual fue preservado en un Eppendorf de 1.5 ml con medio DMEN más BSA y antibióticos y se colocó inmediatamente en una hielera con agua caliente a 37 °C, una incubadora improvisada, para posteriormente realizar la espermatobioscopía.

En las hembras, los ovarios, oviductos y úteros del lado derecho se colocaron en tubos para el equipo homogenizador FastPrep® de MP BIOMEDICALS. Los ovarios, oviductos y úteros del lado izquierdo se colocaron y preservaron en etanol absoluto para su posterior inclusión en parafina.

A continuación, tanto en machos como en hembras, se retiró el hígado para exponer el diafragma; éste se cortó para colapsar los pulmones y realizar cortes laterales en la parrilla costal exponiendo los pulmones. Con la pinza Kelly curva se tomó el bronquio principal derecho, cortando el pulmón derecho y colocándolo en tubo para MP. Posteriormente, y habiendo expuesto la tráquea, se inyectó etanol absoluto para perfundir el pulmón izquierdo y colocarlo en un vial con etanol absoluto para su posterior proceso de inclusión en parafina. Los tubos para el equipo homogenizador FastPrep® de MP BIOMEDICALS con los respectivos órganos fueron inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido para su preservación. Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en un gabinete de seguridad biológica nivel III. Todos los animales fueron pesados antes del sacrificio y posteriormente se pesó cada uno de los órganos extraídos.

Los cadáveres de los animales se colocaron en bolsa roja de autoclave con la leyenda de RPBI, se sacaron del cuarto de bioseguridad para someterlos a un proceso de esterilización, posteriormente los restos estériles se colocaron en una bolsa amarilla y se llevaron al área de recolección de RPBI del INCMNSZ.

### **5.3.2 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC's)**

Se utilizaron los pulmones derechos, así como testículos, vesículas seminales y próstatas de ratón macho y el ovario y útero de ratones hembra infectados previamente sacrificados (en los diferentes tiempos preestablecidos) y preservados bajo temperaturas de -70 °C. Los pulmones, testículos, vesículas seminales, próstatas, ovarios y úteros fueron homogenizados en el sistema FAST PREP24 MP con ayuda de una perla de vidrio por 20 segundos, se les agregó 1 ml de PBS-Tween 80 al 0.05% y se homogenizaron 2 veces más en el FAST PREP24 MP. Se sonicaron por 45 segundos y se realizaron diluciones seriadas (cuatro o cinco diluciones) de cada tubo utilizando PBS-Tween 80 al 0.05% y placas de 96 pozos, se sembraron 10 µl por duplicado en placas con medio Middlebrook 7H10 (Difco laboratorios, Detroit, MI) enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa (Becton, Dickinson, Spark, MD). Las placas se mantuvieron bajo una atmósfera de

5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C, para ser contadas en los días 14, 21 y 28 post-infección (Hernández-Pando y cols., 1996). Para obtener el número de bacterias en cada uno de los órganos analizados, se multiplico el número de UFC's encontradas por su correspondiente factor de dilución. El resultado se interpreta como millones de UFC's por órgano analizado.

#### **5.4 Determinación de hormonas en el suero de ratones infectados**

Después de obtener la sangre de ratones macho y hembra, se separó el suero y se mantuvo a -20 °C hasta el momento de la determinación. Las muestras de suero se extrajeron con éter anhidro como se describe en Castro y Romano (1994). En los machos, la concentración de testosterona se midió mediante radioinmunoanálisis (RIA) utilizando testosterona tritiada como marcador ([<sup>3</sup>H-testosterona 1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]- Perkin Elmer Life Sciences Inc. ® Boston MA). El porcentaje de recuperación fue de 86.59%. El anticuerpo anti-testosterona (ratón monoclonal [4E1G2] a testosterona 3 CMO, Abcam Inc), presentó una reactividad cruzada con testosterona (100%), 11-beta-hidro testosterona (3.3%), 17-alfa-metil testosterona (<0.1%), 5-alfa DTH (0.8%), estradiol (<0.1%), progesterona (<0.1%). La sensibilidad del ensayo fue de 5-10 pg-ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayos del RIA fueron de 9.56% (n¼4).

En las hembras, la concentración de estradiol se midió también por RIA, utilizando estradiol tritiado como marcador ([<sup>3</sup>H-estradiol 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]- Perkin Elmer Life Sciences Inc. ® Boston MA). El porcentaje de recuperación fue de 78.14%. El anticuerpo anti-estradiol (ratón monoclonal [AB4.2] a estradio 6 CMO, Thermo Fisher Scientific), presentó una reactividad cruzada con 17β-estradiol (100%), estriol (<5%), estrona (<10%), 17α-ethynylestradiol (<5%), progesterona (<1%) y testosterona (<1%). La sensibilidad del ensayo fue de 5-10 pg-ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayos del RIA fueron de 9.13% (n¼4).

La radioactividad se midió usando un contador de centelleo para radiaciones beta (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). Para la validación del ensayo se evaluó el



paralelismo de cada hormona comparando la pendiente de una curva de dilución en serie de cuatro muestras de suero diferentes con la pendiente de la curva estándar. Las diferencias de las curvas no fueron significativas (testosterona:  $F_{1,826}$ ;  $df_{4,4}$ ;  $P_{0.141}$ ; estradiol:  $F_{1,315}$ ;  $df_{4,4}$ ;  $P_{0.168}$ ). La pendiente de los estándares marcados con el suero mostró alta precisión (testosterona  $R_{0.996}$ ; estradiol  $R_{0.982}$ ).

## **5.5 Determinación de la calidad espermática**

Este procedimiento se realizó después del sacrificio, los epidídimos con los conductos deferentes se obtuvieron a partir de ratones infectados y controles. Se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de medio DMEN suplementado con BSA al 1% y se incubaron a 37 °C hasta el ensayo. Se evaluaron varios parámetros en las muestras de espermatozoides obtenidas: Concentración, viabilidad y motilidad espermática, así como capacitación de espermatozoides.

### **5.5.1 Motilidad espermática**

Para esta evaluación, se verificó si los flagelos de los espermatozoides presentaban movilidad. Las muestras fueron homogenizadas y se tomaron 10  $\mu$ l de cada una, se colocaron sobre un portaobjetos para ser observados en el microscopio óptico. Utilizando el objetivo del microscopio seco fuerte, se contó el número de espermatozoides estacionarios y móviles presentes en diez campos (unos 200 espermatozoides mínimos). La motilidad espermática se expresó como porcentaje de la muestra total.

### **5.5.2 Conteo de espermatozoides**

El número de espermatozoides se evaluó analizando 10  $\mu$ l de cada muestra de esperma para contar espermatozoides vivos y muertos utilizando la cámara de Neubauer.

### **5.5.3 Viabilidad espermática**

La viabilidad espermática se evaluó mediante la adición de colorantes que permiten discriminar los espermatozoides vivos y muertos. Los espermatozoides muertos permiten la entrada libre de sustancias coloridas a través de sus membranas porque pierden la permeabilidad selectiva. Se colocaron 10  $\mu$ l de eosina (5%) en portaobjetos excavados y se mezclaron con 10  $\mu$ l de esperma, posteriormente se añadieron 10  $\mu$ l de nigrosina (10%). El frotis se extendió para secar rápidamente y se examinó bajo un microscopio óptico. Los espermatozoides muertos se tiñen de rojo.

### **5.5.4 Capacitación de espermatozoides**

Los espermatozoides recién recuperados presentan movilidad progresiva lenta o permanecen inmóviles. Por lo general, después de 2 horas, del 60 al 70% de los espermatozoides muestran una movilidad rápida, progresiva y dirigida que indica el inicio de la capacitación (Calderón- Mendoza y cols., 2012). Los flagelos realizan movimientos con mayor fuerza y logran moverse rápidamente. Para evaluar el proceso se colocaron los epidídimos y el conducto deferente en tubos Eppendorf con DMEN suplementado con BSA al 1% y se incubaron durante 2 horas a 37 °C bajo 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, se colocaron 10  $\mu$ l de la muestra en portaobjetos excavados y se evaluaron al menos 10 campos de microscopio óptico (al menos 200 espermatozoides). Los resultados se presentan como porcentajes.

## **5.6 Preparación de tejidos para el análisis histológico y la morfometría**

Los testículos, vesículas seminales, próstata, ovario, oviducto y útero de ratones infectados y controles se conservaron en alcohol absoluto por lo menos 24 horas después del sacrificio. Posteriormente, se prosiguió con la deshidratación de los tejidos hasta embeberlos en parafina. Los tejidos se colocaron en casetes debidamente marcados y se siguió la siguiente secuencia de deshidratación: (1) 1 hora en alcohol absoluto 1, (2) 1 hora en alcohol absoluto 2, (3) 1 hora en alcohol absoluto 3, (4) 1 hora en Xilol 1, (5) 1 hora en Xilol 2, (6) 1 hora en Xilol 3, (7) 1 hora en parafina 1, (8) 1 hora en parafina 2 y (9) 1 hora en parafina 3. Una vez deshidratados y embebidos en parafina se procedió a realizar cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno de los órganos a analizar. Dichos cortes se colocaron en laminillas de vidrio, se desparafinaron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Para la cuantificación de infiltrados inflamatorios, se evaluaron al menos tres testículos de ratones diferentes por cada tiempo de infección en dos experimentos diferentes. Se seleccionaron diez campos de microscopía aleatoria con una ampliación de 20X. Se evaluaron los túbulos seminíferos así como el área de las Células de Sertoli y Leydig. En la vesícula seminal y el epitelio de próstata se midió la longitud y el ancho de 10 células de al menos tres regiones diferentes para evaluar la morfología celular. Con respecto a las hembras, en el útero se midió el grosor del endometrio residual. Se seleccionaron tres campos en el corte (extremos y centro) con una ampliación de 20X, además se evaluó la cito-arquitectura de las glándulas endometriales para determinar el ciclo estral de las ratonas en el momento del sacrificio. En lo oviductos se midió la longitud de las microvellosidades del epitelio cilíndrico simple. Se seleccionaron 10 campos al azar con una ampliación de 100x. Todas estas mediciones se realizaron mediante el equipo de morfometría Leica 500 Q-win (Hernández-Pando y cols., 1998).

### **5.6.1 Conteo folicular en ovario**

El análisis de ovario se basó en la identificación y conteo de folículos que nos proporcionó información acerca de la funcionalidad de este tejido ovárico. Una vez que los ovarios estaban embebidos en parafina se realizaron cortes de 4µm de todo el tejido. Los cortes se colocaron en laminillas y se tiñeron con H&E. Los tejidos ováricos que se analizaron correspondieron a intervalos de 10 cortes consecutivos. Para la evaluación del tejido ovárico, se analizó y cuantificó el número de folículos en diferentes estadios de desarrollo folicular (primordiales, primarios, antrales, maduros y atrésicos, así como, el número de cuerpos lúteos).

Se consideraron folículos primordiales a aquellos que presentaban al ovocito con su núcleo rodeado de una capa de células aplanadas. Se identificaron a los folículos primordiales a aquellos que contenían al ovocito con el núcleo y una capa de células cuboidales (células de la granulosa), mientras que los antrales ya presentaban varias capas de células de la granulosa y dos capas de células alargadas, denominadas células de la teca, además se observó el espacio antral. Los folículos maduros se identificaron por el gran espacio antral que presentan y porque las células de la granulosa estaban unidas por una región muy pequeña al resto del folículo. Finalmente, los cuerpos lúteos se identificaron por los folículos que no presentaban ovocito. La cuantificación se realizó con el microscopio óptico de la marca Leica a una ampliación de 40X.

### **5.6.2 Inmunohistoquímica de las citocinas en tejido**

La expresión de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  en los testículos y la expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$  en ovario, se determinó mediante inmuno-histoquímica (IHQ). Los testículos y ovarios embebidos en parafina utilizados para el estudio histo-morfométrico también se usaron para realizar IHQ. Se obtuvieron secciones de 5 µm y se depositaron sobre laminillas cargadas con poli-lisina (Biocare Medical, Lake Concord, Ca, EUA). Para el desparafinado, las laminillas se colocaron a 60-70 °C durante 20 min y se incubaron durante 5 minutos en xileno. Las laminillas se

sometieron a un proceso de rehidratación mediante la siguiente secuencia: (1) alcohol xileno (1:1), (2) alcohol absoluto, (3) alcohol al 96% y (4) H<sub>2</sub>O destilada. Una vez que los cortes estaban hidratados, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de metanol-10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los lavados se realizaron con solución salina tamponada con HEPES (HBS)-Tween 20 (HEPES 10mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, Tween20 al 0.05%). Las áreas de tejido se delinearon y luego se bloquearon con 100 µl de HBS con 2% de Sniper de Fondo (Biocare Medical), se incubaron durante 30 minutos en una cámara húmeda. Después se incubaron las secciones con diluciones apropiadas de anticuerpos específicos policlonales de conejo de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) y anticuerpos específicos policlonales de cabra de IL-10 e IL-1 $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las laminillas y se añadieron 100 µl de peroxidasa de cabra anti-conejo o anti-cabra (AB/HRP) (Vectastain ABC System, Burlingame, CA, EUA) y se incubaron durante 30 minutos para revelarse con 100 µl de diaminobenzideno / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.004 g de diaminobencidina + 10 ml HBS + 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las laminillas fueron lavadas y contrastadas con hematoxilina.

### **5.6.3 Cuantificación de la expresión de citocinas en tejido**

Mediante la morfometría digital automatizada cuantificamos la expresión de las citocinas en testículo y ovario. Las IHQ realizadas en cada uno de los tejidos se digitalizaron usando el equipo Aperio Scanscope CS (Aperio, Vista, CA) del Hospital Infantil de México Federico Gómez con el asesoramiento de la Dra. Guillermina Baay Guzmán. El Aperio Scanscope CS obtiene imágenes de 40x con una resolución espacial de 0.45 µm/píxeles. Las imágenes fueron revisadas usando el programa ImageScope (Aperio). Una vez que se registraron las áreas (500 µm<sup>2</sup> para cada tejido), fueron enviados para el análisis automatizado de imágenes utilizando el software Spectrum V11.1.2.752 (Aperio). Para la intensidad dentro del tejido, se utilizó un algoritmo desarrollado para la cuantificación de la expresión de proteína citoplásmica determinado por el equipo. La salida del algoritmo da una cantidad de

medidas cuantitativas como la intensidad, la concentración y el porcentaje de tinción positiva. Las escalas cuantitativas para la intensidad y el porcentaje se categorizaron en 4 y 5 clases, respectivamente, después de que los valores de corte fueran determinados. La intensidad de la tinción se clasificó como 0 (sin tinción), 2+ (moderado) y 3+ (fuerte). El puntaje de IHQ final fue calculado a partir de una combinación de los puntajes de intensidad y porcentaje.

### **5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para éste estudio se utilizaron 6 animales infectados y 6 animales control en cada tiempo de sacrificio en dos experimentos independientes. Los resultados se presentan como la media más o menos la desviación estándar y  $P < 0.05$  se consideró como significativa. La comparación entre los grupos se realizó con análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y la significancia estadística fue determinada con la prueba post-hoc Bonferroni de comparación múltiple.

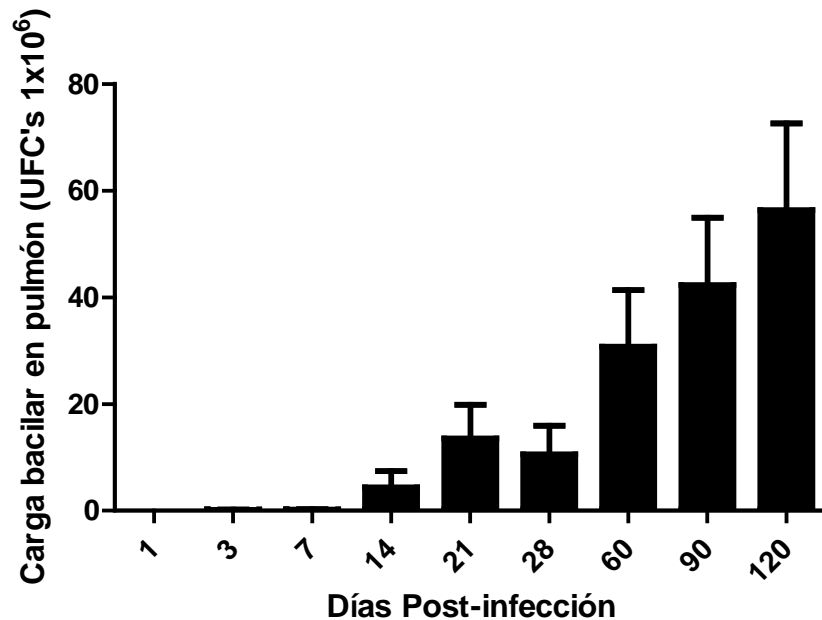
## 6. RESULTADOS

### 6.1 EFECTO DE LA INFECCIÓN PULMONAR CON *Mycobacterium tuberculosis* EN ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE RATONES MACHO

#### 6.1.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC's) en pulmones infectados con H37Rv así como en testículos, vesículas seminales y próstata

Para determinar que los ratones que utilizamos solo presentaban tuberculosis pulmonar, y para corroborar que la bacteria no se diseminó a los órganos de nuestro interés, realizamos la determinación de UFC's en estos tejidos. Efectivamente, sólo encontramos la presencia de la bacteria en pulmón, mientras que en los otros tejidos no se detectó a MTB, por lo que esto nos señala que nuestros animales sólo cursaban tuberculosis pulmonar.

En la Figura 10 mostramos como en el pulmón de ratones infectados con H37Rv incrementa el número de UFC's conforme avanza la enfermedad. Es interesante observar que en los primeros 7 días de infección parece ser que el organismo del ratón trata de controlar el crecimiento bacteriano, sin embargo este control no se sostiene, ya que a partir del día 14 post-infección se incrementa el número de colonias de H37Rv en pulmón.

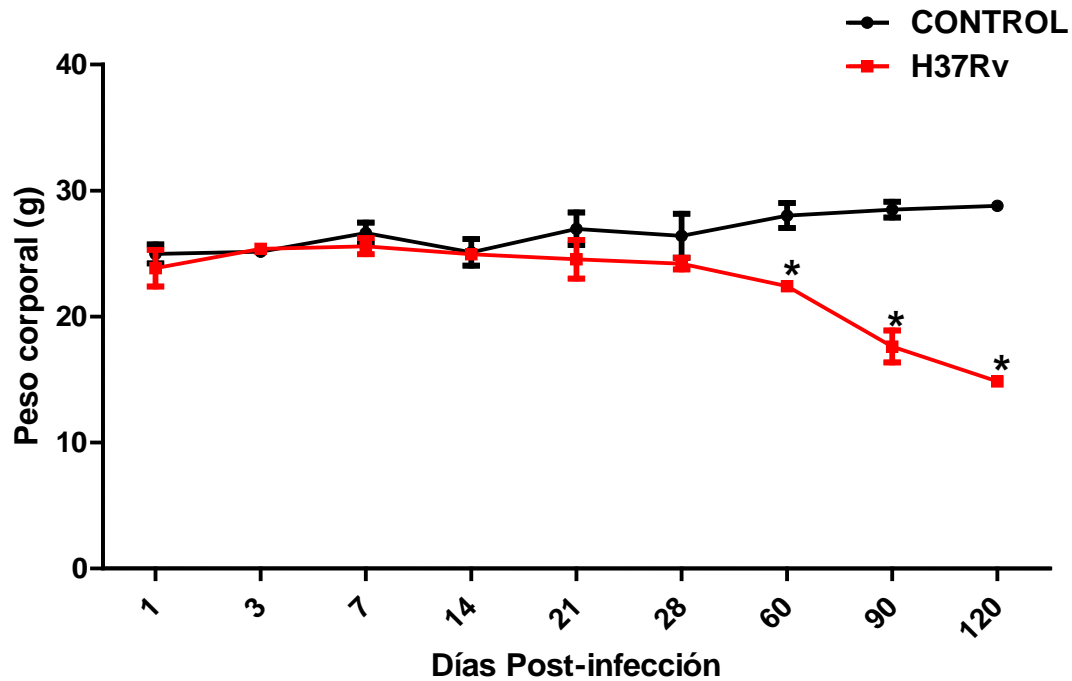


**Figura 10.** Carga bacilar en pulmón de ratones macho infectados con H37Rv. Los ratones fueron infectados vía intratraqueal con *Mycobacterium tuberculosis* H37RV y fueron sacrificados en cada uno de los días indicados después de la infección. Los pulmones (n=8 pulmones por grupo por cada tiempo de sacrificio) fueron usados para la determinación de unidades formadoras de colonias

### 6.1.2 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el peso corporal de los ratones macho

Para determinar si la infección pulmonar con H37Rv afectaba al peso corporal, los ratones fueron pesados antes de ser sacrificados en cada uno de los tiempos establecidos. Los resultados no muestran cambios significativos en el peso en los primeros días de la infección, es decir en la etapa temprana de la enfermedad. La pérdida de peso se hace significativa a partir del día 60 post-infección con una pérdida de peso corporal de aproximadamente 20%, y continúa decreciendo hasta el día 120 post-infección (Figura 11).



