

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Análisis del estado de caquexia en un modelo murino de  
tuberculosis pulmonar**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el Título de  
**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

**Jorge Iván Valencia Lerma**

# Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado para revisar la tesis profesional de **Jorge Iván Valencia Lerma**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico-Biólogo-Clinico**.

---

Dr. Jorge Alberto Barrios Payan  
Director de Tesis

---

Dra. Adriana Garibay Escobar  
Secretario

---

Dr. Enrique Bolado Martínez  
Vocal

---

M. en C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña  
Suplente

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mis padres **Ana María Lerma Alanis** y a **Jesús Valencia Zataráin** por enseñarme el valor de los sueños y la increíble lucha que se debe de hacer para lograrlo. Si pudiera ponerle nombres a la palabra esfuerzo serían los suyos. Gracias también por todo ese apoyo que han venido dándome para sacarnos adelante a mi hermano y a mí. A **Jesús Valencia Lerma** por estar ahí para hacerme sonreír en el día y desestresarme (aunque a veces saliera contraproducente). A todos mis maestros por darme la formación necesaria para salir y ser competitivo con gente no solo de mi universidad sino de otros lugares. En especial a la Dra. **Adriana Garibay Escobar** y a la M. en C. **Guadalupe Cañez Carrasco**, por toda esa confianza que depositaron en mi para empezar en la investigación es por ustedes que tome el amor por esta tan bonita y satisfactoria profesión. Al departamento de **Patología experimental** del instituto nacional de ciencias medicas y nutrición Salvador Zubirán. Al Dr. **Hernández Pando** y en especial al Dr. **Jorge Alberto Barrios Payán** que más que mi tutor lo considero un gran amigo y compañero. Que me ha sabido guiar por el camino que conlleva el llevar a cabo la investigación básica y me ha aconsejado cuando más lo necesito. Al Dr. **Enrique Bolado Martínez** y a la M. en C. **Lucía Castellón Campaña** por el tiempo invertido como síndico en la revisión de mi tesis y por su desempeño como docentes en mi formación. A mi prima **Alejandra Quiroz**, a mi tía **Malú**, a mi abuela **Conchita** y a mi familia en general por el apoyo brindado durante este tiempo. A mis amigos **Carlos S, Carlos G, Erika, David, Ariel, Julia, Chino, Alfonso A, Juan B, Luis A, Humberto G, Ernesto A, Fidel C** y demás personas con las que conté en esta parte de mi vida académica.

Jorge Iván Valencia Lerma

El perfume de las flores no va contra el viento. Ni el del sándalo ni el de la rosa o el del jazmín. Sin embargo, el perfume del hombre virtuoso se extiende por todas partes y en todas direcciones.

-Buda.

## CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
OBJETIVOS	8
Objetivo General	8
Objetivos Particulares	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
Caquexia	13
Caquexia en la clínica	14
Caquexia cardíaca	15
Insuficiencia renal crónica (IRC)	15
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	16
Síndrome de anorexia y caquexia en cáncer	16
SIDA	17
Fisiopatología del estado de caquexia	18
Alteraciones metabólicas en el estado de caquexia	19
Energía	19
Factores que regulan la masa de tejido adiposo y músculo esquelético	20
Cambios en el tejido adiposo y tejido muscular	21
Factores implícitos en el catabolismo del tejido en pacientes con caquexia	21
Citocinas	22
Tejido adiposo	23
Músculo esquelético	23
Tuberculosis	25
Inmunología de la tuberculosis	28
Formación del granuloma	30