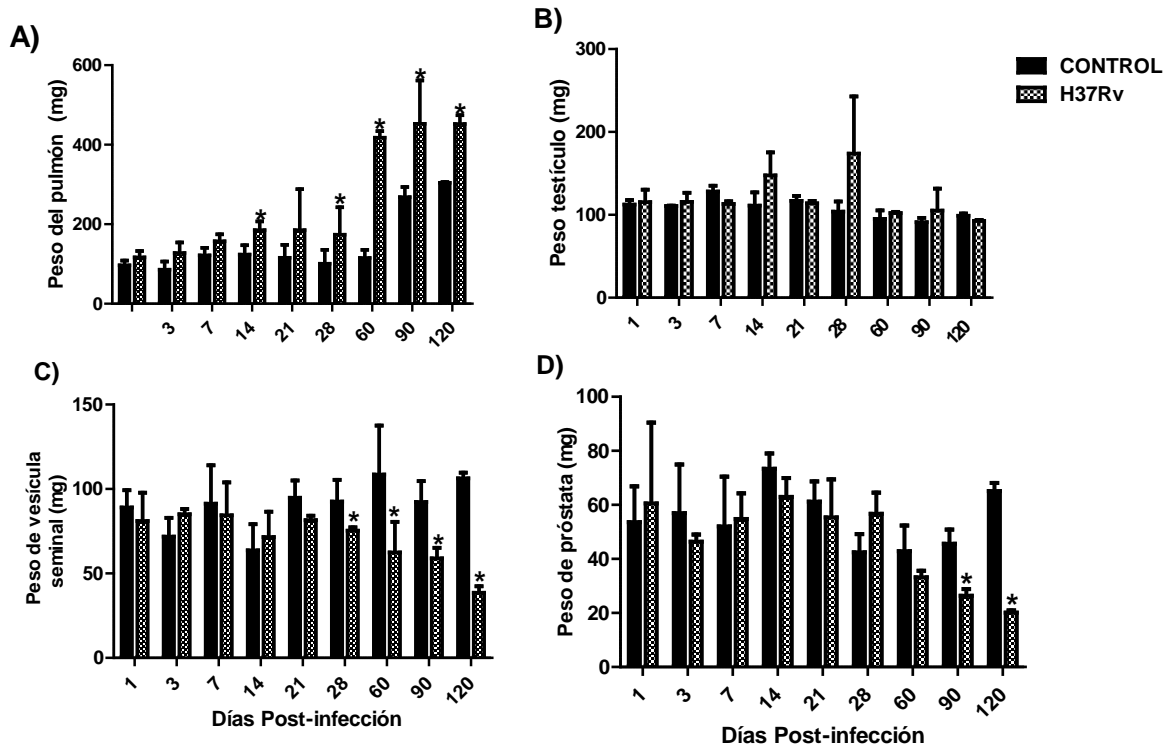


**Figura 11.** Peso corporal de ratones con tuberculosis pulmonar (H37Rv) y animales sanos como control. Cada punto representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo por cada tiempo de sacrificio,  $P < 0.05$ ). Se encontraron diferencias significativas en el peso corporal de los ratones infectados con H37Rv con respecto a sus controles en la etapa tardía de la enfermedad.

### 6.1.3 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el peso del pulmón y de los órganos sexuales masculinos

Al determinar el peso de los órganos de animales en el curso de TB activa encontramos que el peso del pulmón se incrementa a partir del día 14 post-infección y continua aumentando conforme avanza la enfermedad. Esto es resultado del crecimiento bacteriano que se está llevando a cabo dentro de los pulmones, así como del infiltrado celular que existe en respuesta al control del crecimiento bacteriano (Figura 12A). Por otro lado, el peso de las vesículas seminales de los ratones con TB activa fue menor con respecto a las vesículas seminales de los ratones control después de 28 días de infección, esta diferencia entre los animales infectados y controles va aumentando conforme progresa la enfermedad (Figura

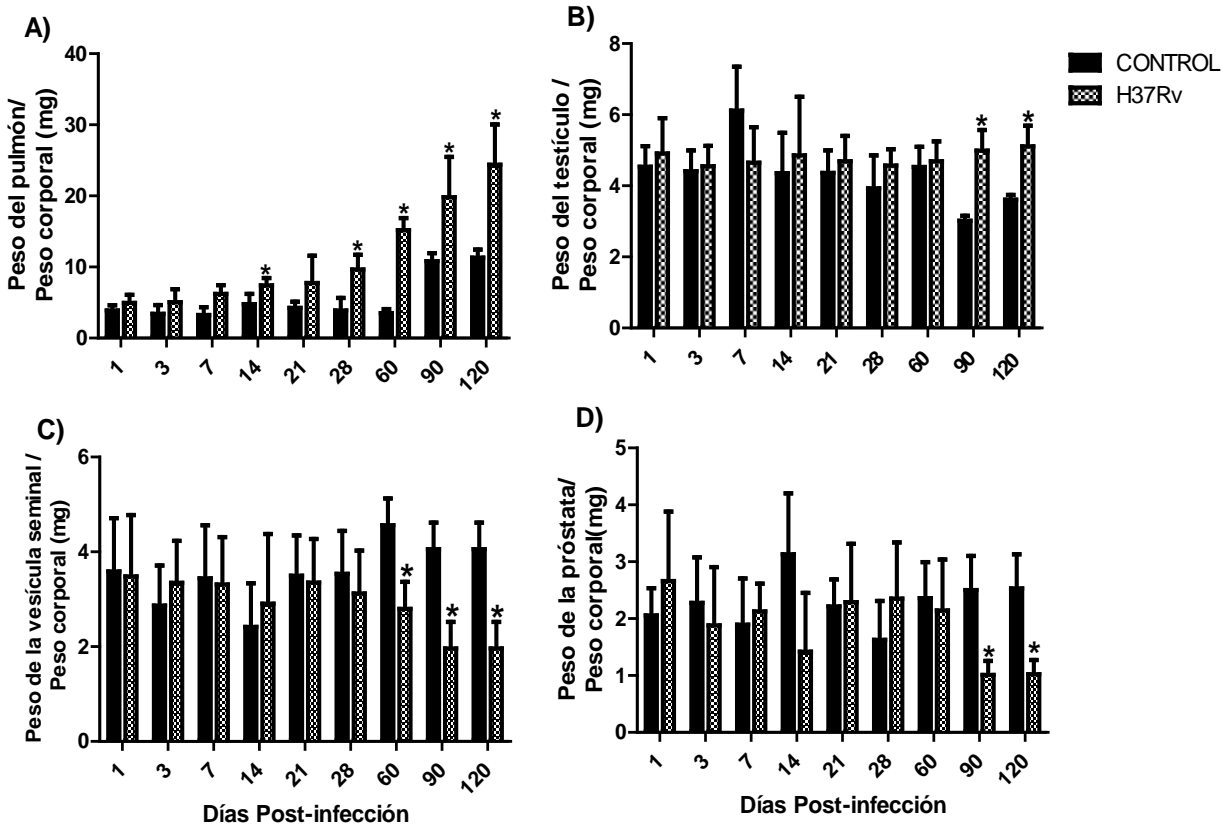
12C). Además, el peso en la próstata también disminuye en los animales infectados con respecto a los animales control, sin embargo esto aparece recién a partir del día 60 post-infección (Figura 12D), en tiempos más tardíos de la enfermedad pulmonar. Sorprendentemente, no encontramos diferencias en el peso de los testículos en los ratones con TB activa con respecto a sus controles en ningún tiempo de la enfermedad (Figura 12B).



**Figura 12.** Pesos de pulmón y órganos sexuales masculinos de ratones en el curso de tuberculosis pulmonar con H37Rv. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo,  $P < 0.05$ ). **A. Peso del pulmón.** Se observa incremento significativo en el peso de los pulmones de ratones infectados con H37Rv con respecto a sus controles conforme progresa la enfermedad a partir del día 14. **B. Peso de testículo.** No se observan diferencias entre ratones infectados y control en ningún tiempo de la enfermedad. **C. Peso de vesícula seminal.** Se encontró una disminución en el peso de las vesículas seminales de los ratones infectados con respecto a su control a partir del día 28 post-infección. **D. Peso de próstata.** Se encontró una disminución en el peso de la próstata de los ratones con tuberculosis pulmonar con respecto a su control en los días 90 y 120 post-infección.

#### **6.1.4 Corrección del peso de los órganos por el peso corporal de ratones en el curso de tuberculosis pulmonar**

Al realizar la corrección del peso de los órganos de animales en el curso de TB activa con respecto al peso corporal encontramos que el peso del pulmón se incrementa a partir del día 14 post-infección y continua aumentando conforme avanza la enfermedad (Figura 13A). Por otro lado, se hace evidente que las vesículas seminales y la próstata pierden peso a partir del día 60 y 90 post-infección, respectivamente (Figura 13C y 13D). Sin embargo en los testículos de animales infectados se observa que hasta el día 60 post-infección no se presentan cambios en el peso, es partir del día 90 post-infección que el peso de los testículos de animales con TB aparenta ser mayor con respecto a su control, esto se debe a que solo el peso corporal disminuyó mientras que el peso corporal se mantuvo sin alguna alteración como lo habíamos mencionado anteriormente (Figuras 12B y 13B).



**Figura 13.** Peso de órganos corregido por peso corporal de ratones en el curso de la TB. **A)** Peso del pulmón corregido por peso corporal de machos infectados con H37Rv y ratones sanos. **B)** Peso de testículo corregido por el peso corporal de machos infectados y sanos. **C).** Peso de vesículas seminales corregido por peso corporal de ratones infectados y sanos. **D)** Peso de próstata corregido por el peso corporal de ratones infectados y sanos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupos)\* representa la diferencia estadísticamente significativa. (\*  $p < 0.05$ )

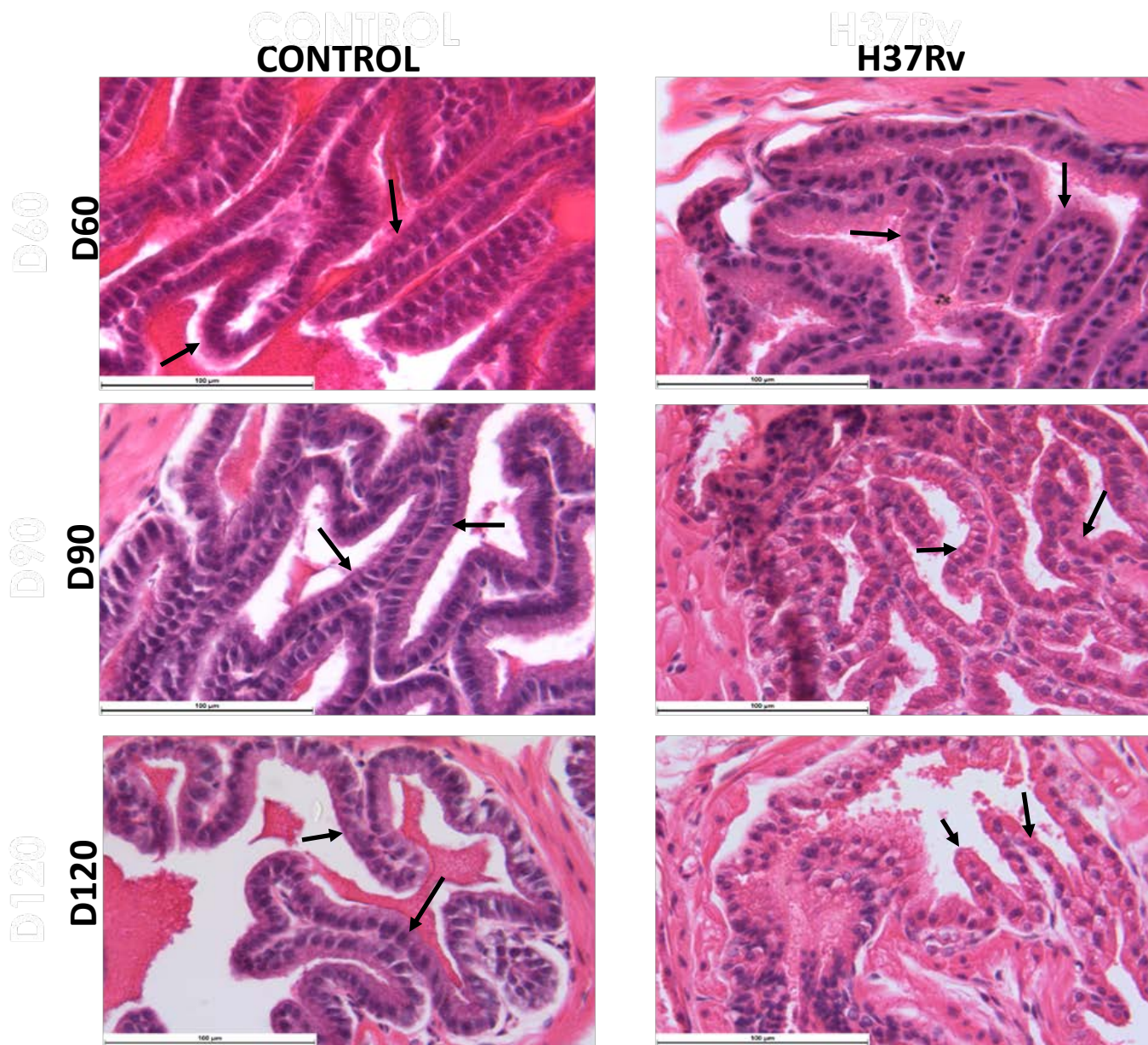
## **6.1.5 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre la histopatología de testículos, vesícula seminal y próstata**

### **6.1.5.1 Testículos**

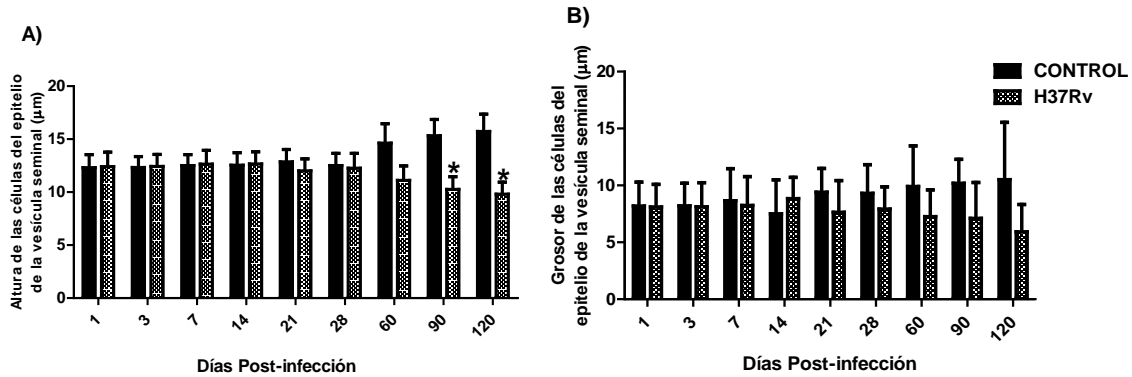
La histopatología de los testículos de ratones infectados con H37Rv no presentó alteraciones comparando con los controles. Las células de Leydig y Sertoli son similares y no se pudieron detectar signos de inflamación.

### **6.1.5.2 Vesículas seminales**

La histopatología de las vesículas seminales de ratones infectados con H37Rv presentó alteraciones. En las micrografías de vesícula seminal (Figura 14) se muestra claramente como la cito-arquitectura de las vesículas seminales se va alterando conforme avanza la enfermedad. El epitelio presenta formas irregulares y atrofia, por lo que al medir la altura y el grosor de las células epiteliales que conforman a las vesículas seminales, se encontró una disminución en la altura pero no en el grosor de las células en los días 90 y 120 post-infección comparando con el control (Figura 15A y 15B).



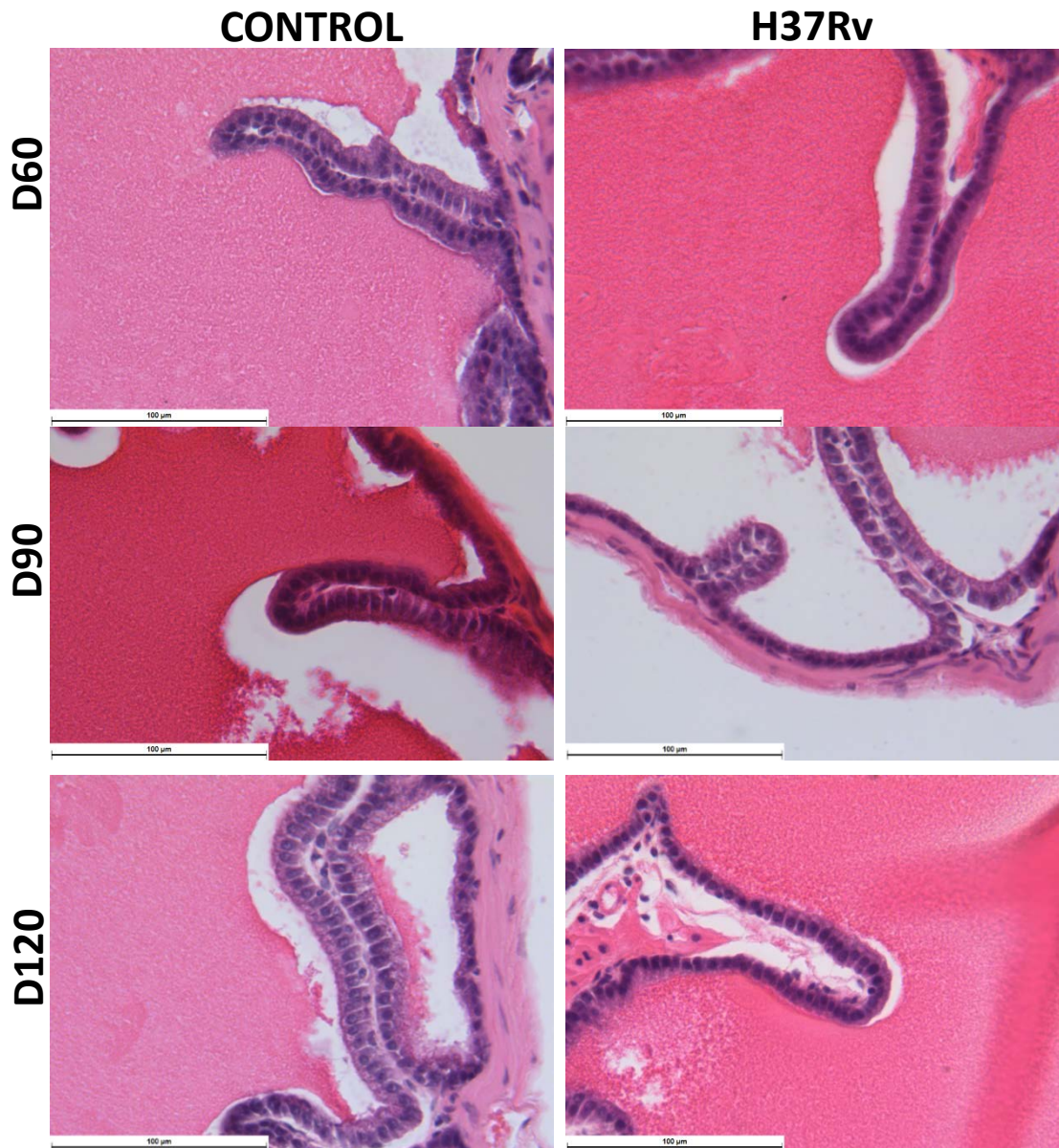
**Figura 14.** Micrografías representativas de vesícula seminal de ratones sanos e infectados con MTB. Del lado izquierdo se observan micrografías de vesícula seminal de ratón sano y a la derecha se encuentran las vesículas seminales de ratones infectados con H37Rv. Tinción con H&E en los días 60, 90 y 120 post-infección. Objetivo 40X.



**Figura 15.** Arquitectura del epitelio de la vesícula seminal de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos. A. Altura de las células del epitelio de vesículas seminal de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos. B. Anchura de las células del epitelio de la vesícula seminal de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupo,  $P < 0.05$ )

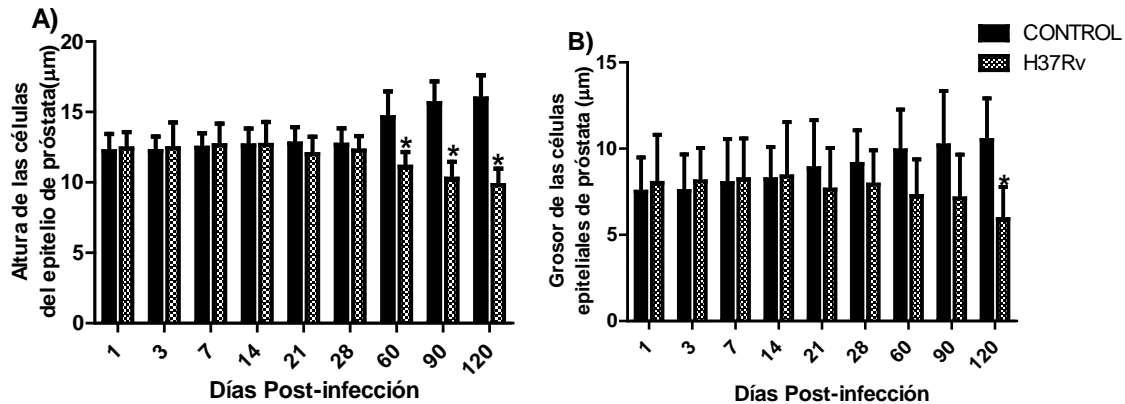
### 6.1.5.3 Próstata

El análisis de la histopatología del tejido prostático evidenció alteraciones con respecto a la de los controles. Al igual que en las vesículas seminales, también se observó atrofia celular y conforme la enfermedad avanza las alteraciones en el tejido se hacen más evidentes (Figura 16). Al medir a las células epiteliales de la próstata encontramos que la altura y el grosor celular disminuyen en los animales con TB activa respecto a su control. La alteración de la altura fue evidente al día 60 y la diferencia aumentó en los días 90 y 120 post-infección (Figura 17A). Los cambios en el grosor de las células epiteliales de la próstata presentaron alteración estadísticamente significativa en el día 120 post-infección (Figura 17B).



**Figura 16.** Micrografías representativas de próstata de ratón. A la izquierda se observan micrografías de próstata de ratón sano y a la derecha se encuentran las próstatas de ratones infectados con H37R en los días 60, 90 y 120 post-infección. Tinción con H&E. objetivo 40X.

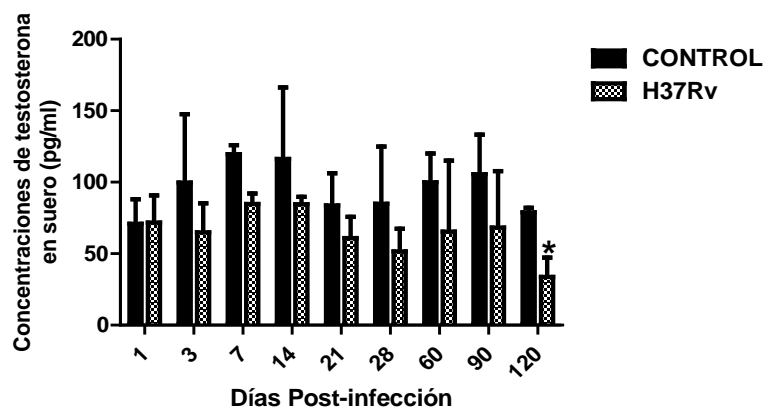




**Figura 17.** Arquitectura de epitelio de próstata de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos. A. Altura de las células del epitelio de próstata de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos. B. Grosor de las células del epitelio de próstata de ratones infectados con H37Rv y ratones sanos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupo, P<0.05).

### 6.1.6 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre las concentraciones de testosterona en suero

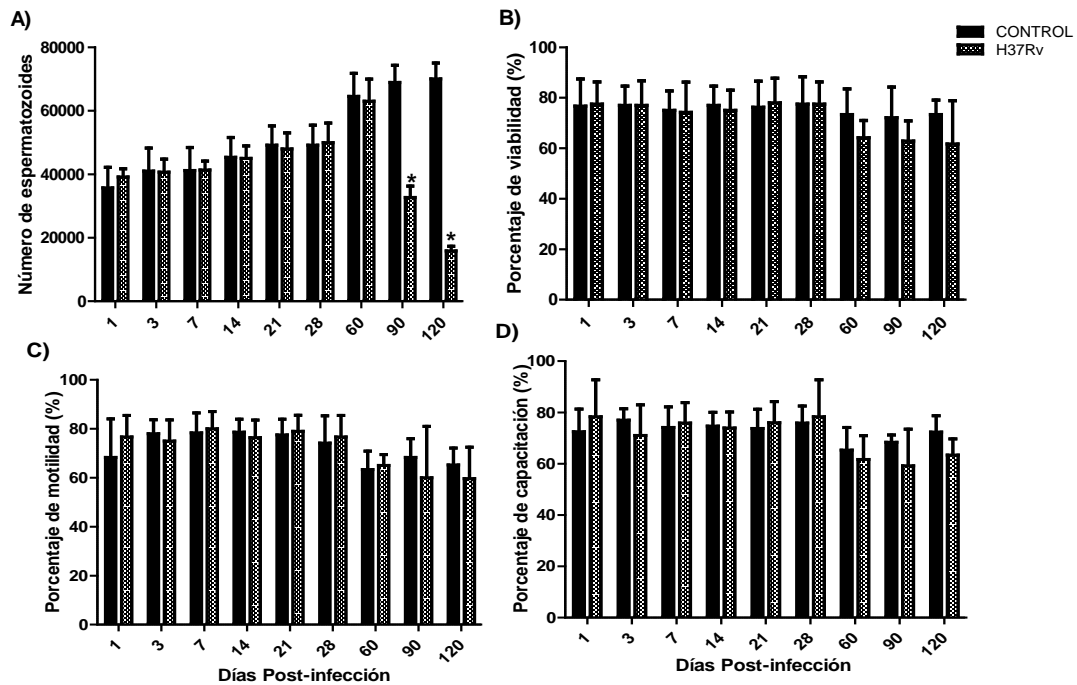
La determinación de testosterona sérica mostró que en los animales infectados con H37Rv por vía intratraqueal se presenta una tendencia a la disminución de las concentraciones de testosterona comparando con controles sanos (Figura 18). La disminución en las concentraciones de testosterona se hizo estadísticamente significativa hasta el día 120 post-infección.



**Figura 18.** Las concentraciones de testosterona en suero de ratones infectados con H37Rv y de ratones control (pg/ml). Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo, P<0.05). Se observó una disminución estadísticamente significativa en el día 120 post-infección.

### **6.1.7 Efecto de la infección pulmonar con H3Rv sobre la calidad espermática**

Realizamos espermiogramas en los ratones con TB activa porque de manera relativamente indirecta nos proporcionaría información acerca de la funcionalidad del testículo. Nos basamos en que el proceso de espermatogénesis implica proliferación, diferenciación y mantenimiento celular, así como la cooperación de las células de Leydig y Sertoli para lo que se requiere el funcionamiento correcto del testículo. Al analizar la calidad espermática de los ratones infectados con H37Rv se encontró que hubo alteraciones significativas por la infección. Como se muestra en la Figura 19A, el recuento de espermatozoides disminuyó drásticamente a partir del día 90 post-infección. El efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el número de los espermatozoides empeoró significativamente en el día 120 post-infección ya que en ratones infectados sólo se encontró un tercio de los valores hallados en los controles. Sin embargo, en los demás parámetros que se evaluaron relativos a la calidad espermática, como viabilidad, motilidad y capacitación espermática, no se encontraron cambios durante el curso del estudio (Figuras 19B, 19C Y 19D).



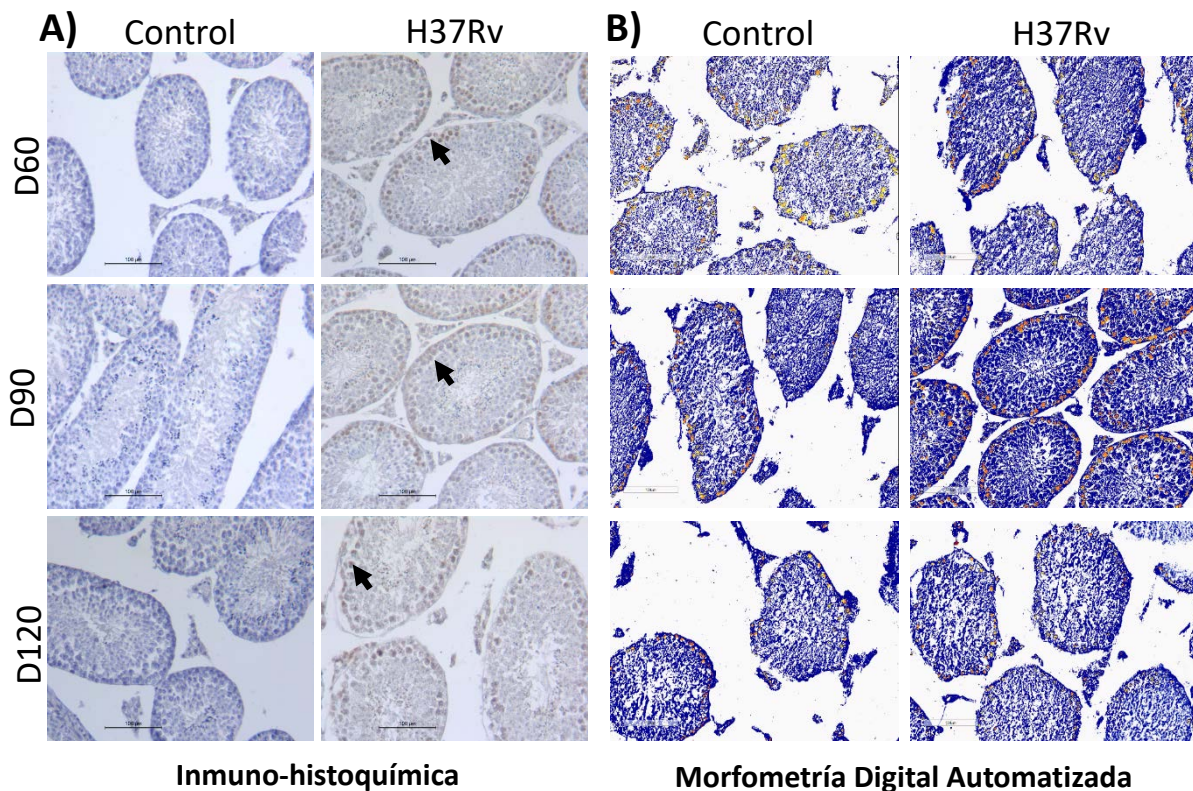
**Figura 19.** Evaluación de la calidad espermática de ratones infectados con H37Rv vía intratraqueal. A. Número de espermatozoides en animales infectados comparados con su control. B. Porcentaje de viabilidad espermática en ratones infectados comparados con su control. C. Porcentaje de motilidad espermática en ratones infectados y ratones control. D. Porcentaje de capacitación de espermatozoides de ratones infectados y ratones control. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo,  $P < 0.05$ ).

### 6.1.8 La Expresión de citocinas en testículos por inmuno-histoquímica (IHQ)

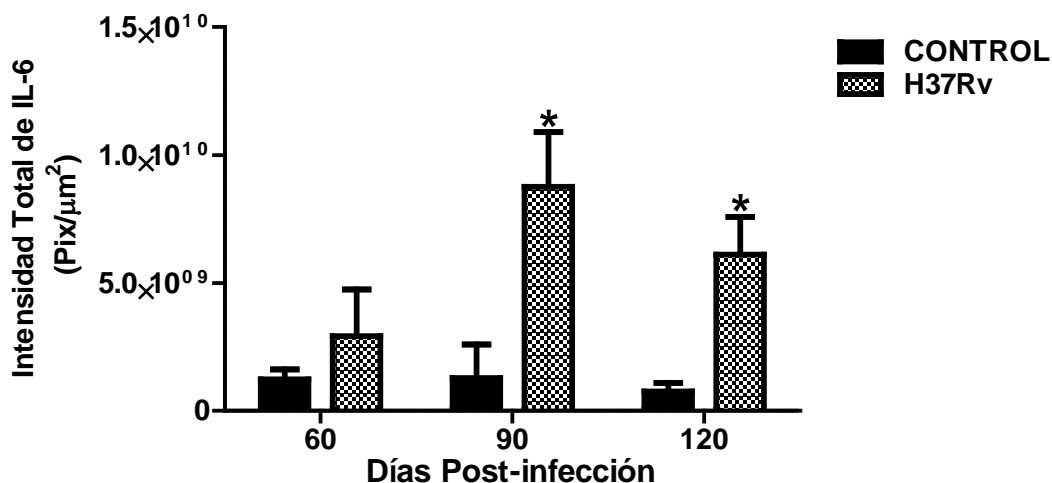
Debido a que en testículos no encontramos alteración histológica perceptible, se analizaron las citocinas pro-inflamatorias que se encuentran relacionadas con el funcionamiento del testículo, tales como IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ .

#### 6.1.8.1 Interleucina 6 (IL-6)

Se observó que la expresión de IL-6 en testículo se presentó en las células de Sertoli, macrófagos intersticiales y en algunas espermatogonias (Figura 20). Al cuantificar la expresión de IL-6 mediante la morfometría digital automatizada observamos que los animales con TB activa tienen mayor expresión de estas citocinas con respecto a los controles y que la misma se incrementa conforme avanza la enfermedad (Figura 21).



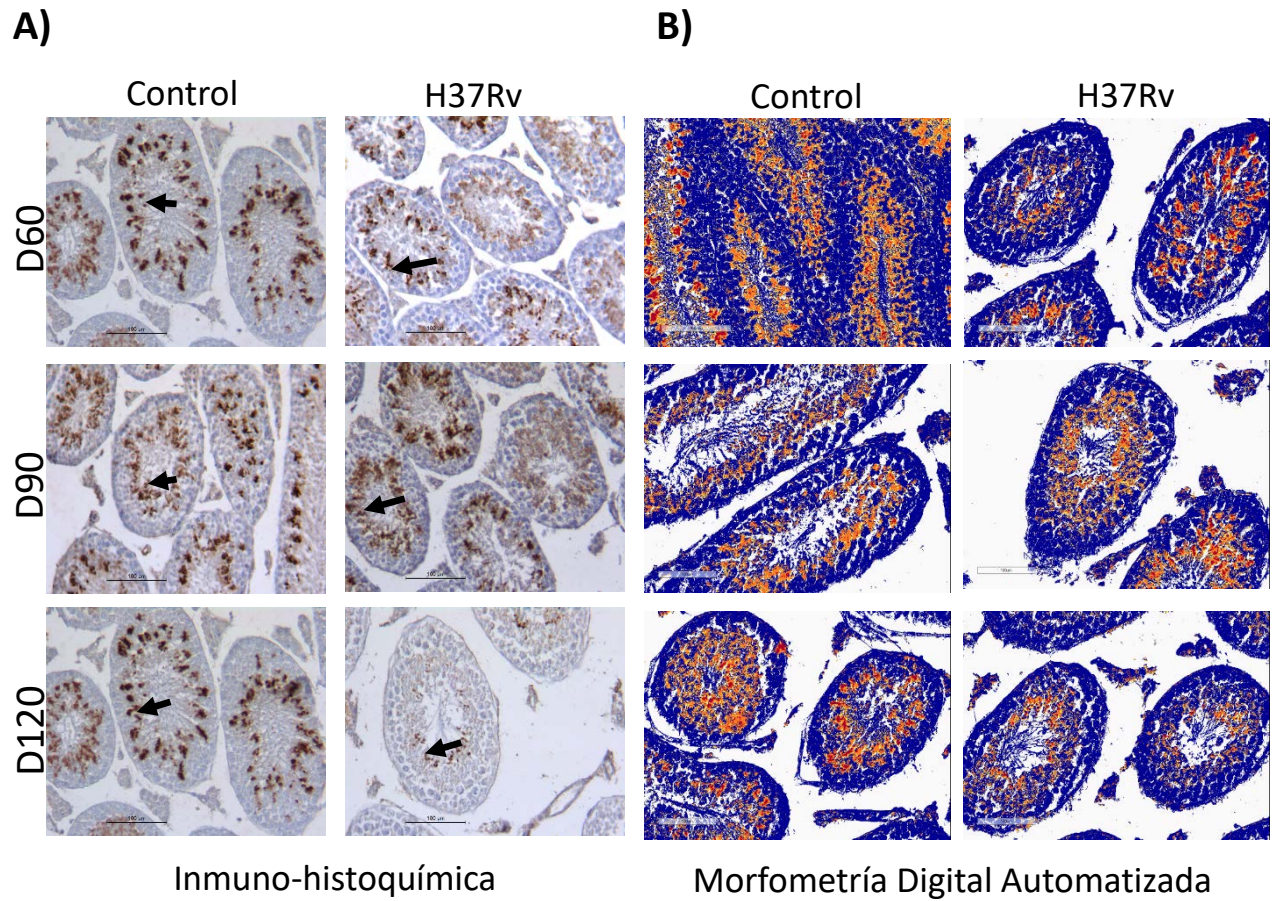
**Figura 20.** Inmuno-histoquímica y morfometría digital automatizada de la expresión de IL-6 en tejido testicular de ratones infectados con H37Rv y controles. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. La tinción positiva para IL-6 se encontró en células de Sertoli, macrófagos intersticiales y algunas espermatogonias. A) Inmuno-histoquímica. B). Morfometría Digital automatizada. Objeto 20X.



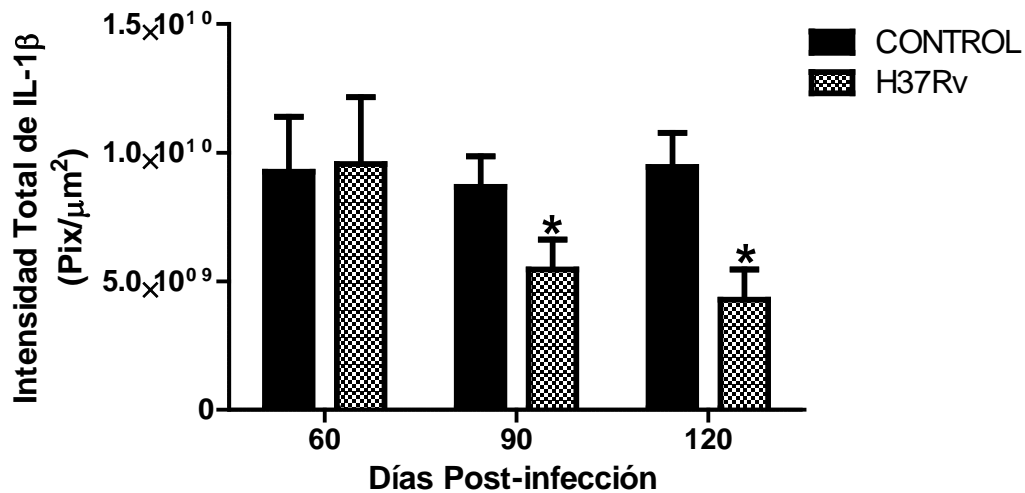
**Figura 21.** Cuantificación de la expresión de IL-6 por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo, P<0.05).

#### 6.1.8.2 Interleucina 1B (IL-1B)

Al realizar la inmunohistoquímica para IL-1B en tejido de testículo de ratón infectado con H37Rv y controles se detectó tinción positiva con la misma intensidad en las espermatogonias y espermatozoides en ambos grupos (Figura 22). La expresión de IL-1B en testículo de ratones con TB activa disminuyó con respecto a lo observado en ratones sanos como se observó en la cuantificación por morfometría digital automatizada (Figura 23).



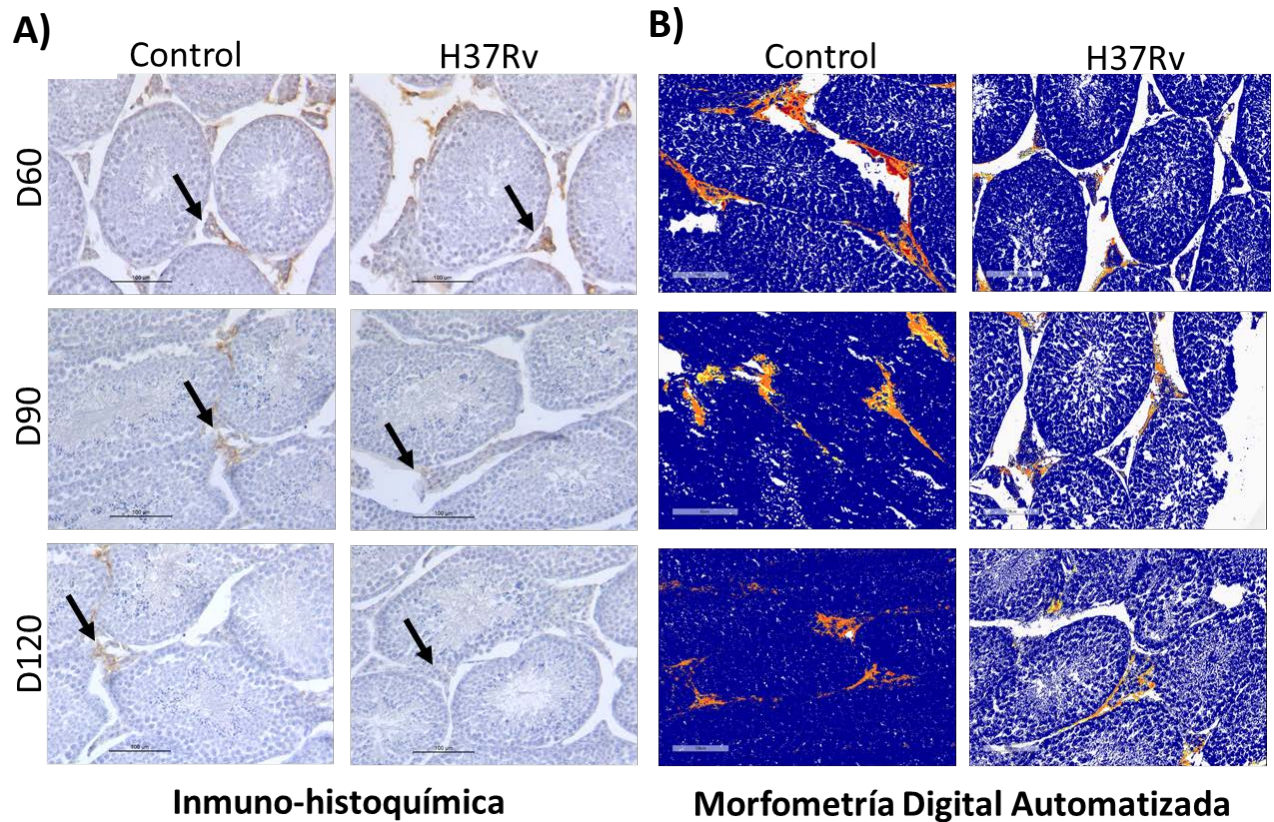
**Figura 22.** Expresión de IL-1 $\beta$  en testículos de ratones infectados con H37Rv y controles. Secciones de tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv y control. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. La tinción positiva para IL-1 $\beta$  se encontró en espermatogonias y espermatozoides. A) Inmuno-histoquímica. B) Morfometría Digital Automatizada. Objetivo 20X.



**Figura 23.** Cuantificación de la expresión de IL-1 $\beta$  por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo, P<0.05).

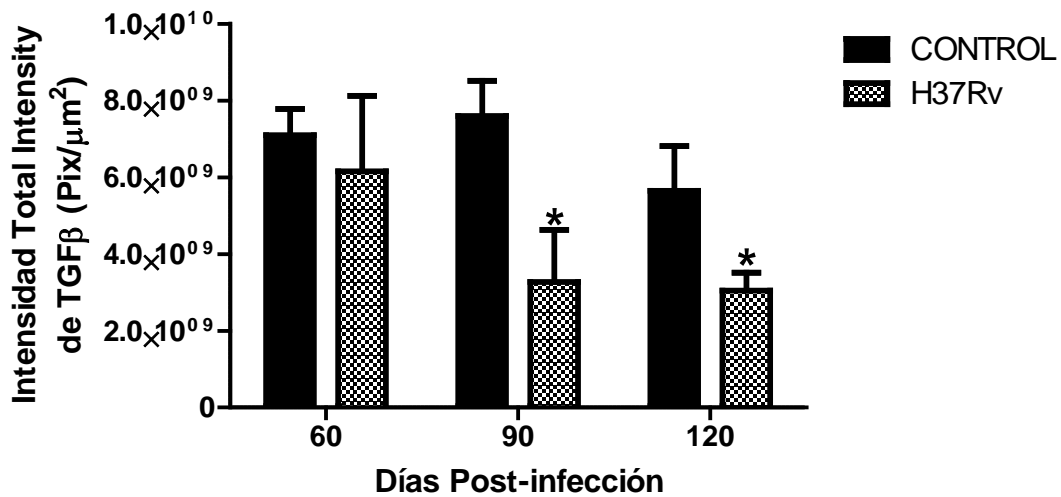
### 6.1.8.3 Factor de crecimiento transformante Beta (TGF-B)

Al determinar la expresión de TGF- $\beta$  en testículo de ratón infectado con H37Rv se encontró que esta citocina está presente en las células de Leydig, tanto en el grupo infectado como en el control. Sin embargo, en los ratones infectados la tinción positiva disminuyó conforme progresaba la enfermedad (Figura 24A). La cuantificación de TGF- $\beta$  por morfometría digital automatizada mostró que la expresión de esta citocina disminuye con el avance de TB (Figura 24B y 25).