MATERIALES Y MÉTODOS	32
Preparación del inóculo de micobacterias	32
Modelo murino de tuberculosis pulmonar	32
Estrategia experimental	32
Grupo <i>ad libitum</i> infectado	33
Sanos <i>ad libitum</i>	33
Sanos a dieta	34
Registro de pesos y consumo de alimento	34
Preparación de tejido pulmonar y muscular de origen murino para histología	34
Cuento de unidades formadoras de colonias de <i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	35
Análisis morfométrico	36
Análisis estadístico	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Registro de pesos corporales y alimento consumido	37
Análisis morfométrico	40
Morfometría de tejido adiposo	41
Morfometría de tejido muscular	49
Cuento de unidades formadoras de colonias de <i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	53
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1.- Afecciones del sistema inmunológico en pacientes desnutridos	13
2.- Criterios clínicos para el diagnóstico de caquexia	14
3.- Factores de dilución necesarios para el conteo de unidades formadoras de colonias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1.- Ciclo de Cory	19
2.-El papel fisiopatológico de las citocinas en la caquexia	22
3.- Vía de señalización del proteasoma	24
4.- Principales características de la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
5.- Vías de diseminación y patogenia de la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
6.- Estructura de un granuloma	31
7.- Cinética del peso promedio de cada grupo	38
8.- Gráfica del consumo de alimento individual promedio	40
9.- Área promedio de los adipocitos del grupo sanos <i>ad libitum</i>	41
10.- Área promedio de los adipocitos del grupo <i>ad libitum</i> infectado	42
11.- Adipocitos de un ratón del grupo <i>ad libitum</i> infectado sacrificado el día 21	43
12.- Adipocitos de un ratón del grupo <i>ad libitum</i> infectado sacrificado el día 120	44
13.- Adipocitos de un ratón del grupo sanos a dieta sacrificado el día 60	45
14.- Tejido adiposo al día 21	46
15.- Tejido adiposo de un ratón del grupo sano a dieta	47
16.- Tejido adiposo del grupo <i>ad libitum</i> infectado	47
17.- Tejido adiposo presente en los tres grupos en el día 120	48
18.- Micrografía transversal de un músculo cuádriceps de un ratón sano <i>ad libitum</i>	50
19.- Micrografía transversal de un cuádriceps de un ratón del grupo sano a dieta	51
20.- Micrografía de un corte transversal de cuádriceps de un ratón infectado	51
21.- Análisis de la morfometría del músculo al día 120.	52
22.- Conteo de unidades formadoras de colonias de la cepa H37Rv aisladas de pulmón.	53

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la relación entre la pérdida de peso, consumo de alimento, daño histológico y carga bacilar en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en ratones BALB/c.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar el efecto de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en la inducción de CQX.
- Evaluar el daño tisular inducido por la restricción de alimento y la infección en los grupos experimentales.
- Establecer la carga bacilar en el grupo infectado y el efecto de ésta en relación con la pérdida de peso.

## RESUMEN

La caquexia (CQX) es la condición que ocasiona la pérdida del 5% o más del peso corporal en un año o menos en presencia de una enfermedad subyacente. La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa crónica que típicamente induce CQX. El objetivo del presente trabajo es estudiar la relación entre pérdida de peso, carga bacilar, expresión de citocinas y anormalidades fisiológicas debidas a esta condición, en un modelo murino de Tb progresiva. Se crearon 3 grupos de ratones BALB/c; un grupo sano con acceso *ad libitum* al alimento, un segundo grupo denominado *DIETA*, condicionado al alimento ingerido por un tercer grupo de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv por vía intratraqueal. Se registró el peso corporal y cantidad de alimento consumido durante 4 meses. Grupos de 5 ratones se sacrificaron en los días 21, 60 y 120, se colectaron los pulmones, hígado, tejido muscular, adiposo y cerebro; del tejido muscular y adiposo se hizo un análisis morfométrico para analizar diferencias histológicas en el haz muscular y los adipocitos. Los resultados al día 120 mostraron 18% menos peso en el grupo ~~infectado—comparándolo~~infectado comparándolo con el grupo alimentado *ad libitum*, mientras que el grupo *DIETA*, disminuyó 14% de peso. El análisis morfométrico mostró una pérdida de tejido muscular significativa, entre el grupo infectado y el grupo *DIETA*, sin ~~embargo~~embargo, se encontró una discrepancia entre la pérdida de tejido adiposo entre ambos grupos, donde el grupo *DIETA* perdió tejido adiposo desde una etapa temprana, no obstante, al final del estudio ambos grupos perdieron casi totalmente su tejido adiposo. Se concluye que en la CQX producida por Tb existen anormalidades similares a las asociadas con cáncer y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por un bacilo llamado *Mycobacterium tuberculosis* (MTb). Esta bacteria afecta comúnmente a los pulmones, sin embargo también puede afectar otros órganos, a dicha situación se le conoce como Tb extrapulmonar. La enfermedad se dispersa a través del aire cuando personas infectadas expelen la bacteria en micropartículas de saliva expulsadas por hablar o toser. En general sólo el 10% de las personas infectadas por el bacilo desarrollan la enfermedad activa pero es mucho más común en personas infectadas con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (WHO, 2013). La Tb es más frecuente en hombres que en mujeres, y afecta principalmente a personas adultas las cuales se encuentran en un grupo de edad económicamente productiva. Es por eso que esta enfermedad es un grave problema de salud mundial, ya que por su alta morbi-mortalidad causa millones de muertes cada año por lo cual es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso a nivel mundial encontrándose por debajo del VIH. Los últimos datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportan que tan solo en el 2012 se detectaron 8.6 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes (Kotler, 2000; WHO, 2013).