**Figura 24.** Determinación de la expresión de TGF- $\beta$  en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv y controles sanos por vía intratraqueal. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. La tinción positiva para TGF- $\beta$  se encontró en células de Leydig en ambos grupos pero la morfometría digital automatizada (17B) indicó que la expresión de TGF- $\beta$  disminuye conforme avanza la infección pulmonar. Objetivo 20X.

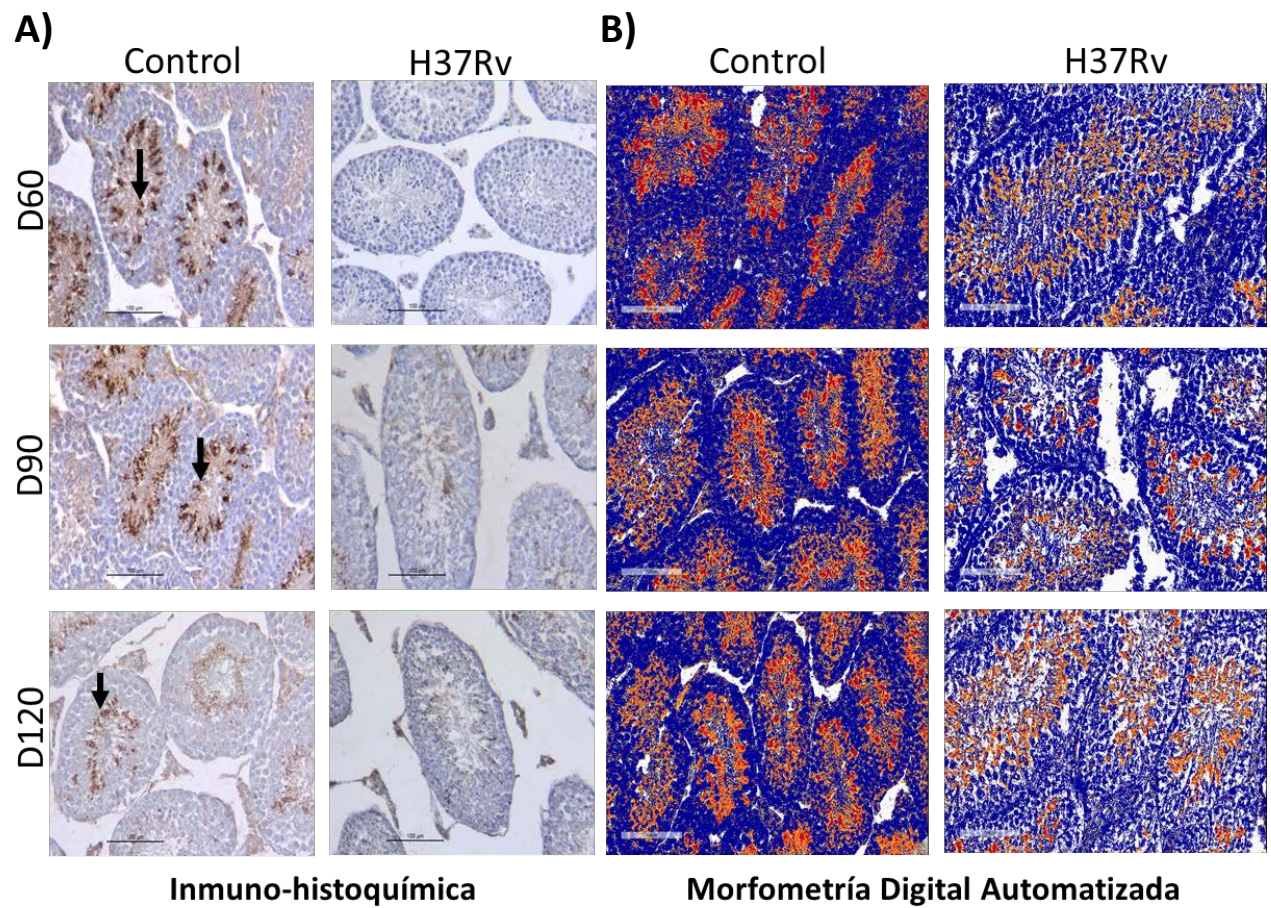




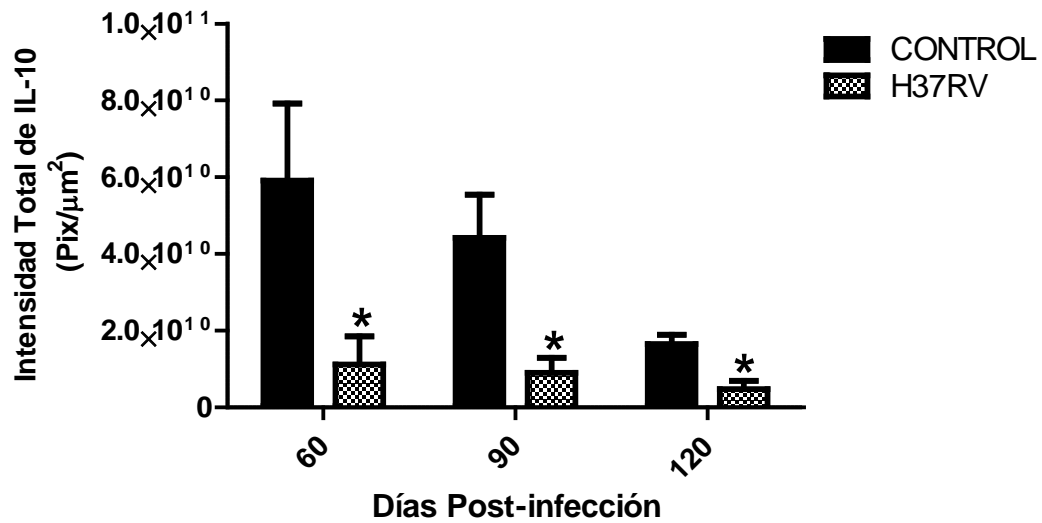
**Figura 25.** Cuantificación de la expresión de TGF-β por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos. Cada barra representa la media ± DE (n=12 animales por grupo, P<0.05).

#### 6.1.8.4 Interleucina 10 (IL-10)

La expresión de IL-10 en tejido testicular presentó tinción positiva en las espermatogonias y espermatozoides en ambos grupos. Sin embargo, se observó una menor intensidad en la tinción en el grupo infectado con H37Rv (Figura 26A). La cuantificación de la expresión de IL-10 mostró la disminución en la expresión en los ratones con TB activa (Figura 26B y 27).



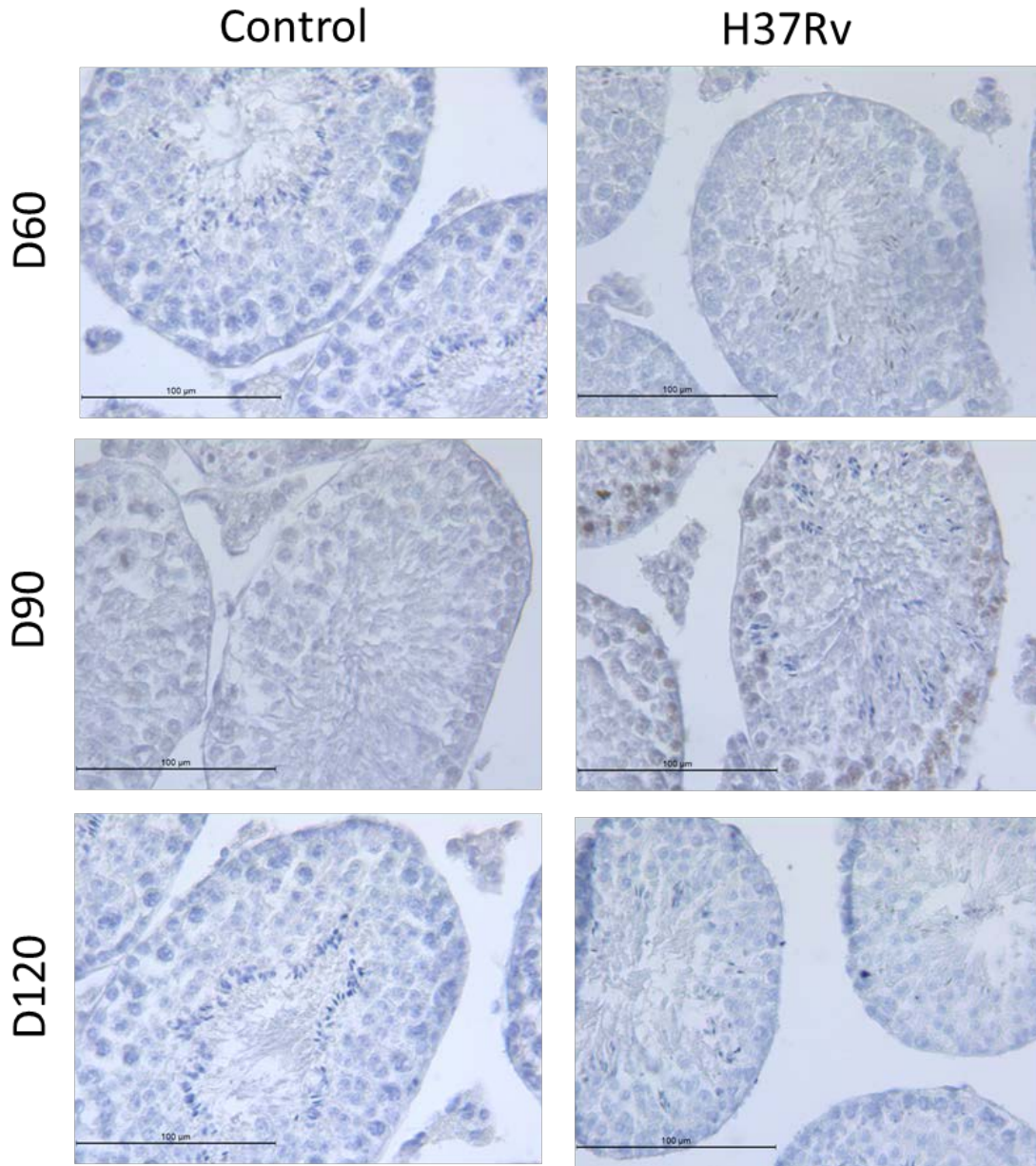
**Figura 26.** Expresión de IL-10 en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal. Secciones de tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv y control. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. La tinción positiva para IL-10 se encontró en espermatogonias y espermatozoides aunque fue menor en los testículos de ratones infectados. A) Inmuno-histoquímica. B) Morfometría digital automatizada. Objetivo 20X.



**Figura 27.** Cuantificación de la expresión de IL-10 por morfometría digital automatizada en los testículos de ratones infectados y sanos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo, P<0.05).

#### 6.1.8.5 Factor de necrosis tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )

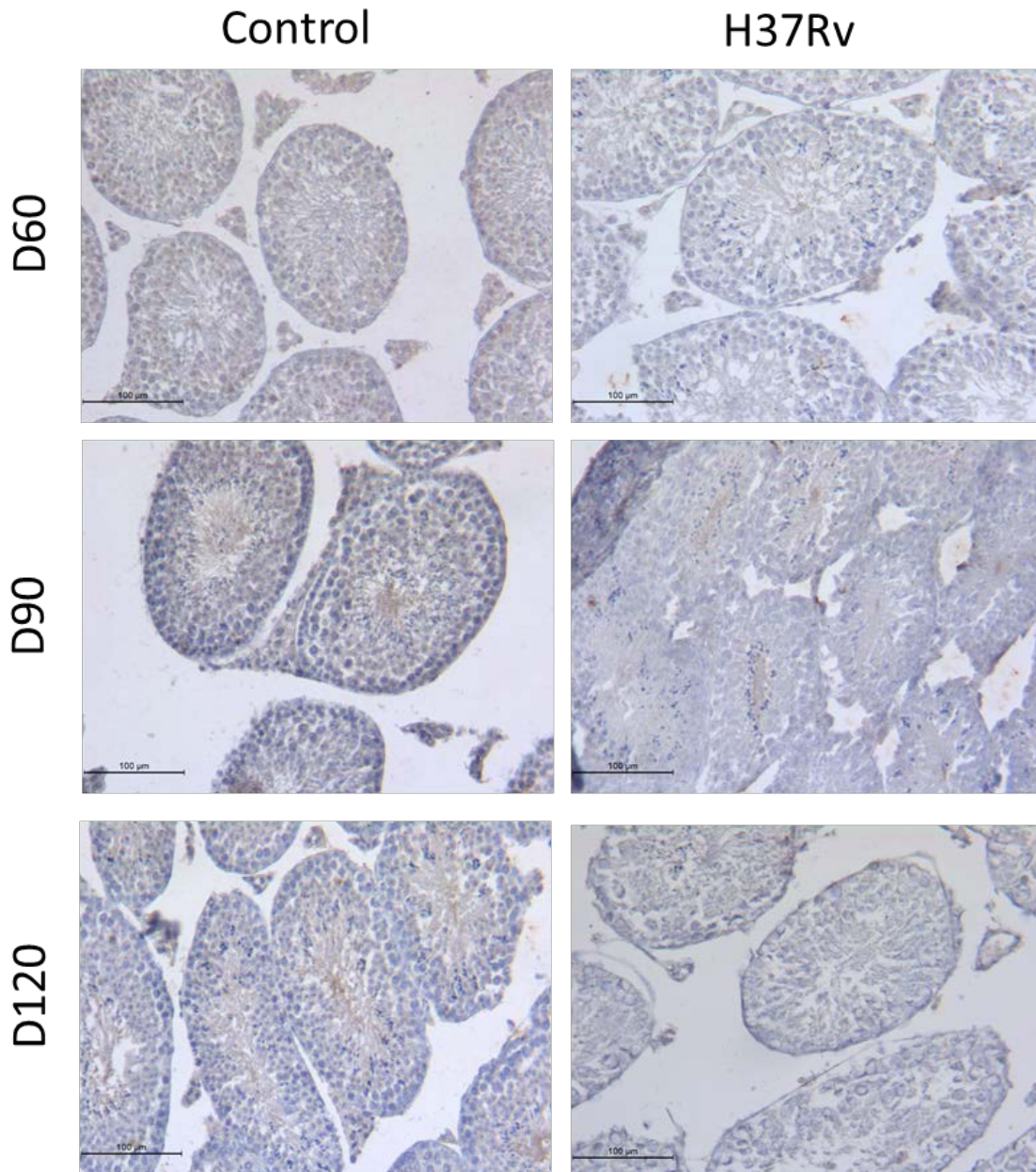
Se estudió la expresión de TNF- $\alpha$  en testículos de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal y ratones control. No se encontró expresión de dicha citocina mediante las técnicas de inmunohistoquímica (Figura 28).



**Figura 28.** Expresión de TNF- $\alpha$  en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal. Secciones de tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv y control. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. No se observó tinción positiva para TNF- $\alpha$  en ninguno de los elementos que conforman el tejido testicular. Aumento 40X.

### 6.1.8.6 Interferón Gamma (INF- $\gamma$ )

Se determinó la expresión de INF- $\gamma$  en testículos de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal y ratones control. No se encontró expresión de dicha citocina mediante las técnicas de inmunohistoquímica (Figura 29).



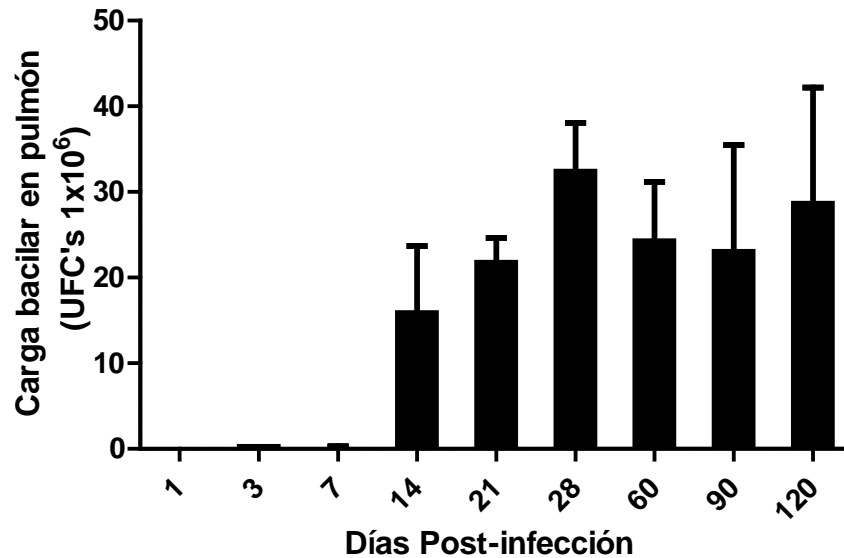
**Figura 29.** Expresión de INF- $\gamma$  en tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv por vía intratraqueal. Secciones de tejido de testículo de ratones infectados con H37Rv y control. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. No se observó tinción positiva para INF- $\gamma$  en ninguno de los elementos que conforman el tejido testicular. Aumento 20X.

## **6.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN PULMONAR CON *Mycobacterium tuberculosis* EN ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE RATONES HEMBRA**

### **6.2.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC's) en pulmones infectados con H37Rv así como en ovario, trompas y útero**

Para determinar que las ratonas que utilizamos solo presentan tuberculosis pulmonar y para corroborar que la bacteria no se diseminó a los órganos de nuestro interés, realizamos la determinación de UFC's en estos tejidos. Efectivamente, sólo encontramos la presencia de la bacteria en pulmón, mientras que en los otros tejidos no se detectó a MTB, por lo que esto nos señala que nuestros animales solo están en el curso de tuberculosis pulmonar.

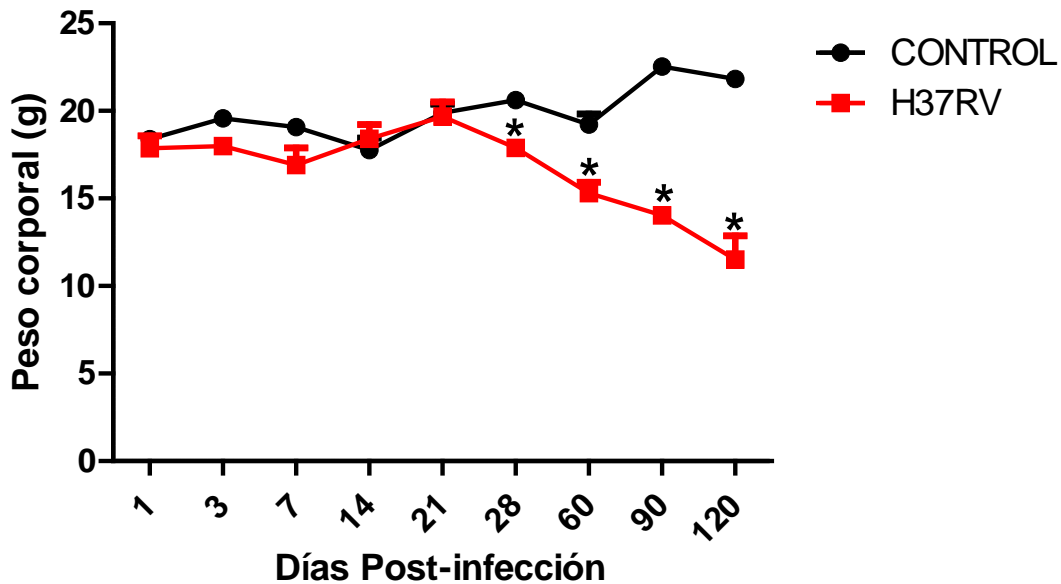
En la Figura 30 mostramos como en el pulmón de ratonas infectados con H37Rv se incrementa el número de UFC's conforme avanza la enfermedad. Es interesante observar que en los primeros 7 días de infección parece ser que el organismo del ratón trata de controlar el crecimiento bacteriano, sin embargo este control no se sostiene, ya que a partir del día 14 post-infección se incrementa bruscamente el número de colonias de H37Rv en pulmón. Cuando se cuantificó la cantidad de bacterias que hay en los pulmones de ratonas fue evidente que es un número menor al que se presenta en los machos. Esto nos indica que las hembras pueden controlar de una forma más efectiva que los machos el crecimiento bacteriano.



**Figura 30.** Carga bacilar en pulmón de ratonas infectadas con H37RV y controles sanos. Las ratonas fueron infectadas vía intratraqueal con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y fueron sacrificadas en cada uno de los días indicados después de la infección. Los pulmones (n=8 pulmones por grupo) fueron usados para la determinación de unidades formadoras de colonias.

### 6.2.2 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el peso corporal de las ratonas

Para investigar si la infección pulmonar con H37RV afectaba al peso corporal de las ratonas, las ratonas fueron pesadas antes de ser sacrificadas en cada uno de los tiempos establecidos. Los resultados no muestran cambios significativos en el peso en los primeros días de la infección, es decir en la etapa temprana de la enfermedad. Sin embargo, en el día 28 post-infección las ratonas infectadas comienzan a perder peso comparando con los controles, esta diferencia se hace estadísticamente significativa a partir de este tiempo de sacrificio, es decir en la etapa tardía de la enfermedad (Figura 31). Las hembras pierden más rápido el peso que los machos con TB activa.



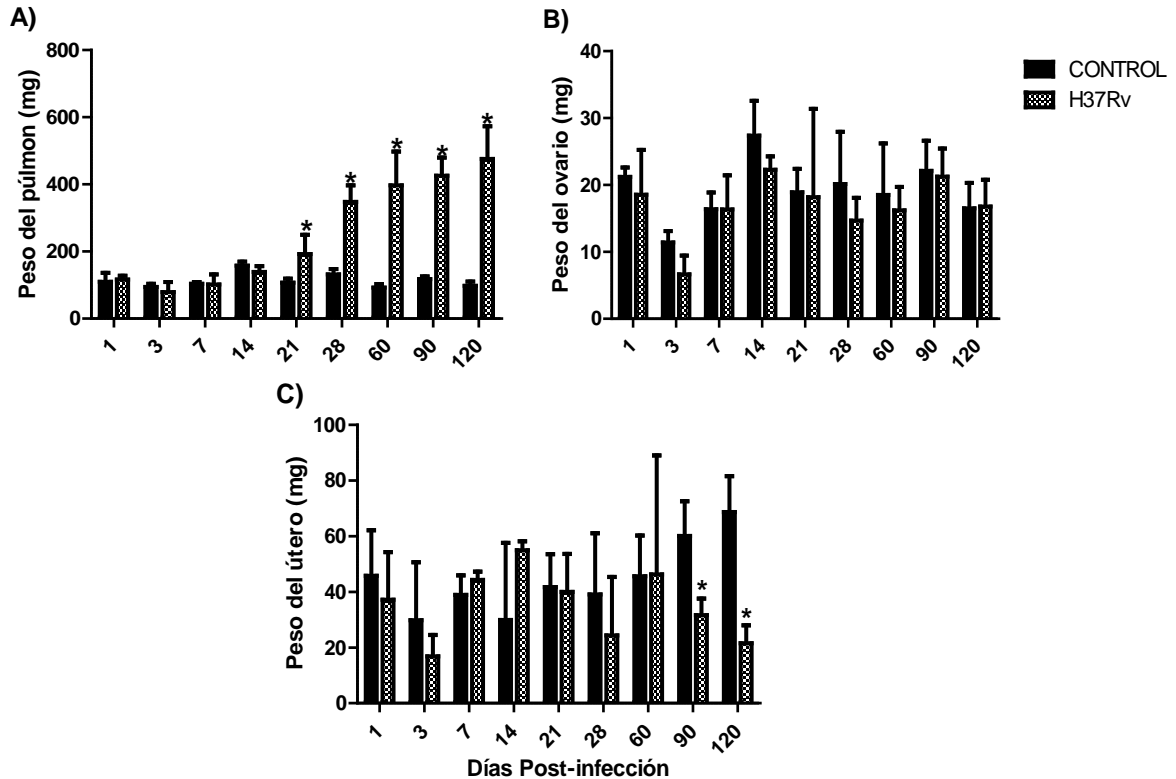
**Figura 31.** Peso corporal de ratonas con tuberculosis pulmonar (H37Rv) y animales sanos como control. Cada punto representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo,  $P < 0.05$ ). Se encontraron diferencias significativas en el peso corporal de los ratones infectados con H37Rv con respecto a sus controles en la etapa tardía de la enfermedad.

### 6.2.3 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el peso del pulmón y de los órganos sexuales femeninos

Después de 21 días de la infección de H37Rv en las ratonas, los pulmones de ratonas infectadas comenzaron a pesar más con respecto a los animales controles (Figura 32A). Esto se debe al crecimiento bacteriano dentro del pulmón y al infiltrado celular que se presenta por la respuesta inmune. Comparando el peso del pulmón de los machos y las hembras encontramos que las hembras logran contener mejor el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, al determinar el peso de los órganos reproductivos encontramos que el útero de las ratonas con tuberculosis pulmonar es más pequeño con respecto al útero de ratonas control después del día 90 post- infección, esta diferencia entre los animales infectados y controles va aumentando conforme progresa la enfermedad (Figura 32C). Sin embargo, los ovarios de ratonas infectadas no presentaron alteraciones en el peso con respecto a los controles (Figura 32B).

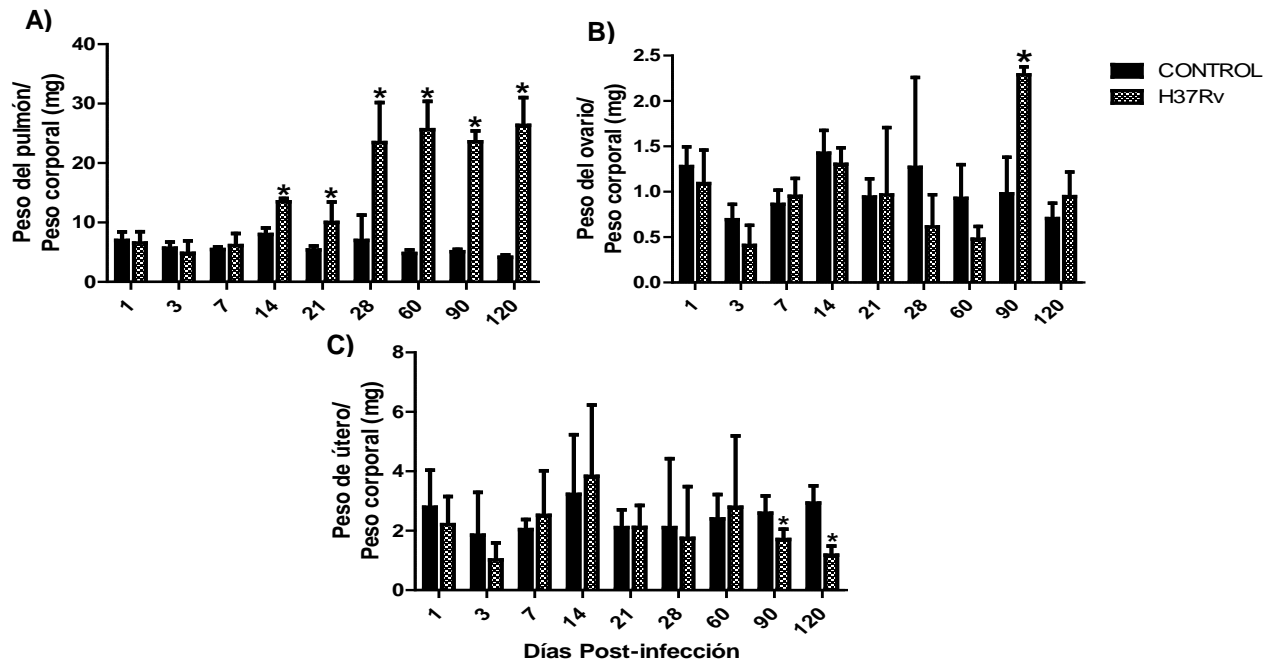




**Figura 32.** Peso del pulmón y órganos sexuales femeninos de ratonas en el curso de tuberculosis pulmonar con H37Rv. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo,  $P < 0.05$ ). **A. Peso del pulmón.** Se observó un incremento significativo en el peso de los pulmones de ratonas infectadas con H37Rv respecto a sus controles conforme progresa la enfermedad a partir del día 28 post-infección. **B. Peso del ovario.** No se observaron diferencias entre las ratonas infectadas y los controles en ningún tiempo de la enfermedad. **C. Peso del útero.** Se encontró una disminución en el peso del útero de ratonas con tuberculosis pulmonar respecto a los controles en los días 90 y 120 post-infección.

#### 6.2.4 Corrección del peso de los órganos por el peso corporal de ratonas en el curso de tuberculosis pulmonar

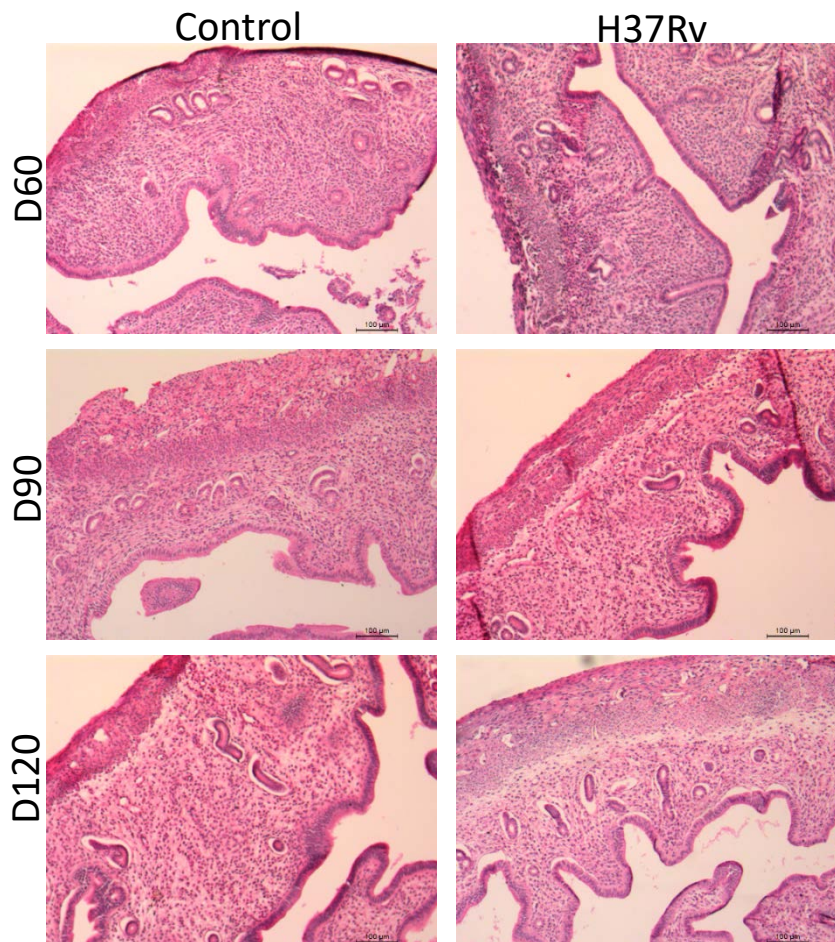
Al realizar la corrección del peso de los órganos de animales en el curso de TB activa con respecto al peso corporal encontramos que el peso del pulmón se incrementa a partir del día 14 post-infección y continua aumentando conforme avanza la enfermedad (Figura 33A). Por otro lado, se hace evidente que el útero pierde peso a partir del día 90 post-infección (Figura 33C). Sin embargo en los ovarios de animales infectados se observa que en el día 90 post-infección son más grandes con respecto a su control (Figura 33B).



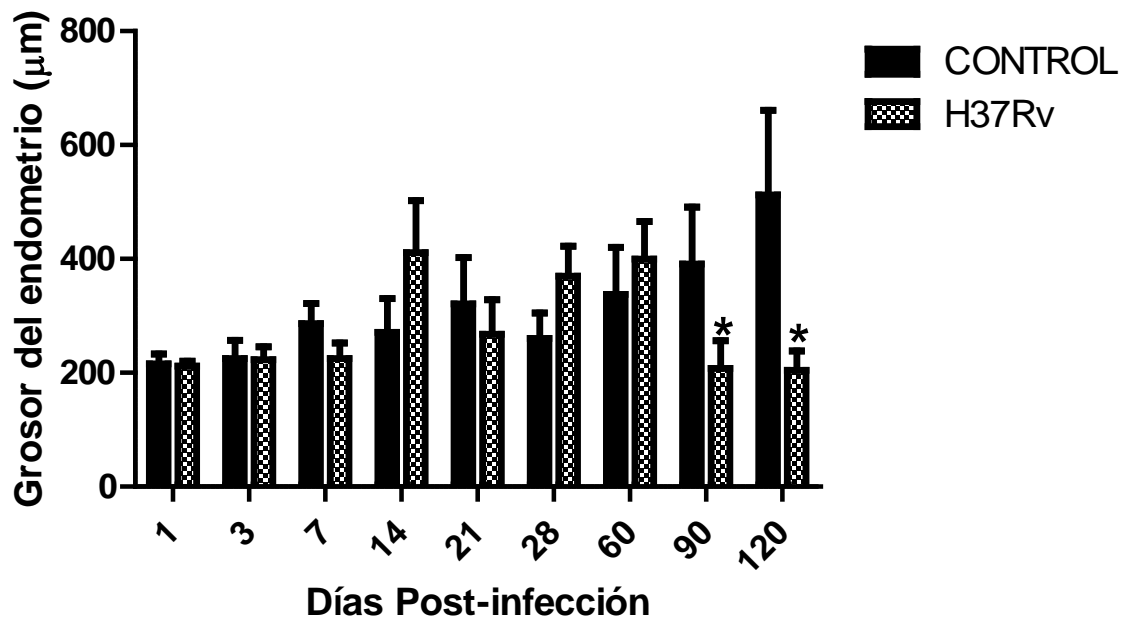
**Figura 33.** Peso de órganos corregido por peso corporal de ratonas en el curso de la TB. **A)** Peso del pulmón corregido por peso corporal de hembras infectadas con H37Rv y ratonas sanas. **B)** Peso de ovario corregido por el peso corporal de hembras infectadas y sanas. **C)** Peso de útero corregido por peso corporal de ratonas infectadas y sanas. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupos)\* representa la diferencia estadísticamente significativa. (\*  $p < 0.05$ )

### 6.2.5 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre el grosor del endometrio

En cortes histológicos del endometrio, se puede apreciar que en los tiempos más tardíos de la infección pulmonar la cito-arquitectura del tejido presenta alteraciones. Las micrografías ponen en evidencia que el endometrio de las ratonas con TB activa es más delgado con respecto a su control (Figura 34). Al medir el grosor del endometrio, corroboramos que este órgano se ve comprometido en presencia de infección pulmonar, ya que observamos que disminuye significativamente a partir de los 90 días post-infección (Figura 35).



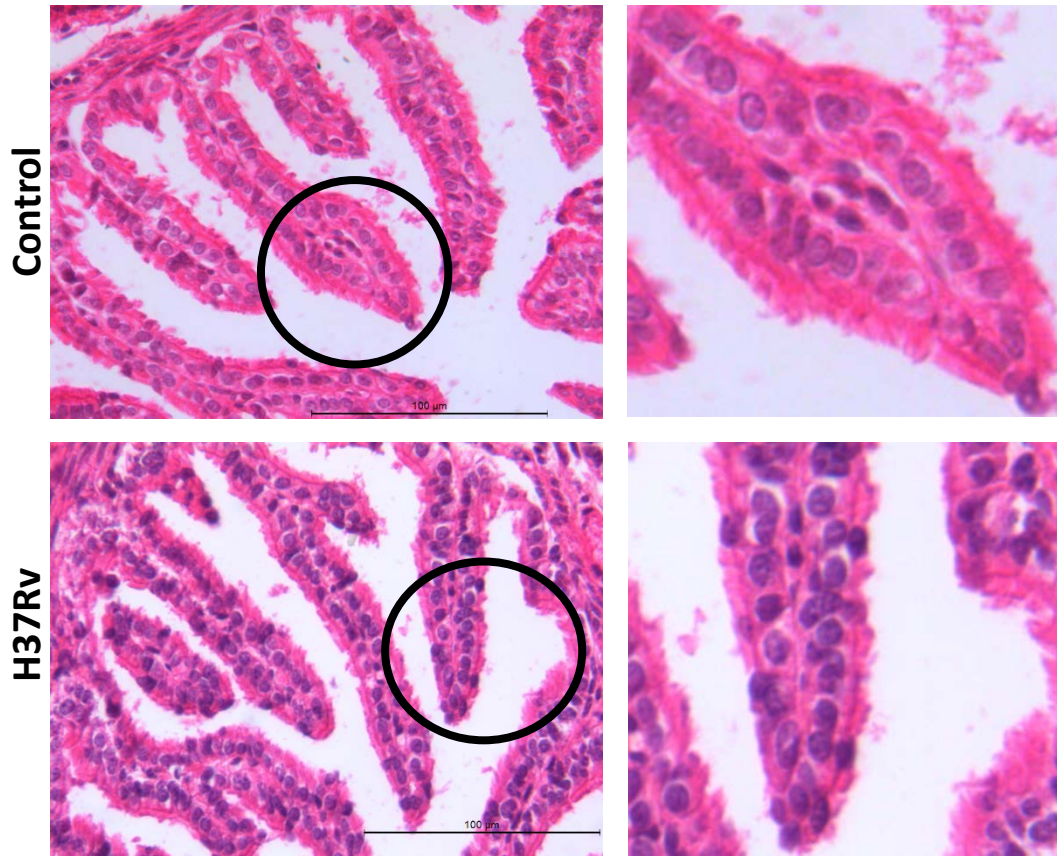
**Figura 34.** Grosor del endometrio del oviducto de ratonas con tuberculosis pulmonar y controles sanos. Micrografías de cortes de útero de ratonas infectadas con H37Rv comparadas con ratonas control teñidas con H&E en los días 60, 90 y 120 post-infección. Aumento 10X.



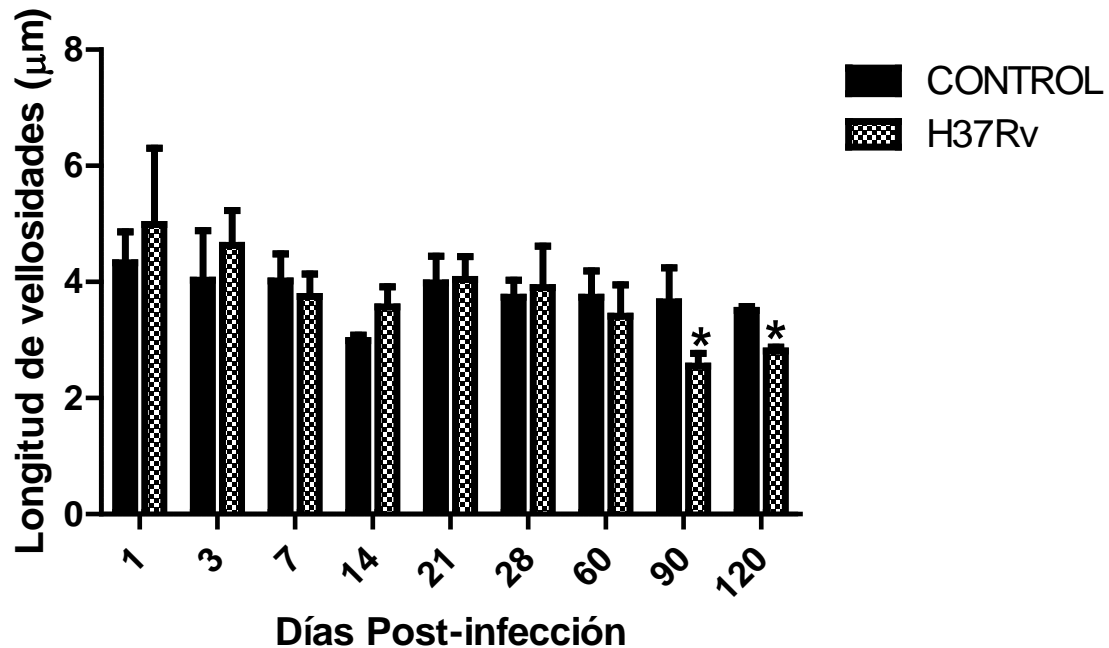
**Figura 35.** Determinación del grosor del endometrio del útero de ratonas con tuberculosis pulmonar comparada con ratonas sanas. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupo,  $P < 0.05$ ).

### 6.2.6 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre la longitud de las microvellosidades ciliadas del oviducto de ratonas

Al realizar cortes histológicos de los oviductos y observarlos al microscopio se observó que las microvellosidades ciliadas presentaban alteraciones, las cuales se acentúan conforme avanza la enfermedad, por lo que se midió su longitud (Figura 36). La longitud de las vellosidades del oviducto de ratonas infectadas con H37Rv fue significativamente menor que en las ratonas control en la etapa tardía de la enfermedad pulmonar, 90 y 120 post-infección (Figura 37).



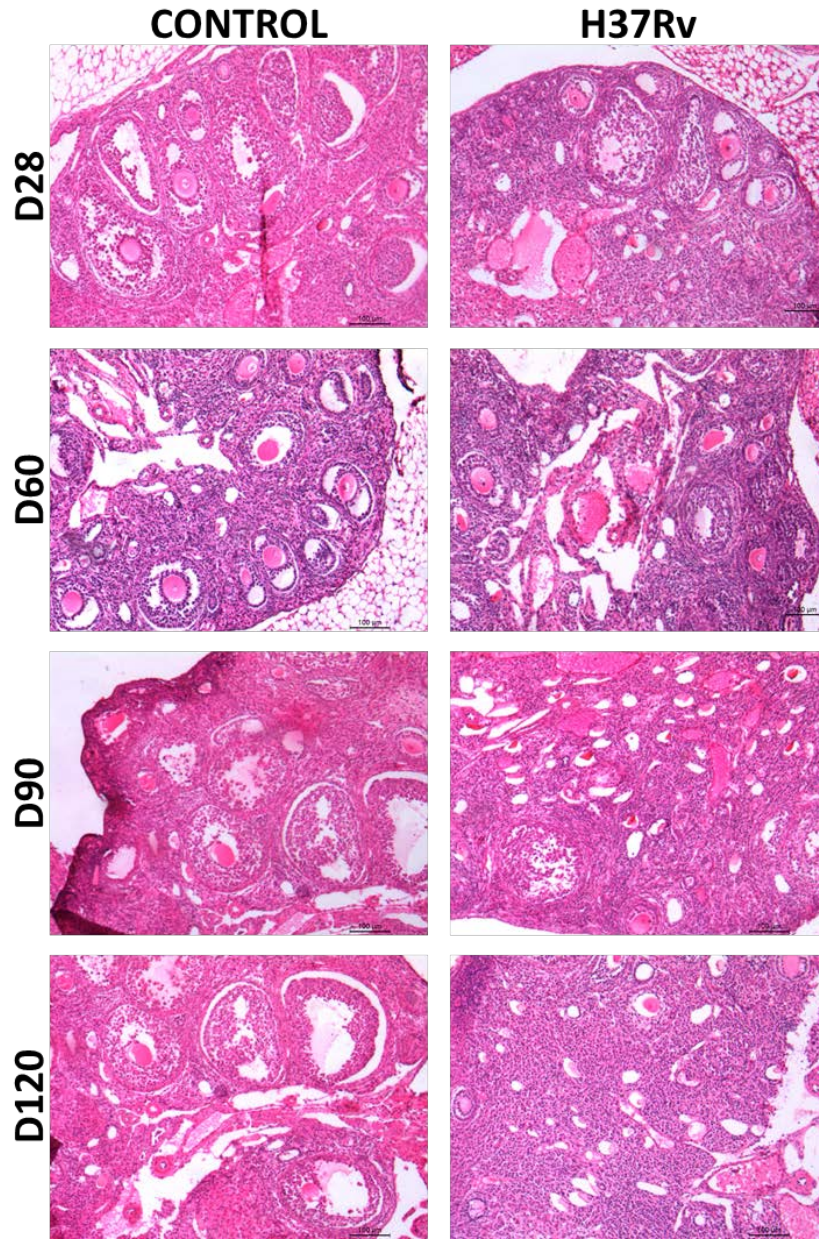
**Figura 36.** Vellosidades del oviducto de ratonas con tuberculosis pulmonar. Micrografías de cortes del oviducto de ratonas infectadas con H37Rv y ratonas control teñidas con H&E en el día 120 post-infección. Aumento 40X y 120X.