Cuando un individuo se infecta con MTb, genera una respuesta inmune protectora que va a consistir en la formación de lesiones inflamatorias organizadas, lo cual se conoce como granuloma. El microambiente que se desarrolla dentro de esta estructura fomenta interacciones entre las respuestas innata y adaptativa del sistema inmunológico; las cuales son críticas para la contención de las micobacterias y el mantenimiento de un estado asintomático del hospedero (Egen y col., 2008).

Dentro de este microambiente es de crucial importancia la producción de citocinas las cuales son proteínas celulares producidas por la respuesta inflamatoria para cumplir una función paracrina como mediadores intercelulares. La inflamación sistémica mediada a través del daño celular o la activación del sistema inmune desencadena una respuesta inflamatoria aguda a causa de la producción excesiva de citocinas de tipo proinflamatorio como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferón- $\gamma$ , interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), éstas son probablemente la mayor causa de caquexia CQX observada en pacientes con ciertas enfermedades como cáncer, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), Enfermedad renal crónica, y insuficiencia cardíaca (Kotler, 2000).

La CQX es la principal causa de pérdida de peso e incremento de la mortalidad, afecta a más de 5 millones de personas en Estados Unidos (Sharma y Anker, 2001). Clínicamente, se manifiesta con una pérdida de peso excesiva en presencia de una enfermedad subyacente, generalmente con una pérdida de tejido muscular desproporcionada (Morley y col, 2006). Existen otra serie de síndromes que causan pérdida de peso, como la deshidratación, la sarcopenia y la inanición, la diferencia es que en éstos se encuentra ausente una enfermedad de fondo y la recuperación de peso es muy rápida. Aunque numerosas enfermedades están asociadas con la CQX, su fisiopatología es pobremente conocida (Morley y col., 2006). Se cree que las citocinas activan el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dando como resultado un decremento en la síntesis de masa muscular (Guttridge y col., 2000). El TNF- $\alpha$  y el interferón- $\gamma$  actúan sinérgicamente para inhibir la transcripción de mensajeros del ácido ribonucleico (ARN) que codifican para las cadenas pesadas de miosina, lo cual hace que se estimule la proteólisis del citoesqueleto en la célula muscular (Acharyya y col, 2004).

En el cáncer, la CQX es un síndrome multiorgánico caracterizado por una pérdida de peso mayor al 5% de la masa corporal causada comúnmente por una respuesta inflamatoria con la consecuente pérdida de tejido muscular y tejido adiposo, en los pacientes está asociada con la reducción del rendimiento físico, la disminución de la calidad de vida provocada por un aumento en la toxicidad de las terapias y una disminución en la efectividad de las mismas dando como consecuencia la reducción de la supervivencia (Muliawati y col, 2012), esta situación no sólo se presenta en los pacientes oncológicos, sino también en los enfermos de SIDA, falla cardíaca, artritis reumatoide y EPOC (Martignoni y col., 2003).

Por todo lo mencionado anteriormente el presente trabajo tiene como fin sentar las bases del estado de caquexia de las cuales hay un pobre conocimiento científico en pacientes infectados por MTb, con el fin de buscar nuevas estrategias terapéuticas que mantengan un buen estado nutricional del hospedero para la correcta protección inmunológica contra el patógeno.

## ANTECEDENTES

La mala nutrición, en conjunto con las enfermedades infecciosas son la principal causa de la elevada morbimortalidad entre la población de los países denominados en vías de desarrollo. El estado nutricional-metabólico puede tener una influencia notable sobre la evolución de las enfermedades por agentes biológicos. Las infecciones respiratorias tienen poco efecto nocivo en el individuo bien nutrido, pero se pueden tornar mortales en el hospedero desnutrido, ya que esto interfiere directamente con la capacidad de respuesta ante los cambios bioquímicos, hormonales, metabólicos e inmunes. Sin embargo, la infección *per se* puede empeorar el ya afectado estado nutricional. Este círculo vicioso casi siempre concluye con la muerte del individuo (Penié y col., 2000).

La infección en sentido general y según el microorganismo causal, se acompaña de un grupo de respuestas de tipo bioquímico, hormonal, humoral y metabólico. El resultado neto, es un incremento significativo del metabolismo de reposo con aumento del gasto energético, algunas consecuencia son la fiebre y la anorexia que inducen una diaforesis importante con pérdida de nutrimentos y la disminución en la ingesta de alimentos respectivamente (Penié y col, 2000), esta situación se hace evidente con una notable pérdida de peso, si esta situación persiste puede generar caquexia y afectar directamente las respuestas mencionadas al principio.

En la inmunidad mediada por células, la desnutrición produce una disminución cuantitativa de los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, estudios clínicos y modelos experimentales han demostrado alteraciones y negativización de las pruebas cutáneas retardadas, cambios en la transformación blástica, la actividad bactericida, fagocítica y migratoria en presencia de mitógenos específicos. Las células fagocíticas tienen un papel protagónico en la defensa del hospedero, ya que son parte importante del reconocimiento del patógeno, el procesamiento de sus antígenos y la subsecuente quimiotaxis para su destrucción. Hasta el momento se ha logrado demostrar mediante ensayos funcionales experimentales, la alteración en la adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y capacidad microbicida de esas células en pacientes desnutridos, tanto en presencia como en ausencia de infecciones agudas (Penié y col., 2000), de esto se puede inferir que los pacientes desnutridos son muy susceptibles de sufrir infecciones por microorganismos intracelulares oportunistas como los hongos y micobacterias, infecciones virales y sepsis por gérmenes gram negativos. Por esto, los datos expuestos en la tabla 1 indican que déficits nutrimentales agudos y crónicos como el

Kwashiorkor, el marasmo, el escorbuto o el raquitismo entre otras de alguna manera influyen negativamente sobre los mecanismos de respuesta inmune del individuo incrementando la susceptibilidad a la acción de agentes patógenos, provocando que sus manifestaciones sean más graves y resistentes a la intervención terapéutica. Las características inmunológicas de un paciente en estado grave de desnutrición adoptan un patrón semejante al observado en los enfermos con VIH, cuando el padecimiento se asocia a infecciones por hongos, micobacterias y virus (Penié y col, 2000).

Tabla 1. Afecciones del sistema inmunológico en pacientes desnutridos

<b>Respuesta linfocitaria</b>	Disminución en el número y respuesta <i>in vitro</i> de los linfocitos T e inducción de anergia cutánea.
<b>Células fagocíticas: polimorfonucleares, macrófagos, monocitos</b>	Disminución de la quimiotaxis, adhesividad, fagocitosis y capacidad microbicida
<b>Inmunidad Humoral</b>	Niveles de anticuerpos normales o elevados; respuesta antigénica variable. Secreción deficiente de IgA.
<b>Sistema de complemento Sérico</b>	Actividad total del complemento disminuida. Niveles variables de componentes específicos.

(Penié y col., 2000)

### Caquexia

El término caquexia (CQX) viene del vocablo griego *kachexi'a*; *kakos*: mala e' *xis*: condición y fue descrito por primera vez por el filósofo griego Hipócrates (460-370 a.C.) el cual ligaba la notoria aparición de las clavículas, los hombros, las costillas y el adelgazamiento de los muslos con una mayor tasa de mortalidad. A pesar de que este padecimiento juega un papel muy importante en diferentes enfermedades sus bases moleculares son pobremente conocidas, lo

que está claro desde los tiempos de Hipócrates es el pobre pronóstico para el paciente que la padece (Martignoni y col., 2003).