**Figura 37.** Longitud de las vellosidades del oviducto de ratones con tuberculosis pulmonar comparada con ratonas sanas. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupo,  $P < 0.05$ ).

### 6.2.7 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre la histopatología del ovario

La histopatología de los ovarios de ratonas infectadas con H37Rv mostró que la infección pulmonar altera la cito-arquitectura del tejido, alteración que se acentúa conforme avanza la enfermedad hasta inducir atrofia de ovario como se puede observar en la Figura 38.

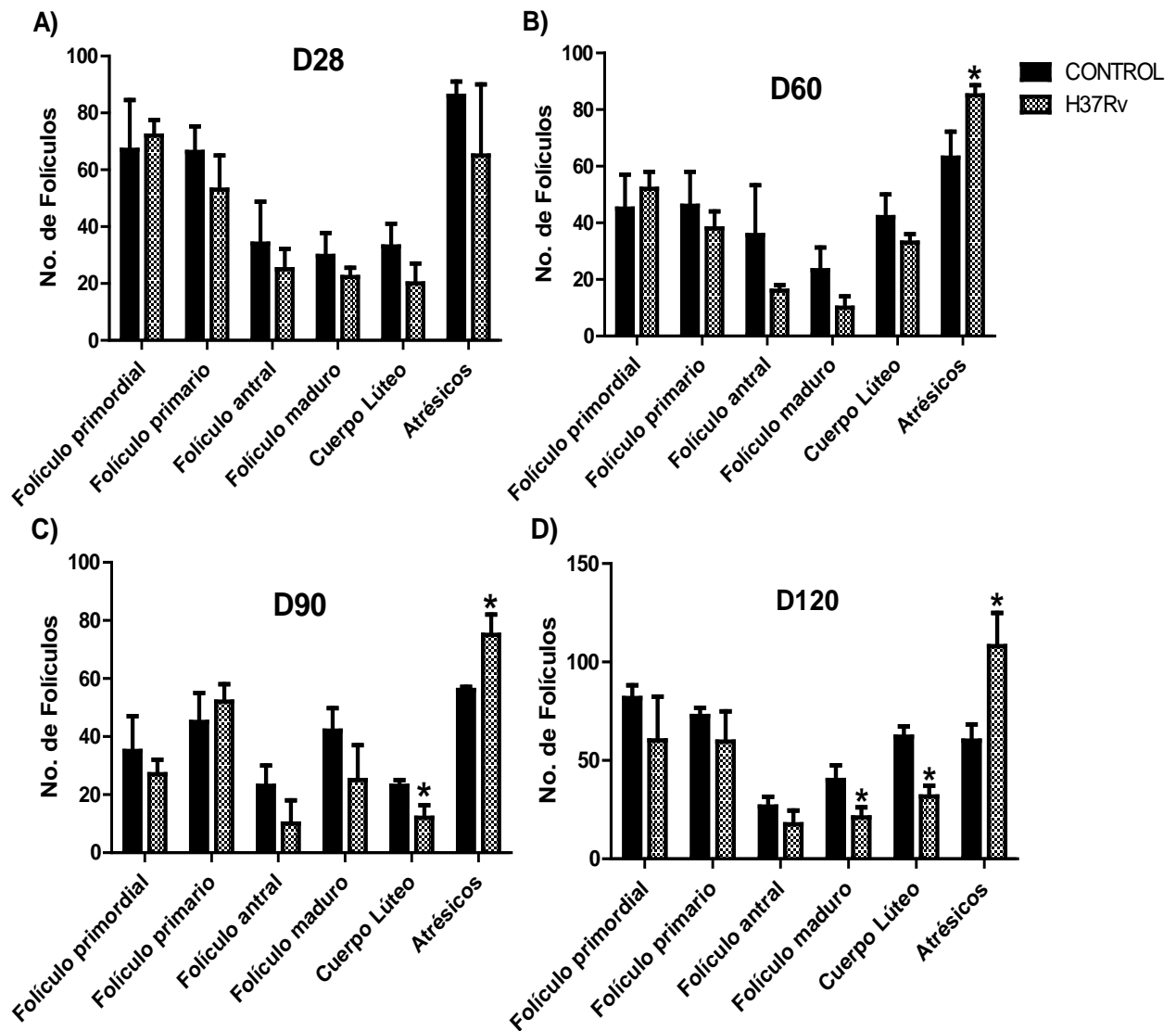


**Figura 38.** Micrografías de cortes de ovario de ratonas infectadas con H37Rv y controles teñidos con H&E en los días 28, 60, 90 y 120 post-infección. Aumento 10X.

### **6.2.8 Efecto de la infección pulmonar con H37rv sobre el número de folículos ováricos**

Para determinar el número de folículos se contaron los folículos primordiales, primarios, antrales, maduros, los cuerpos lúteos y los folículos atrésicos. Se observó que hasta el día 28 post-infección (Figura 39A) no se detectaron alteraciones en el número de ningún tipo de folículo. Sin embargo, en el día 60 post-infección (Figura 39B) se observó un aumento significativo en el número de folículos atrésicos en las ratonas infectadas. En el día 90 post-infección (Figura 39C), se encontró una disminución en el número de cuerpos lúteos y un aumento en los folículos atrésicos. En el día 120 post-infección (Figura 39D), se observó la disminución de los folículos maduros y cuerpos lúteos y la presencia de un número mayor de folículos atrésicos.

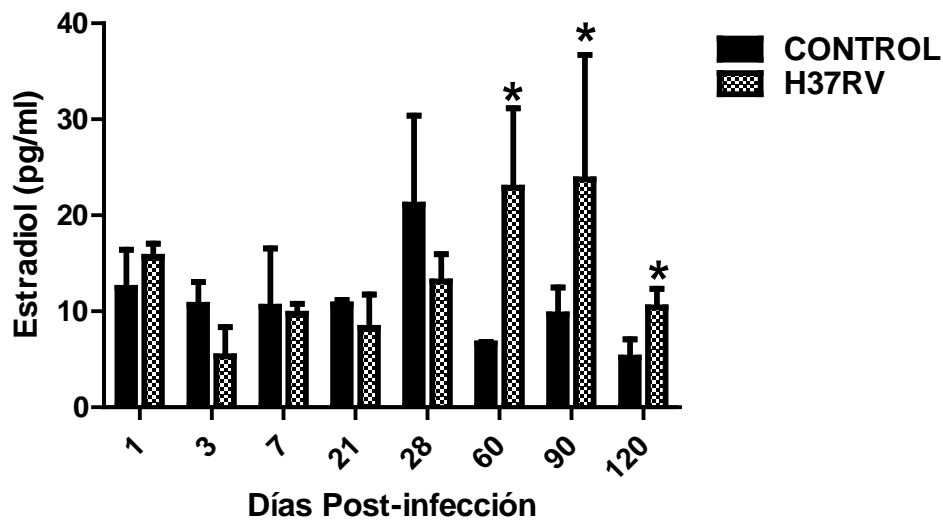




**Figura 39.** Determinación del número de cada tipo de folículo en ovarios de ratonas que cursan tuberculosis pulmonar y controles sanos en diferentes tiempos de infección. A). Número de folículos de ratonas infectadas con H37Rv comparadas con ratonas control en el día 28 post-infección. B). Número de folículos de ratonas infectadas con H37Rv comparadas con ratonas control en el día 60 post-infección. C). Número de folículos de ratonas infectadas con H37Rv comparadas con ratonas control en el día 90 post-infección. D). Número de folículos de ratonas infectadas con H37Rv comparadas con ratonas control en el día 120 post-infección. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupo, P<0.05)

### 6.2.9 Efecto de la infección pulmonar con H37Rv sobre las concentraciones de estradiol en suero

Las concentraciones de estradiol en suero de animales infectados con H37Rv por vía intratraqueal indicó que las concentraciones de estradiol aumentan significativamente en las ratonas en el curso de la infección pulmonar en los tiempos tardíos de la enfermedad; es decir, en los días 60, 90 y 120 post-infección (Figura 40).



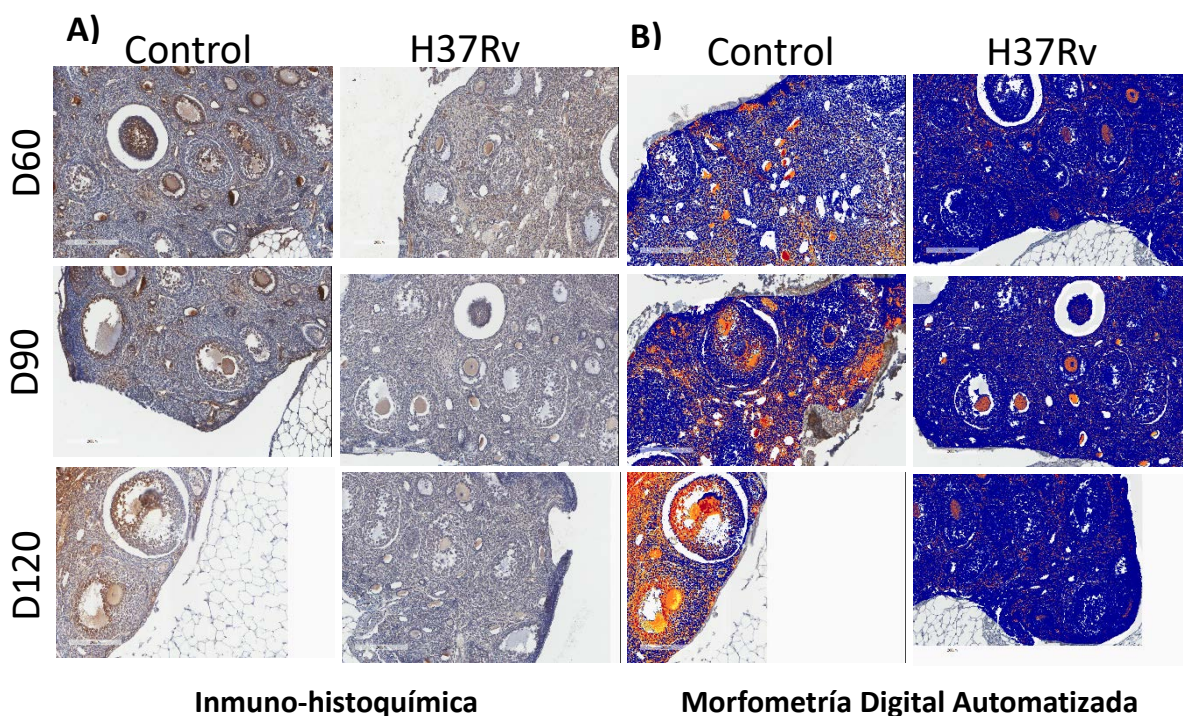
**Figura 40.** Las concentraciones de estradiol en suero de ratonas infectadas con H37Rv y en ratonas control (pg/ml). Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 por grupo, P<0.05). Se observó que existe el aumento de las concentraciones de estradiol en el suero de ratonas infectadas comparadas con el respectivo control.

### 6.2.10 Expresión de citocinas en ovarios por inmuno-histoquímica (IHQ)

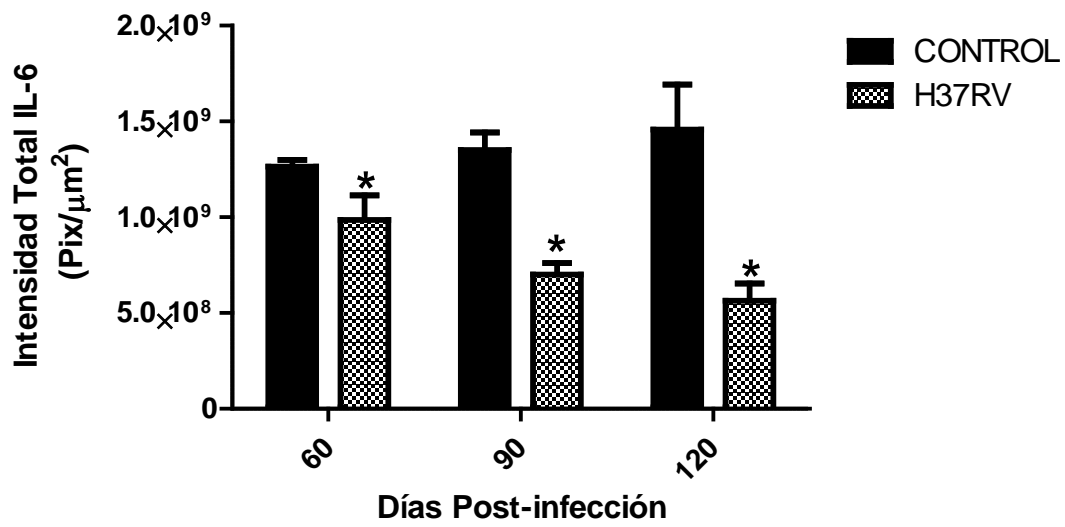
Se analizaron las citocinas pro-inflamatorias que se encuentran relacionadas con el funcionamiento del ovario, específicamente en el rompimiento de la membrana folicular durante el proceso de ovulación, tales como IL-6 y IL-1 $\beta$ .

#### 6.2.10.1 Interleucina 6 (IL-6)

Al realizar la inmunohistoquímica de IL-6 en cortes de ovario encontramos que las ratonas con TB activa y los controles expresan esta citocina. La expresión de IL-6 en ovario se presenta en las células de la granulosa (Figura 41). Al cuantificar la expresión de IL-6 mediante morfometría digital automatizada encontramos que los animales con TB activan tienen menor expresión con respecto a los controles y que disminuye conforme avanza la enfermedad (Figura 42).



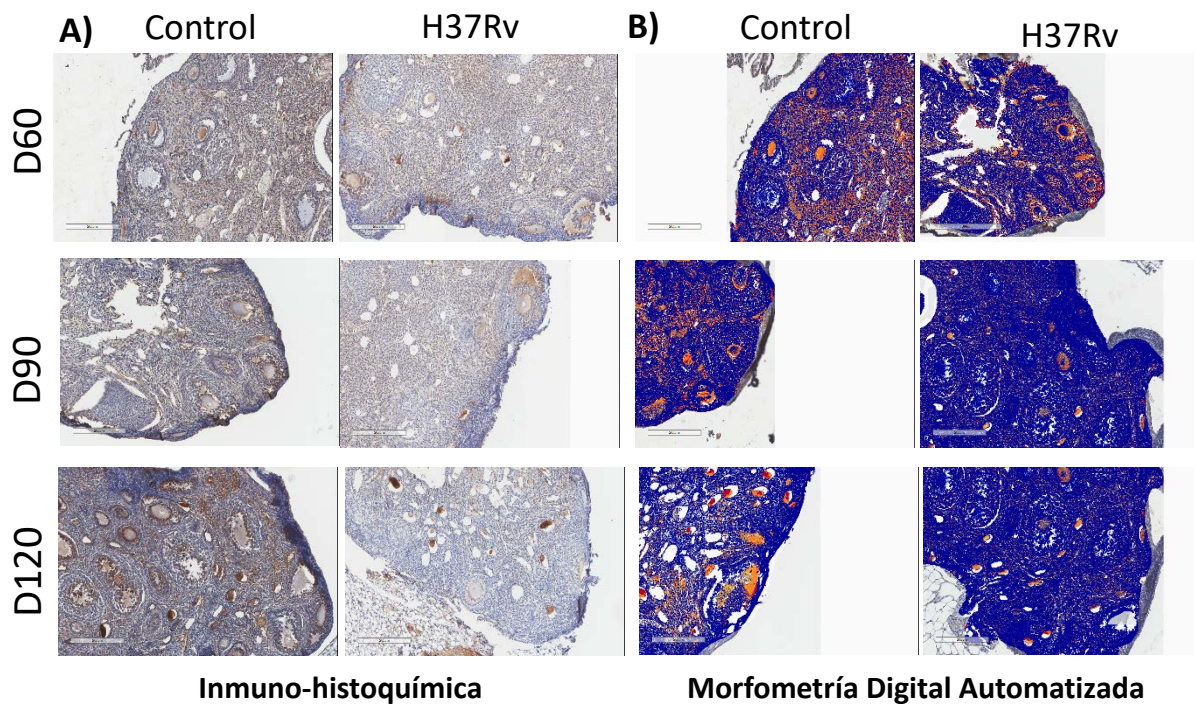
**Figura 41.** Determinación de la expresión de IL-6 en tejido de ovario de ratonas infectadas con H37Rv por vía intratraqueal. Secciones de tejido de ovario de ratonas infectadas con H37Rv y controles. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. La tinción positiva para IL-6 se encontró en células de la granulosa. A) Inmuno-histoquímica. B) Morfometría digital automatizada. Aumento 20X.



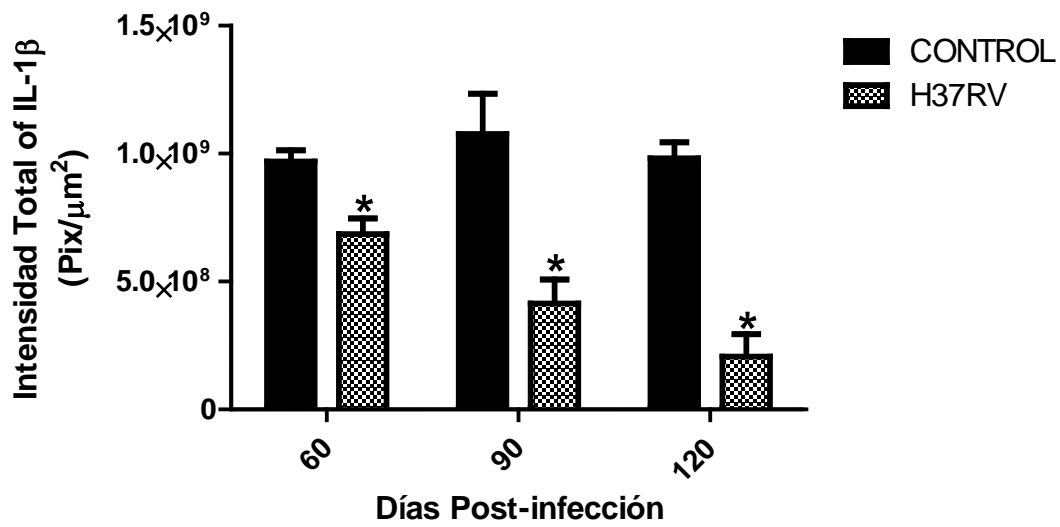
**Figura 42.** Cuantificación de la expresión de IL-6 por morfometría digital automatizada en los ovarios de ratonas infectadas y sanas. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo, P<0.05).

### 6.2.10.2 Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

La inmunohistoquímica para IL-1 $\beta$  en tejido de ovario de ratonas infectadas con H37Rv y controles mostró se detectó expresión en ambos grupos. Sin embargo, la expresión de IL- $\beta$  disminuye conforme avanza la enfermedad (Figura 43). La cuantificación de la expresión de IL-1 $\beta$  en el ovario de ambos grupos por morfometría digital automatizada demostró que la expresión disminuye a partir de los 60 días de infección (Figura 44).



**Figura 43.** Determinación de la expresión de IL-1 $\beta$  en tejido de ovario de ratonas infectadas con H37Rv y controles. Las secciones de tejido se incubaron con un anticuerpo específico para detectar la citocina indicada. La tinción positiva para IL-1 $\beta$  se encontró en las células de la granulosa. A) Inmuno-histoquímica. B) Morfometría digital automatizada. Objetivo 20X.



**Figura 44.** Cuantificación de la expresión de IL-1 $\beta$  por morfometría digital automatizada en los ovarios de ratonas infectadas y sanas. Cada barra representa la media  $\pm$  DE (n=12 animales por grupo, P<0.05).

## 7. DISCUSIÓN

Estudios anteriores han caracterizado varios aspectos del modelo de TB pulmonar en ratones por la administración intratraqueal de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (Hernández-Pando y cols., 1997). En este modelo, hay altas cargas bacilares en los pulmones después de un mes de infección con relativamente pocas micobacterias vivas en el bazo y el hígado, sin crecimiento de bacilos en otros órganos. Sin embargo, en cierta correspondencia con la enfermedad humana, existen anomalías significativas en diversos circuitos neuro-hormonales, como el eje suprarrenal-hipotalámico-hipofisario o el sistema nervioso adrenérgico [Besedovsky y cols., 1996; Hedger y Meinhardt., 2003; del Rey y cols., 2007; Bini y cols., 2014]. En el presente estudio, se demostró por primera vez que el sistema genital masculino y femenino también sufre importantes anomalías fisiológicas y anatómicas en ausencia de infección local o crecimiento de bacterias. En los machos se encontró que hay una disminución en la testosterona, atrofia de la próstata y vesículas seminales, así como oligospermia. En las hembras se encontró aumento de estradiol, atrofia en útero y ovario. Por lo tanto, es posible que la respuesta inmune en los pulmones y localmente en los testículos y ovarios, así como en las glándulas y otros órganos involucrados en la regulación de la síntesis de hormonas sexuales, como las glándulas suprarrenales, puedan contribuir a estas anomalías funcionales y anatómicas del sistema reproductivo masculino y femenino.

La funcionalidad de los órganos sexuales masculinos y femeninos implica proliferación y diferenciación celular intensa, migración celular y comunicación, así como la señalización entre célula y célula. En el macho adulto los procesos altamente dinámicos como la proliferación de las células de Sertoli, la diferenciación de las células germinales, la producción de espermatozoides y la función normal de las células de Leydig son esenciales para realizar las dos funciones más importantes de este sistema, que son la producción de células germinales masculinas (espermatozoides) y la secreción de la principal hormona sexual masculina, la testosterona (Keven y cols., 1998). En nuestro trabajo, en el testículo

no se observó ninguna alteración histológica evidente, por lo que realizamos espermogramas que de manera indirecta nos proporcionarían información acerca de la funcionalidad de los testículos, ya que el proceso de espermatogénesis implica proliferación y diferenciación celular, así como la cooperación de las células de Leydig y Sertoli (Martineau y cols., 1997; Boitani y cols., 2011). Nuestros resultados mostraron disminución en la cuenta espermática en los ratones enfermos en los tiempos tardíos de la enfermedad; sin embargo la viabilidad, motilidad y capacitación espermática no se ven afectados. A este respecto, en estudios donde se evaluó la calidad espermática se señala que la disminución en la testosterona puede ser responsable de la disminución en la cuenta espermática (Hardy y cols., 2005; Traish y cols., 2014). Por otro lado, se ha descrito que citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 tienen efectos sobre la espermatogénesis (Boockfor y cols., 1994; Hayes y cols., 1996; Yan y cols., 2000; Hedger y Meinhardt, 2008; Guazzone y cols., 2009). Estos antecedentes sugieren que la disminución de testosterona así como la alteración de las citocinas halladas en el presente estudio, podrían ser las causantes de la disminución de la cuenta espermática.

Nuestro estudio reveló una disminución en las concentraciones séricas de testosterona en la TB tardía activa en comparación con el grupo control de animales no infectados. Se ha descrito una disminución similar en pacientes varones con TB avanzada y grave (del Rey y cols., 2007). Por lo que, que en humanos y ratones se presentan anormalidades significativas en las hormonas sexuales, particularmente en la tuberculosis pulmonar tardía activa. Del mismo modo, se ha observado una disminución en la concentración de testosterona en otras enfermedades infecciosas, como las causadas por *Plasmodium chabaudi* y *Mycobacterium leprae* en ratones (Barthelemy y cols., 2004; Leal y cols., 2006). Además, en humanos con neurocisticercosis, se ha descrito falla gonadal primaria y disminución significativa de las concentraciones séricas de testosterona (Cárdenas y cols., 2012). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que las dos funciones principales del testículo (producción espermática y síntesis de testosterona) se ven afectadas durante la TB activa tardía en ausencia de infección del sistema genital masculino. Las alteraciones en la producción de testosterona encontradas en nuestro estudio



podrían ser el resultado de un efecto inhibitorio de algunas moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria que acompaña a la progresión de la enfermedad (Kalyani y cols., 2007).

La próstata y las vesículas seminales son órganos andrógeno-dependientes, específicamente de dihidrotestosterona (DHT). La DHT (andrógeno más potente) se forma a partir de la testosterona secretada principalmente por las células testiculares de Leydig, y por la acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa (Svechnikov y cols., 2001; Carreu y cols., 2007). La DHT tiene mayor afinidad que la testosterona por los receptores de andrógenos (Risbriger y Taylor, 2006). Es bien sabido que las concentraciones normales de andrógenos son críticas para mantener la morfología y la función de las vesículas seminales y el epitelio prostático, los que expresan altos niveles de receptores de andrógenos (Risbriger y Taylor, 2006; Risbriger y cols., 2006). De hecho, al bloquear los receptores de andrógenos se produce atrofia en vesículas seminales y próstata, además de disminución de peso en ambos órganos (Wolf y cols., 2008). Por lo tanto, es probable que la atrofia del epitelio de estos órganos pueda ser el resultado de la disminución en la concentración de testosterona sérica. También debe considerarse una posible disminución de la capacidad de la próstata y vesículas seminales de transformar testosterona a DHT en ratones con TB, lo que llevaría a la disminución de los factores tróficos producidos por estas glándulas. El déficit de los epitelios de próstata y vesícula seminal para producir DHT podría ocurrir antes de que se observara la disminución de la testosterona sérica y explicaría que se encontraran cambios aún antes del día 120. La deficiencia de testosterona también podría ser responsable de la disminución significativa del número de espermatozoides, teniendo en cuenta el conocido efecto de este esteroide en la promoción de la espermatogénesis (Eisermann y cols., 1989; Azenabor y cols., 2015). La baja producción de diversos factores por la próstata atrófica y las vesículas seminales durante la TB pulmonar tardía también podrían contribuir a la oligoespermia, considerando que estos factores son necesarios para la maduración y la viabilidad de los espermatozoides.

En la fase temprana de la TB pulmonar humana y murina se ha descrito una alta producción de citocinas como IL-12 e INF- $\gamma$  (producidas por los linfocitos) y IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF $\alpha$  (producidas por los macrófagos) que ejercen acciones locales que son fundamentales en la protección antibacteriana (Hernández-Pando y cols., 1997; Hernández-Pando y cols., 1998). Estas citocinas también circulan sistémicamente y pueden afectar negativamente la función testicular (García y cols., 2006) y de otros órganos del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. En condiciones normales, las células de Sertoli y Leydig están reguladas principalmente por la secreción de FSH y LH. Sin embargo, se ha descrito que algunas citocinas se producen en los testículos y participan en varias actividades fisiológicas significativas como en la espermatogénesis y esteroidogénesis (Eisermann y cols., 1989; Hedger y Meinhardt, 2003; Leal y cols., 2006; García y cols., 2006; Cárdenas y cols., 2012).

Al determinar la expresión de citocinas en tejido testicular encontramos un aumento en la expresión de IL-6 en la TB tardía activa. Las células de Sertoli y los macrófagos testiculares intersticiales expresan IL-6, que pueden producirse en exceso en los testículos en respuesta a diversos estímulos endógenos, incluidas las condiciones que producen inflamación como la que se presenta en la TB pulmonar (Young y cols., 2015). Por lo tanto, es posible que cualquier cambio en la secreción de IL-6 pueda desencadenar alteraciones en el funcionamiento del testículo y alterar el recuento de espermatozoides. Aunque hasta ahora no hay pruebas claras sobre la presencia de receptores de IL-6 en el testículo, se sabe que esta citocina desempeña un papel regulador importante en el desarrollo y la función de los testículos porque tiene efectos directos sobre la diferenciación de células espermatogénicas y en la esteroidogénesis testicular (Boockfor y cols., 1994; Hayes y cols., 1996; Yan y cols., 2000).

Por lo tanto, la alta producción de IL-6 en los testículos durante la TB avanzada activa podría afectar la producción de espermatozoides y testosterona, ya que la IL-6 afecta la síntesis de estrógenos y éstos a su vez disminuyen la síntesis local de testosterona por efectos autocrinos (Hedger y Meinhardt, 2003). La IL-6 estimula la síntesis de estrógenos a partir de testosterona activando P450-aromatasa, esta

enzima está presente en los testículos y podría ser estimulada por la abundante IL-6 inducida por la infección (Hermann y cols., 2002), lo que terminaría afectando a los espermatozoides y la producción de testosterona. Es probable que el incremento de la síntesis de la IL-6 en testículo sea necesario para que se promueva la síntesis de estradiol a partir de testosterona, lo que permite mantener la respuesta inmune pro-inflamatoria (Th-1) y así seguir tratando de controlar la enfermedad, ya que en la etapa tardía de la TB se comienza a favorecer una respuesta inmune anti-inflamatoria (Th-2) para tratar de evitar daño tisular.

Por otro lado, mostramos que la expresión de IL-1 $\beta$  disminuye en los testículos de ratones infectados con TB avanzada activa. En condiciones fisiológicas, IL-1 $\beta$  en testículo inhibe la esteroidogénesis de las células de Leydig ya que actúa a nivel del gen de la enzima esteroidogénica, y reduce la espermatogénesis por apoptosis (Hedger, 2001; Vivas y cols., 2007; Loveland y cols., 2017). Además, se sabe que esta citocina tiene varios efectos sobre los túbulos seminíferos, como la estimulación de la producción de transferrina por las células de Sertoli y la inhibición de la síntesis de ADN en la fase meiótica de los espermatoцитos pre-leptotenos (Guazzone y cols., 2009). Se ha descrito que los niveles bajos de IL-1 $\beta$  en testículo generan estrés oxidativo excesivo que podría dañar las células germinales (Vivas y cols., 2007; Loveland y cols., 2017). Por lo tanto, la baja producción de IL-1 $\beta$  que se encontró en la enfermedad tardía, 90 y 120 días post-infección, podría alterar la esteroidogénesis y provocar la disminución de espermatozoides. En la etapa tardía de TB, la producción de IL-1 $\beta$  en los pulmones disminuye, debido a que el reclutamiento de las células inmunitarias comienza a generar daño tisular provocando necrosis y áreas neumónicas, además de que los macrófagos que han fagocitado bacterias disminuyen la producción de citocinas pro-inflamatorias, por lo que se activa la respuesta anti-inflamatoria (Th2) (Hernández-Pando y cols., 1997). Sin embargo, al no recibir tratamiento, estos mecanismos no son suficientes para controlar la enfermedad, por lo que nosotros proponemos que la disminución de IL-1 $\beta$  en testículo se deba a que dicha citocina se traslade a los pulmones para seguir tratando de controlar la enfermedad.

El TGF- $\beta$  también disminuye su expresión en testículo. Las tres isoformas de esta citocina se expresan ampliamente en las células de Sertoli, las células peritubulares y las células de Leydig en los testículos fetales e inmaduros, y disminuyen en la etapa posterior a la pubertad, pero todavía se expresan en células germinales y somáticas (Eisermann y cols., 1989). En adultos, la expresión de esta citocina se da en las células de Leydig y participa en la síntesis de testosterona, además de que es un potente inductor de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa, enzima que se encarga de transformar a la testosterona en dihidrotestosterona (Antonipilla y cols., 1995). Es posible que la disminución en la expresión de TGF- $\beta$  que describimos esté contribuyendo a la disminución de la testosterona, así como a la atrofia que presentan las vesículas seminales y próstata. Nuestros datos sugieren que al tener menos producción de testosterona y al disminuir la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa, también se disminuiría la producción de la dihidrotestosterona, hormona importante para la diferenciación, proliferación y mantenimiento celular de estos órganos (Antonipilla y cols., 1995).

Otra de las citocinas que evaluamos su expresión en testículo fue IL-10, y encontramos que su expresión disminuye conforme avanza la enfermedad pulmonar. Las espermatogonias y espermatozoides son las células que expresan esta citocina; sin embargo se desconoce su función en el testículo. La disminución en su expresión podría atribuirse a la disminución de espermatogonias y espermatozoides que se encontró en los animales infectados. Por otra parte, se han publicado estudios que indican que cuando la concentración de testosterona disminuye también baja la expresión de IL-10 en testículo (Liva y Voskuhl, 2001). Las citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  también se estudiaron; sin embargo estas citocinas pro-inflamatorias no se expresaron en testículo adulto de animales sanos o infectados. Estos resultados nos sugieren que las citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  no tiene efectos sobre la función de los testículos y no da indicios de inflamación en el tejido.

Con respecto a las hembras, también se encontraron importantes alteraciones funcionales y anatómicas, particularmente durante la TB avanzada activa. Específicamente en el útero, mostramos la disminución en el grosor del endometrio

residual o funcional, capa que se desprende en cada ciclo ovárico (Kierszenbaum y Tres., 2012). Como se describió en la introducción, la actividad del endometrio depende de la producción cíclica de estrógenos y progesterona, hormonas que inducen la proliferación de los tejidos glandulares, logrando el aumento del número de células epiteliales que revisten al útero, además provocan el desarrollo de cambios secretores en el endometrio y la descamación endometrial (Hall., 2016). Estudios donde evalúan el efecto del estradiol sobre el útero, señalan que la disminución en esta hormona provoca colapso y contracción de arteriolas estimulando isquemia consecutiva del epitelio funcional del útero induciendo la disminución del grosor del endometrio (Havelock y cols., 2006; Fogle y cols., 2007).

El oviducto está conformado por células epiteliales cilíndricas simples ciliadas que tiene la función de captar al ovocito al ser ovulado y llevarlo hasta el útero. En este estudio mostramos que las ratonas con TB avanzada activa presentan disminución en la longitud de las vellosidades ciliadas de las células epiteliales, estructuras dependientes de estradiol y progesterona (Kierszenbaum y Tres., 2012; Hall., 2016). Esto nos sugiere que es probable que la infección pulmonar en ratonas afecte la producción de éstas hormonas.

Con respecto al ovario, el desarrollo folicular es esencial para la producción de estradiol y progesterona, principales hormonas sexuales femeninas. (Tresguerres., 2010; Kierszenbaum y Tres., 2012; Hall., 2016). En nuestro trabajo, observamos cómo la función del ovario se afecta conforme avanza la enfermedad pulmonar, hasta probablemente llegar a problemas con la ovulación, que pueden sugerir disminución de folículos maduros y de cuerpos lúteos en los tiempos tardíos de la infección.

Sorprendentemente, nuestro estudio reveló incremento en las concentraciones séricas de estradiol en la TB tardía activa, en comparación con el grupo control de animales no infectados. Se ha descrito un incremento similar en pacientes varones con TB avanzada y grave (del Rey y cols., 2007; Bottasso y cols., 2013). Asimismo, en otras enfermedades inflamatorias crónicas también se ha observado incremento en la concentración de estradiol (Chen y cols., 2018). Este incremento puede ser en

parte responsable del aumento en el número de folículos atrésicos que se muestra en este estudio, ya que a pesar de que los mecanismos que conducen a la atresia (proceso de involución de folículos ováricos) no están claros, se ha propuesto que excesivas cantidades de estradiol procedentes de los folículos en crecimiento actúan de manera más rápida sobre el hipotálamo, reduciendo todavía más la secreción de FSH por la adenohipófisis, por lo que de esta manera se bloquearía el crecimiento folicular de los menos desarrollados (Hall., 2016). El proceso de atresia es importante, ya que en condiciones normales permite que sólo uno de los folículos crezca lo suficiente para ser ovulado; sin embargo, nuestros resultados sugieren que los ovarios de las ratonas con infección pulmonar no ovulan, ya que los estudios histológicos del ovario que presentamos nos muestran la disminución de la presencia de cuerpos lúteos y la disminución de los folículos en diferentes estadios de maduración; así como el incremento en la atresia folicular. Estos hallazgos son signos que se traducen en atrofia ovárica.

Dado que el ovario se encuentra alterado, es probable que las cantidades aumentadas de estradiol descritas en este estudio en los animales infectados no solo sean procedentes de los folículos ováricos sino de alguna fuente extra-gonadal. Es interesante comentar que en la TB y en otras enfermedades inflamatorias crónicas se ha propuesto que el incremento de estradiol sérico es producto del aumento en la expresión de IL-6 en pulmón (Del Rey y cols., 2007; Chen y cols., 2016).

En este estudio, encontramos que la expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$  en ovario disminuye conforme avanza la enfermedad. Cada vez se conoce más sobre la participación de las citocinas en la modulación de la función ovárica (Stassi y cols., 2018; Galvao y cols., 2018; Sahin Aydinyurt y cols., 2018). En el ovario, ambas citocinas participan en el rompimiento de la membrana folicular (Inza y Van Thillo., 2011), por lo que es posible que la disminución en la expresión de estas citocinas contribuya a los problemas de desarrollo folicular que anteriormente describimos. Es probable que al tener disminuida la expresión de las citocinas su actividad también lo esté, a pesar de que probablemente las concentraciones de andrógenos en el ovario se

encuentren incrementadas, ya que se observó un aumento de los folículos atrésicos que se sabe sintetizan andrógenos. Por otro lado, la disminución de estas citocinas hace más fuerte la hipótesis de que el incremento de estradiol sérico encontrado en los ratones infectados proviene de un sitio extra-gonadal.

Aunque los ovarios son la principal fuente de estrógenos en mujeres, se presentan otras fuentes de biosíntesis en el organismo que contribuyen a amortiguar la falta de producción de estradiol después de la menopausia. Estos sitios son el tejido adiposo, piel, hueso y cerebro (Simpson y cols., 1997). Sin embargo, los estrógenos sintetizados en estos compartimientos, tienen importancia biológica en el tejido mismo en forma paracrina o autocrina (Labrie y cols., 1997). La cantidad liberada de estrógenos sintetizados por estos sitios extra-gonadales puede ser pequeña, pero las concentraciones en el tejido pueden ser muy altas y son capaces de ejercer influencia local biológica significativa (Simpson y cols., 2000). La estructura química y la actividad de los estrógenos sintetizados en los sitios extra-gonadales son iguales a los que se producen en las gónadas. Sin embargo, la única diferencia reside en los precursores necesarios para la síntesis de estrógenos, ya que los tejidos y las células de los sitios extra-gonadales que sintetizan estrógenos son incapaces de sintetizar esteroides de 19 carbonos (C19) tales como: DHEA, androstenediol, androstenediona, testosterona y dihidrotestosterona, precursores de la síntesis de estrógenos, aunque son capaces de convertir esteroides de C19 a estrógenos mediante la acción de la aromatasa (Barakat y cols., 2016).

Además, se ha descrito la presencia de cierta actividad esteroidogénica en tejido pulmonar fetal y en adultos, ya que estudios han revelado la existencia de enzimas esteroidogénicas en el tejido pulmonar. El pulmón fetal y el del adulto, al igual que sucede en los otros sitios extra-gonadales de síntesis esteroidogénica, no tienen la capacidad de síntesis de *novo* de andrógenos y estrógenos ya que no expresan CYP17, enzima que cataliza la formación de esteroides de C19 a partir de pregnenolona y progesterona. Sin embargo, expresan enzimas como la aromatasa y la 5 $\alpha$ -reductasa (Seaborn y cols., 2010). Es importante mencionar que algunas bacterias relacionadas a H37Rv como *Mycobacterium smegmatis* sintetizan

andrógenos y estrógenos (Dlugovitzky y cols., 2015). Por otro lado, estudios “*in vitro*” en nuestro laboratorio muestran que la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv es capaz de sintetizar hormonas de C19 como los andrógenos, testosterona y DHEA, y hormonas de C18 como los estrógenos, estradiol y estrona, (trabajo en proceso de publicación), lo cual sugiere fuertemente que la bacteria posee las enzimas involucradas en síntesis de *novo* de hormonas esteroideas.

En los pulmones se encuentran los neumocitos, células que forman las paredes de los alvéolos. Específicamente, los neumocitos tipo II contienen surfactante pulmonar que tiene como función cubrir a los alvéolos para mantener su estabilidad. El surfactante está compuesto por fosfolípidos, proteínas y lípidos (Tresguerres, 2010; Halla., 2016). Con estos antecedentes, es probable que en TB activa, los pulmones sean un sitio de síntesis de estrógenos extra-gonadales, ya que a pesar de que estos órganos no cuentan con la maquinaria enzimática completa si pueden ser una fuente de lípidos y proteínas para la síntesis esteroidogénica. Evidentemente este proceso tendría que ser con participación de *Mycobacterium tuberculosis* ya que la bacteria cuenta con las enzimas para lograrlo. Es probable que durante el curso de TB activa, la bacteria favorezca el incremento de estradiol para incrementar la respuesta anti-inflamatoria (Th-2) y así disminuir la respuesta pro-inflamatoria, lo que favorece el incremento del crecimiento bacteriano, logrando así la progresión de la enfermedad. Esto puede estar sucediendo tanto en hombres como en mujeres. Por lo tanto, es posible que en hombres, la disminución en las concentraciones séricas de testosterona se deba a un incremento en la síntesis de estradiol.

Por otro lado, es probable que en las hembras enfermas con TB, que presentan altas concentraciones séricas de estradiol se genere la inhibición sostenida de las hormonas hipofisarias, FSH y LH, provocando que el ciclo estral quede arrestado, lo que se conoce como *estro persistente* (Ibañez y cols., 2010). La funcionalidad del útero y del oviducto, así como del ovario, dependen de la liberación de FSH y LH, no sólo del estímulo del estradiol para la proliferación, diferenciación y mantenimiento celular, por lo que es posible que las alteraciones histológicas que



observamos en estos tejidos sean en gran parte resultado de la falta del estímulo de las hormonas hipofisarias.

En este estudio, es importante considerar la dramática pérdida de peso corporal que sufren los animales infectados (machos y hembras) en los últimos tiempos de la enfermedad, ya que este acontecimiento también puede estar participando en los efectos que nosotros mostramos. La pérdida de peso corporal es una característica de los pacientes con tuberculosis (Chang y cols., 2013). En este estudio los animales macho infectados comienzan a perder peso corporal a partir del día 21 post-infección, siendo esta pérdida estadísticamente significativa hasta el día 60 post-infección; mientras que en las hembras infectadas la pérdida de peso corporal comenzó a ser significativa a partir del día 28 post-infección.

Debido a la enfermedad los animales se encontraban cursando el síndrome de desgaste en los tiempos tardíos de la TB. La caquexia o el síndrome de desgaste se definen como la pérdida acelerada de peso, en particular de masa muscular y no se revierten con la ingesta calórica. (Sousa-Nunes y cols., 2017). Sin embargo, estudios en África, indican que una proporción significativa de pacientes con tuberculosis tienen una marcada pérdida de peso en el momento que se presentan para tomar tratamiento (Kennedy y cols., 1996; Harries y cols., 1988; Zachariah y cols., 2002) pero que mejoran clínicamente y ganan peso semanas después de comenzar con el tratamiento por lo que no sería un síndrome de desgaste típico (Eddleston y cols., 2008). El síndrome de desgaste se ha relacionado con un mal pronóstico y es un importante factor de riesgo para la mortalidad (Sacks y Pendle, 1998; Lubart y cols., 2007, Santo y cols., 2003). Los mecanismos exactos que lo producen en la TB aún no se comprenden bien pero es probable que sea causada por la combinación de disminución del apetito y metabolismo alterado producto de la inflamación y de la respuesta inmune (Paton y cols., 2003; Macallan, 1999). El aumento en la concentración plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que son citocinas pro-inflamatorias produce fiebre y en procesos crónicos puede generar caquexia ya que promueve la movilización de grasas así como el aumento del consumo energético en reposo y la inducción de la pérdida de apetito, por lo tanto el paciente

con TB severa o crónica lo manifiesta clínicamente (Tramontana y cols., 1995). Algunos estudios sugieren una participación de IL-6 en la regulación del metabolismo lipídico ya que los ratones deficientes en IL-6 desarrollan obesidad junto con trastornos metabólicos relacionados con esta enfermedad. Estas alteraciones son abolidas por la administración exógena de IL-6 (Wallenuis y cols., 2002). Con respecto a la TB, estudios indican que el aumento de las concentraciones séricas de IL-6 se asocian con la pérdida del apetito (Van Lettow y cols., 2005). También se ha demostrado que el índice de masa corporal (IMC) se correlaciona negativamente con los niveles de IL-6 lo cual señala a esta citocina como un factor caquéctico (Mahuad y cols., 2007).

Las enfermedades infecciosas de naturaleza crónica como la TB se acompañan de una producción excesiva de citocinas, que a su vez pueden afectar al sistema neuroendocrino. Estas interacciones pueden llevar a alteraciones importantes en funciones biológicas esenciales como el metabolismo y alterar la respuesta inmunológica (Díaz y cols., 2017).