La CQX es un estado hipermetabólico caracterizado por anorexia y pérdida de peso, asociado principalmente con la reducción de masa muscular y tejido adiposo. Clínicamente se presenta por diversas causas que interfieren directamente con el consumo de energía, como la reducción del apetito, cambios en los sentidos del gusto y del olfato y saciedad temprana, este padecimiento induce diversos cambios moleculares que afectan el estado nutricional del paciente, como el incremento en la velocidad con la que se utiliza la energía disponible, pérdida de peso, alteraciones hormonales, desgaste de tejido adiposo y tejido graso, disfuncionalidad física y fatiga (Muliawati y col., 2012).

### **Caquexia en la clínica**

Clínicamente las manifestaciones se presentan con una pérdida de peso mayor al 5% del peso del paciente, generado por distintas vías moleculares asociadas generalmente a una respuesta del hospedero a la enfermedad, (tabla 2). (Morley y col., 2006).

Tabla 2. Criterios clínicos para el diagnóstico de la caquexia.

<b>Criterio</b>
Pérdida de peso $\geq$ 5%
IMC
<20 en pacientes menores de 65 años
<22 en pacientes mayores de 65 años
Albúmina <3.5g/dL
Porcentaje de grasa corporal
(Menor al 10%)
Marcadores inflamatorios elevados (proteína C Reactiva [PCR])

(Morley y col., 2006).

La diferenciación de otros síndromes de pérdida de peso es fundamental para el reconocimiento y la gestión eficaz de la CQX. El síndrome de inanición se produce como consecuencia directa de la privación de calorías, la sarcopenia resulta principalmente de la atrofia muscular, (activación de la proteólisis de las cadenas pesadas de miosina) y la pérdida de fluido (deshidratación) representan la reducción en el peso medido (Sharma y Anker, 2001).

En general la mayoría de estas enfermedades tienen como característica común los eventos inflamatorios crónicos y la presencia de citocinas proinflamatorias (IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$ ), las cuales tienen un efecto multiorgánico y conllevan a complicaciones multisistémicas que llevan a la muerte al paciente (Sharma y Anker, 2001).

Las enfermedades más comunes que inducen CQX son:

**Caquexia cardíaca.** La excesiva elaboración de citocinas proinflamatorias está implicada en este padecimiento, algunos estudios realizados en personas de la tercera edad sin antecedentes de infarto al miocardio o insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) demostraron que estos pacientes tenían más riesgo de padecer ICC debido a un aumento en la concentración de citocinas (60% para TNF- $\alpha$  y 68% para IL-6 en suero) estableciendo una relación entre las concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  con un pobre estado funcional en pacientes con esta enfermedad. En estos pacientes, la reversión de la pérdida de peso predice mejores resultados con el tratamiento. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina reducen las concentraciones circulantes de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 disminuyendo el riesgo de la pérdida de peso, gracias a que la angiotensina II ejerce un efecto proinflamatorio en los leucocitos, células endoteliales y células del músculo liso vascular (Dhindsa y col., 2003).

**Insuficiencia renal crónica (IRC).** Más del 25% de los pacientes que están en tratamiento con hemodiálisis están malnutridos y pueden padecer de inanición y CQX. La primera es causada por un pobre consumo de energía y es caracterizado por concentraciones normales de albúmina y ausencia de un proceso inflamatorio, la segunda está asociada con inflamación sistémica, procesos proteolíticos y un gran estrés oxidativo, afecta a pacientes con concentraciones séricas elevadas de proteína C reactiva, citocinas e hipoalbuminemia (Morley y col., 2006).

Las teorías patogénicas de la malnutrición en la IRC implican hipercatabolismo y anorexia, la primera se atribuye a citocinas proinflamatorias asociadas con problemas de

vasodilatación o vasoconstricción causados por la aldosterona II provocando una menor ingesta de alimentos, mientras que la segunda está relacionada con citocinas asociadas principalmente a procesos inflamatorios y que tienen efecto en el sistema nervioso central (SNC) a nivel de hipotálamo, en el hígado en las glándulas suprarrenales y en el músculo (Dhindsa y col., 2003).

**Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).** La pérdida de peso en pacientes con EPOC está asociada con debilidad muscular, disfunción del diafragma, falla respiratoria, pobre calidad de vida y muerte. Los factores incluyen el hipercatabolismo, medicación y anorexia. Clínicamente los pacientes con EPOC estables y con pérdida de peso tienen niveles altos de TNF- $\alpha$ , lo que ocasiona la pérdida de apetito y una subsecuente pérdida de peso (Wang y Whim, 2013). El TNF- $\alpha$  antiguamente llamado caquexina, es producido por una gran variedad de células del sistema inmune y junto a IL-1 e IL-6 dirigen la inducción de una respuesta de fase aguda, en la cual se incluye la producción de proteína C reactiva (PCR). Es bien conocido que en pacientes con cáncer la exposición prolongada a TNF- $\alpha$  contribuye al desarrollo de CQX (Eagan y col., 2012). La inactividad, la inflamación sistémica, el estrés oxidativo, la hipoxia y el aumento de la apoptosis en el músculo esquelético entre otras son considerados factores patogénicos. La hipoxia y la inflamación sistémica son inductores de la sobreexpresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) a través del factor nuclear de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que puede constituir un mecanismo molecular que inicia la caquexia debido a que la sobreexpresión de iNOS puede causar nitrotirosinación y favorecer la degradación de proteínas a través de la vía de la ubiquitin-proteasoma y causar apoptosis en las células del músculo esquelético (Agusti y col., 2002).

**Síndrome de anorexia y caquexia en cáncer.** La pérdida de peso es un síntoma que indica un pobre pronóstico en el 40% de los pacientes con cáncer (Hopkinson y cols., 2008; Sosa-Sanchez y cols., 2008). La producción de citocinas en enfermedades malignas incrementa el factor liberador de corticotrofina, un poderoso agente anoréctico que en conjunto con las prostaglandinas del tipo E (PGE1) suprimen la producción del agente orexigénico neuropéptido Y, el cual produce la sensación de apetito a nivel de SNC, específicamente en el hipotálamo donde se encuentran sus receptores. Por otra parte, las citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 inducen el retraso en el vaciado gástrico, disminuyendo las concentraciones de albúmina sérica y aumentando la lipólisis a nivel hepático, mientras que la resistencia a la insulina en las células

del músculo esquelético, eleva la concentración de glucosa en sangre. Estas acciones en conjunto generan un desbalance energético que causa la elevación de cortisol debido al estrés metabólico causado (Morley y col, 2006). El factor movilizador de lípidos Zinc  $\alpha$ 2 glicoproteína (ZAG-2) activa la respuesta del AMP cíclico en adipocitos, lo que genera un aumento en los ácidos grasos libres y glicerol (Morley y col, 2006) resultantes del metabolismo de triglicéridos que posteriormente serán degradados por las enzimas de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos para generar energía (Mathews y col, 2002).

**SIDA.** Entre las causas de pérdida de peso más comunes en este padecimiento están la anorexia, la depresión, la medicación, infecciones coexistentes y una variedad de enfermedades gastrointestinales. Los pacientes con concentraciones elevadas del receptor 2 del TNF- $\alpha$  son resistentes a los efectos anabólicos del tratamiento para aumentar la masa muscular. Se ha reportado en la literatura una elevación de citocinas proinflamatorias en las enfermedades ya expuestas, sin embargo hay otras biomoléculas que al afectarse su concentración, reconocimiento, transporte o utilización generan CQX (Morley y col., 2006), por lo que al igual que en el cáncer, en pacientes con SIDA la pérdida de peso tiene un origen multifactorial (Álvarez Hernández, 1996). Los factores que pueden contribuir a la pérdida de peso incluyen: mala absorción, diarrea, descenso del aporte calórico, infecciones o enfermedades neoplásicas que afectan el tracto gastrointestinal e incrementos en los requerimientos calóricos por fiebre, infección y estado hipermetabólico (Von Roenn y col, 1990). Está ampliamente aceptado que la anorexia es la que más contribuye a la inducción de CQX en pacientes VIH positivos (Von Roenn y col, 1992).