## 8. CONCLUSIONES

- Este estudio reveló que el sistema genital masculino y femenino de ratones con tuberculosis pulmonar sufren importantes anomalías fisiológicas y anatómicas en ausencia de infección local.
- EL desarrollo de la enfermedad pulmonar así como el crecimiento de la bacteria tanto en machos como en hembras está influenciado por las hormonas sexuales.
- La TB pulmonar en machos no genera ninguna alteración histológica evidente en los testículos; sin embargo, afecta sus dos funciones principales, la producción de gametos y hormonas, ya que en este estudio se hizo evidente la oligoespermia y la disminución de las concentraciones de testosterona en los animales con infección pulmonar con H37Rv en ausencia de infección genital.
- La infección pulmonar con H37Rv en ratones y en ausencia de infección genital no afecta la viabilidad, motilidad y capacitación espermática.
- Se encontró que la infección pulmonar con H37Rv en machos provoca atrofia en próstata y vesículas seminales.
- La TB pulmonar en hembras provoca atrofia en ovario en ausencia de infección genital; sin embargo, las ratonas presentan aumento en la concentración sérica de estradiol en los tiempos tardíos de la enfermedad.
- Se encontró que la infección pulmonar con H37Rv en hembras provoca atrofia en útero en ausencia de infección genital.
- En las hembras, la TB pulmonar provoca atrofia del oviducto en ausencia de infección genital.

## 9. PERSPECTIVAS

### 9.1 Machos:

- Evaluar la funcionalidad del epidídimo en ratones infectados con MTB y controles.
- Determinar la concentración de estradiol en suero de ratones infectados.
- Determinar las concentraciones de gonadotrofinas en suero de ratones infectados.
- Evaluar la expresión de 5 $\alpha$ -reductasa en vesícula seminal y próstata.
- Evaluar la expresión de aromatasa en testículo.
- Evaluar la capacidad de fertilizar del espermatozoide.

### 9.2 Hembras:

- Estudiar el ciclo estral mediante citología vaginal.
- Medir el miometrio en útero.
- Evaluar la expresión de aromatasa en ovario.
- Determinar la concentración sérica de gonadotrofinas.
- Determinar la concentración sérica de progesterona.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Reactivos

Middlebrook 7H10 Agar obtenido de BECTON DICKINSON & DIFCO In. (U.S). Cloruro de Sodio cristal (NaCl), Cloruro de Potasio cristal (KCl), Fosfato de Sodio Dibásico Anhídrido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y el Fosfato de Potasio Dibásico polvo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) obtenidos de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Méx.). ADC (Albúmina, Dextrosa y Catalasa) y OADC (Ácido Oleico, Albúmina, Dextrosa, Catalasa) se obtuvieron de BECTON DICKINSON & COMPANY (Sparks, USA). Testosterona tritiada ( $[\text{}^3\text{H}$ -testosterona 1, 2, 6, 7- $^3\text{H}(\text{N})$ ]- Perkin Elmer Life Sciences Inc. ® Boston MA). Anticuerpo anti-testosterona (ratón monoclonal [4E1G2] a testosterona 3 CMO, Abcam Inc), Estradiol tritiado ( $[\text{}^3\text{H}$ -estradiol 6, 7-  $^3\text{H}(\text{N})$ ]- Perkin Elmer Life Sciences Inc. ® Boston MA), anticuerpo anti-estradiol (ratón monoclonal [AB4.2] a estradio 6 CMO, Thermo Fisher Scientific). DMEN- Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific. Albúmina de suero bovino (BSA), Sigma- Aldrich. Polilisina (Biocare Medical, Lake Concord, Ca, EUA). 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), Sigma-Aldrich. Sniper de Fondo (Biocare Medical). anticuerpos específicos policlonales de conejo de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). anticuerpos específicos policlonales de cabra de IL-10 e IL-1 $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). peroxidasa de cabra anti-conejo o anti-cabra (AB/HRP) (Vectastain ABC System, Burlingame, CA, EUA).

## 11. REFERENCIAS

- Azenabor A, Ekun AO, Akinloye O: Impact of inflammation on male reproductive tract. *J Reprod Infertil* 2015; 16(3):123-129
- Bals R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1: 141-50
- Barakat R, Oakley O, Kim H, Jin J, Jay Ko C. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Rep.* 2016; 49(9):488-496.
- Barthelemy M, Gabrion C, Petit G. Reduction in testosterone concentration and its effect on the reproductive output of chronic malaria-infected male mice. *Parasitol Res* 2004; 93(6): 475-481.
- Bellido-Gómez MC. Reproducción en el varón. Cap. 76. Tresguerres JAF. Segunda Edición 1999. McGraw Hill Interamericana. Pág. 1033-1047.
- Bermudez LE, Goodman J. (1996) *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 64: 1400-6.
- Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996; (1):64-102. Review.
- Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payan J, Colucci D, Cruz AF, Zatarain ZL, Alfonseca E, Romano MC, Bottasso O, Hernandez Pando R. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2014; 9(4): e93831.
- Boitani C, Stefanini M, Fragale A, Morena AR. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Mol Phys B Endo Health Dis* 2011; 136(12).
- Boockfor FR, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology* 1994; 134:2150-2155.
- Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, Dye C, Nunn P. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000 4(2):123-32.
- Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, de Rey A. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. *Mol Cell Neurosci.* 2013; 53:77-85.
- Bouman A, Heineman MJ, Fass MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update.* 2005 11(4):411-23.
- Calderón Mendoza L, Vivas Ramirez C, De los Reyes L. Assessment of sperm capacitation techniques and their effect on DNA fragmentation. *Rev. Col. Obst y Gine.* 2012; 63:2.
- Cardenas G, Valdez R, Saenz B, Bottasso O, Fragoso G, Scitutto E, Romano MC, Fleury A. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol* 2012; 42(2): 171-176.
- Carreu S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S: Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endo* 2003; 1:35
- Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL (1999). Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*; 162: 5407-16.

- Castro JI, Romano MC. The effects of fetal serum and gonadotropins on testosterone production by cultured chick testicular cells. *Domest Anim Endocrinol* 1994; 11:261-269.
- Chang SW, Pan WS, Lozano Beltran D, Oleyda Baldelomar L, Solano MA, Tuero I, Friedland JS, Torrico F, Gilman RH. Gut hormones, appetite suppression and cachexia in patients with pulmonary TB. *Plos One* 2013;8(1):e54564.
- Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. (1986) Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 60: 1068-74.
- Davis TM, Li TA, Tran QB, Robertson K, Dyer JR, Phan TD, Meyer D, Beaman MH, Trinh KA. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in severe falciparum malaria: effects of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997. 82(9):3029-33.
- de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. (2005) Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun*; 73: 6711-20.
- del Rey A, Mahuad Carolina V., Bozza Verónica V., Bogue Cristina, Farroni Miguel A., Bay Maria Luisa., Botasso Oscar A, Besedovsky Hugo O. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun* 2007; 21(2): 171-179.
- Diamond G, Bevins CL. (1998) beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol* 88: 221-5
- Dlugovitzky DG, Fontela MS, Martinel Lamas DJ, Valdez RA, Romano MC. *Mycobacterium smegmatis* synthesizes in vitro androgens and estrogens from different steroid precursors. *Can J Microbiol.* 2015; 61(7):451-5.
- Eisermann J, Register KB, Strickler RC, Collins JL: The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro. *J Androl* 1989; 10(4):270-274
- Eppig JJ, Viveiros MM, Marin-Bivens C y De la Fuente R. Oocyte maturation and ovulation. *Leug PCK y Adashi EY. The ovary. Second edition. USA. Cap 7: 113-123. 2004*
- Fallahian M, Ilkhani M. Menstrual disorders in nongenital tuberculosis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; 18452.
- Fogle Rh, Stanczyk FZ, Zhang X, Paulson RJ. Ovarian androgen production in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007. 92(8):3040-3.
- Galvao AM, Skarzynski D, Ferreira-Dias G. Luteolysis and the Auto-, Paracrine role of cytokines from Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamilies. *Vitam Horm.* 2018;107:287-315.
- Garcia JM, Li H, Mann D, Epner D, Hayes TG, Marcelli M, Cunnigham GR: Hypogonadism in male patients with cancer. *Cancer* 2006; 106: 2583-2591
- González Mendoza JE; "Tuberculosis: Enfermedad Pulmonar únicamente?"; *Orthotips*, Vol. 9 No. 3, 2013.
- Griffin J, Emery Br, Huang I, Peterson CM, Carrel DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assit Reprod* 2006(1); 3-2.
- Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8):620-628.

- Hall JE. Fisiología femenina antes del embarazo y hormonas femeninas. Tratado de Fisiología Médica. Décimo tercera edición. Elsevier. 2016. Pág. 1037-1054.
- Hall JE. Funciones reproductoras y hormonales masculinas y función de la glándula pineal. Gyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica. Décimo tercera edición. Elsevier. 2016. Pág. 1021-1036.
- Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res*. 2005; 322(1):147-53.
- Harries AD, Nkhoma WA, Thompson PJ, Nyangulu DS, Wirima JJ. Nutritional status in Malawian patients with pulmonary tuberculosis and response to chemotherapy. *Eur J Clin Nutr*. 1988 42(5):445-50.
- Hassan WA, Darwis AM. Impact of pulmonary tuberculosis on menstrual pattern and fertility. *Chest* 2009. 136(1):326.
- Havelock JC, Rainey WE, Bradshaw KD, Carr BR. The post-menopausal ovary displays a unique pattern of steroidogenic enzyme expression. *Hum Reprod*. 2006. 21(1):309-17
- Hayes R, Chalmers SA, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Hedger MP. Secretion of bioactive interleukine 1 by rat testicular macrophages in vitro. *J Androl* 1996; 17(1):41-49.
- Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol* 2003; 58(1):1-26.
- Hermann M, Scholmerich J, Straub RH. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966:166-86.
- Hernández Pando R, Arriaga AK, Madrid MV, Orozco EH, Larriva SJ, Panduro CA. The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. *Experimental and Molecular Pathology*. 65, 25-36 (1998).
- Hernández Pando R, Bornstein QL, Aguilar LD, Orozco EH, Martínez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunologic and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology*. 100: 352-358, 2000.
- Hernández Pando R, Orozco H., Honour J, Silvia P, Rook GAW: Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis a clue to pathogenesis?. *FEMS Microbiology Immunology*, 12: 63-72, 1995.
- Hernández Pando R, Pavón L. Arriaga K, Orozco EH, Madrid MV, Rook GAW: Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect and Immun* 1997; 6: 84-90.
- Hernández-Pando R, de la Luz Streber M, orozco H, Arriaga K, Pavon L, Marti O, Lightman SL, Rook GA. Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *QJM*. 1998 91(11):755-66.
- Hernández-Pando R, Orozco EH, Arriaga AK, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$  during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997; 90: 607-17.



- Hernández-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89:26-33.
- 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.* 1995; 12(1):63-72.
- Hernández-Pando R, Schön T, Orozco EH, Serafín J, Estrada-García I. Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53:257-65.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124:43-101
- Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicle growth. *Biol Reprod.* 44:1157-1162. 1991.
- Ibañes L, López-Bermejo A, Díaz M, Enríquez G, Del Río, De Zegher F. Low-dose pioglitazone, flutamide, metformin plus and estro-progestagen for non-obese Young women with polycystic ovary syndrome: increasing efficacy and persistent safety over 30 months. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26(12):869-73.
- Jamnongjit M y Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med.* 23:234-241. 2005
- Kellendock C, Tronche F, Reichardt HM, Bauer A, Greiner E, Schmid W, Schutz G. Analysis of glucocorticoids receptor function in the mouse by gene targeting. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2002(40):305-18.
- Kennedy JL, Muse KN, Keeble SC, Curry TE. Hormonal regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular development in the rat ovary. *Endocrine.* 1996. 5(3):299-305
- Keven K, Uysal AR, Erdogan G. Adrenal function during tuberculous infection and effects of antituberculosis treatment on endogenous and exogenous steroids. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998(5): 419-24.
- Kierszenbaum AL, y Tres L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology.* 3<sup>rd</sup> Edition. Elsevier. 2012; 633-657
- Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2396-02.
- Leal AM, Magalhaes PK, Souza CS, Foss NT. Pituitary-gonadal hormones and interleukin patterns in leprosy. *Trop. Med. Int. Health* 2006; 11:1416-1421.
- Lim A, Kumar V, Hari Dass SA, Vyas A. *Toxoplasma gondii* infection enhances testicular steroidogenesis in rats. *Mol Ecol.* 2013; 22(1): 102-10.
- Liva SM, Voskuhl RR. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol* 2001; 167:2060-2067.
- Liva SM, Voskuhl RR: Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol* 2001; 167:2060-2067
- Loveland KL, Klein B, Poeschl D, Indumathy S, Bergmann M, Loveland BE. Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: immunoregulation and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8:307

- Lubart E, Lidgi M, Leibovitz A, Rabinovits C, Segal R. Mortality of patients hospitalized for active tuberculosis in Israel. *Isr Med Assoc J.* 2007. 9(12):870-3.
- Macallan DC. Malnutrition in tuberculosis. *Diag Microbiol Infect Dis* 1999. 34(2):153-7. Review.
- Mahuad C, Bozza V, Pezzotto Sm, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A, Bottasso O. Impaired immune response in tuberculosis patients are related to weight loss that coexists with an immunoendocrine imbalance. *Neuroimmunomodulation.* 2007; 14(3-4): 193-9.
- Makabe S, Motta PM, Nottola SA, Familiari G, Stallone T and Macchiarelli G. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *Int Rev Cytol.* 223:177-288. 2003
- Makabe S, Naguro T y Stallone T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. 2006. *Microsc Res Tech.* 69:436-449.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 1997; 7(12):958-68.
- Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, (1996;). In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 64: 926-32.
- Monostory K, Dvonak Z. Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr Drug Metab.* 2011; 12(2): 154-72.
- Muller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SH (1987). Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immun*; 55: 2037-41.
- Nagyová E, Procházka R y Vanderhyden BC. Oocytectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-1 treatment in serum-free médium. 1999. *Biol Reprod* 61:569-574.
- Netter Frank H. "Atlas de anatomía humana", Elsevier Masson. Quinta Edición. 2009
- Netter Frank H. "Atlas de anatomía humana", Elsevier Masson. Cuarta Edición. 2007
- Neyrolles O, Quintana Murci L. Sexual inequality in tuberculosis. *PloS Med* 2009; e1000199
- Ochi T. Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17 beta and bisphenol A. *Mutant Res.* 431:105-121.
- Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. (1998) Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 160: 5448-54.
- Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI, Ganz T, Lehrer RI, Catanzaro A. (1992) Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun* 60: 4720-5.

- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998;6:107-12.
- Paton NI, Ng YM, Chee CB, Persaud C, Jackson AA. Effects of tuberculosis and HIV infection on whole-body protein metabolism during feeding, measured by the [<sup>15</sup>N] glycine method. *Am J Clin Nutr*. 2003. 78(2):319-25
- Peterson PK, Gekker G, Hu S. (1995). CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect Immun* 63: 1598-602.
- Randhawa AK, Ziltener HJ, Merzaban JS, Stokes RW. (2005). CD43 is required for optimal growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. *J Immunol* 175: 1805-12.
- Risbridger G, Frydenberg M, Crowin PA, Taylor RA, Cunha GR, Pera M, Trounson AO, Pedersen J: Development and maturation of human prostate from embryonic stem cells in vivo. *BJU international* 2006; 97(s1):9-10
- Risbridger GP, Taylor RA: Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles and bulbourethral glands'. In J D O'Neill, TM Plant, DW Pfaff, JRG Challis, DM de Kretser, JS Richards and PM Wassarman (Eds). *Nobil and Neill's Physiology of Reproduction* 2006(3 ed., pp. 1149-1172). St Louis Missouri USA: Elsevier
- Rook GAW, Hernández Pando R: The role of TNF alpha in T-cell mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82: 591-95, 1994.
- Rook GAW, Baker R, Walker B, Honour J, Jessop D, Hernández Pando R, Arriaga K, Shaw A, Zumla A, Lightman S. Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917: 913-922, 2000.
- Rook GAW, Hernandez Pando R (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Ann Rev Microbiol.* 50: 259-84.
- Rook GAW, Hernández Pando R, Lightman S: Hormone, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunology Today* 15: 301-303, 1994.
- Rook GAW, Hernández Pando R, Stanford J. Immunotherapy for chronic intracellular bacterial infections. En JMW Van der Meer, MF Michel and HA Verbrough (editores). *New approaches to intracellular bacterial infections.* Smithkline Beecham 1997: 95-106.
- Rook GAW, Hernández Pando R, Stanford J. Protection and immunopathology in tuberculosis: the role of immunotherapy. *J. Pharm Pharmacol* 1997: (Suppl 1): 47-51.
- Rook GAW, Hernández Pando R, Baker R, Orozco EH, Arriaga K, Pavón L, Streber ML. Human and murine tuberculosis as models for immuno-endocrine interactions. En Rook GAW, Lightman S (editores): *Steroid hormones and the T-cell cytokine profile.* London Springer, 1997: 193-220.
- Rook GAW, Hernández Pando R: Cellular immune responses in tuberculosis, protection and immunopathology. *Med. Mal. Infect.* 26: 1-7, 1996.

- Rook GAW, Hernández Pando R: T-cell helper types and endocrines in the regulation of tissue damaging mechanisms in tuberculosis. *Immunobiology* 191: 478-92. 1994.
- Russel DL y Robker RI. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. 2007. *Human Reprod Update*. 13:289-312.
- Ryan F.; "The forgotten plague. How the battle against tuberculosis was won and lost". Boston, MA: Little, Brown and Company; 1992.
- Sacerdote AS, Mejía JO, Bahtiyar G, Salamon O. Effect of raloxifene in human neurocysticercosis. *BMJ Case Rep*. 2012. 14; 2012.
- Sacks LV, Pendle S. Factors related to in-hospital deaths in patients with tuberculosis. *Arch Intern Med*. 1998. 28;185(17):1916-22.
- Sahin Aydinyurt H, Yuncu YZ, Tekin Y, Ertugrul AS. IL-6, TNF- $\alpha$  levels and periodontal status changes during the menstrual cycle. *Oral Dis*. 2018; 16:10.1111.
- Sánchez-Criado JE. Fisiología del ovario. Cap. 75. Tresguerres JAF. Segunda Edición 1999. McGraw Hill Interamericana. Pág. 1020-1032.
- Santo Ah, Pinheiro CE, Jordani MS. Multiple-causes-of death related to tuberculosis in the State of Sao Paulo, Brazil, 1998. *Rev Saude Publica*. 2003. 37(6):714-21.
- Schlesinger LS (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol*. 150: 2920-30.
- Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. (1990). Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol*. 144: 2771-80.
- Seaborn T, Simard M, Provost PR, Piedboeuf B, Tremblay Y. Sex hormone metabolism in lung development and maturation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010. 21(12):729-38.
- Secretaría de Salud de México; "Evaluación externa del programa de control de Tuberculosis en México"; 2017.
- Seeley RR, Stephens TD y Tate P. *Essentials of anatomy and physiology*. 1995. Third edition. Edit. Mc Graw-Hill. St. Louis USA. Cap 4:63-69.
- Selsted ME, Szklarek D, Ganz T, Lehrer RI. (1985) Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect Immun* 49: 202-6.
- Serbina NV, Flynn JL. (1999). Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 67: 3980-8.
- Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. (2001) CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 167: 6991-7000.
- Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N y Terada T. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*. 68:1142-1149.

- Simpson ER, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:84-8.
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog HOrm Res.* 52, 185-213.
- Sousa-Nunes F, Moreira- Goncalves D, Henriques-Coelho T. Mini-Review on Cachexia-Related miRNA. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017;27(2):151-161.
- Stassi Af, Baravelle ME, Belotti Em, Amweg AN, Angeli E, Velazquez MML, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH. Altered expression of IL-1 $\beta$ , IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and IL-4 could contribute to anovulation and follicular persistence in cattle. *Theriogenology.* 2018;1;110:61-73.
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-5.
- Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276: 1684-7.
- Svechnikov KV, Sultana T, Soder O: Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182:193-201
- Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, (1998). A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15688-93.
- Thomas M. Daniel; "The history of tuberculosis"; *Respiratory Medicine* (2006) 100, 1862-1870.
- Traish AM. Adverse health affects of testosterone deficiency (TD) in men. *Steroids.* 2014; 88:106-16.
- Tramontana JM, Utaipat U, Molloy A, Akarasewi P, Burroughs M, Makonkawkeyoon S, Johnson B, Klausner JD, Rom W, Kaplan G. Thalidomide treatment reduce tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med.* 1995. 1(4): 384-97.
- Uplekar M, Walley J, Newell J. Directly observed treatment for tuberculosis. *Lancet* 1999. 9;353(9147):145.
- Van Lettow M, van der Meer JW, West CE, Van Crevel R, Semba RD. Interleukin-6 and human immunodeficiency virus load, but not plasma leptin concentration, predict anorexia and wasting in adults with pulmonary tuberculosis in Malawi. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005. 90(8):4771-6.
- Vivas AG, Lozano JH, Velasco J: Regulación inmuno-testicular y citocinas. *Invest Clin* 2007; 48(1):107-121
- Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SI, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med.* 2002. 8(1):75-9.
- Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedland JS. (1999) Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network. *J Immunol* 163: 3936-47.
- Williams A, Reljic R, Naylor I, (2004). Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 111: 328-33.

- Wolf G, Livshits D, Beilin B: Interleukin -1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain Behav Immun*, 2008; 22: 1072-1077
- World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB endemics. Geneva. WHO.2017.
- Yan W, Suominen J, Toppari J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt1) 161-168.
- Young JC, Wakitani S, Loveland KL: TGF- $\beta$  superfamily signaling in testis formation and early male germline development. *Semin Cell Devl Biol* 2015; 45: 94-103
- Zachariah R, Bemelmans M, Akesson A, Gomani P, Phiri K, Isake B, van Der Akker T, Philips M, Mwale A, Gausi F, Kwanjana J, Harries AD. Reduced tuberculosis case notification associated with scaling up antiretroviral treatment in rural Malawi. *Int J Tuber Lung Dis*. 2011. 15(7):933-7
- Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD (1996). Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 15: 760-70.