La diarrea aparece en el 50% de los pacientes con VIH y a menudo se acompaña de peso bajo, malnutrición y malestar, es difícil de tratar y contribuye al deterioro físico, en algunos casos la muerte se produce por la deshidratación que causa (Von Roenn y col, 1992), otra consecuencia es que disminuye la ingesta de comida, ya sea porque los pacientes quieren reducir las deposiciones fecales mediante la restricción de la comida o porque hay supresión específica del apetito como respuesta a la presencia de nutrientes inabsorbibles en el intestino bajo (Summerbell, 1994).

En pacientes con enfermedad aguda sistémica se han encontrado incrementos en los ritmos metabólicos de un 20-60% sobre los valores esperados. Los procesos fútiles que dan lugar a un uso inapropiado de los sustratos y a la falta de acoplamiento de los procesos de formación de energía (Grunfeld y Feingold, 1992a). El nivel del gasto energético basal está

elevado tempranamente en el curso de la infección por VIH y se incrementa posteriormente en la fase de SIDA (Grunfeld y Feingold, 1992a), se eleva incluso en pacientes asintomáticos con niveles normales de células CD4+ (Grunfeld y Feingold, 1992b), lo cual sugiere que el sistema inmune está combatiendo la infección por el virus incluso cuando parece estar latente. La síntesis hepática de ácidos grasos está incrementada, así como los niveles circulantes de ácidos grasos libres, sugiriendo que la lipólisis incrementada puede contribuir a la producción de lipoproteínas de muy baja densidad. En los pacientes con SIDA se ha visto que los niveles elevados del TNF movilizan los ácidos grasos libres por estimulación de la lipólisis periférica, estos ácidos son reesterificados posteriormente a triglicéridos en el hígado y entran a formar parte de ciclos fútiles (Grunfeld y Feingold, 1992a).

### **Fisiopatología de la caquexia**

En el caso de pacientes oncológicos en fase avanzada la CQX es categorizada en dos grupos: primaria y secundaria (Muliawati y col, 2012). La primera está dada por los cambios metabólicos inducidos por el tumor, ya que genera por si mismo productos que descontrolan la reparación tisular normal, el catabolismo es acelerado mientras que el anabolismo es lento, provocando una pérdida de tejido (Brusik y col, 2012). Además, el cáncer desencadena una respuesta inflamatoria sistémica, que incluye una tasa metabólica elevada y liberación de productos de naturaleza proteica como leptina y las citocinas proinflamatorias que suprimen el apetito y provocan saciedad temprana, la consecuencia de estas alteraciones metabólicas es la anorexia que conduce a la pérdida de masa muscular y de tejido adiposo (Brusik y col., 2012).;

La caquexia secundaria es causada por factores que comprometen la ingesta dietética que conducen a la desnutrición como náuseas, vómitos, estomatitis, dolores localizados, úlceras, anomalías del gusto y el olfato, así como otros problemas inducidos por la quimioterapia como la diarrea o la constipación, la fatiga y la obstrucción mecánica en el caso de tumores que ocluyen el esófago (Hopkinson y col, 2008).

La CQX en un paciente enfermo es un cuadro muy fácil de reconocer a simple vista y que frecuentemente se acompaña de otros síntomas que agravan el malestar y contribuyen a deteriorar la calidad de vida (Bindels y Delzenne, 2013). Tal vez la asociación de síntomas más clara es el conjunto de anorexia y caquexia que terminan por formar un verdadero círculo vicioso, con mayor deterioro nutricional y mayor fatigabilidad, a esto se le conoce como síndrome de anorexia/caquexia en cáncer, síndrome de desgaste en pacientes con SIDA y

sarcopenia para la pérdida de masa muscular en ancianos. Pese a su origen totalmente distinto, comparten mecanismos comunes, incluyendo el suceder en un escenario de cambios inflamatorios (Kotler, 2000).

### Alteraciones metabólicas en el estado de caquexia

**Energía.** En la CQX los ciclos fútiles se incrementan. Uno de los fenómenos constantes es el aumento del gasto energético basal (en relación a la grasa magra), es decir hay hipermetabolismo. Otro factor notable es el aumento de la expresión de las proteínas de desacoplamiento mitocondrial (UCP1, UCP2, UCP3) que provocan un cambio en la relación normal de producción energética en la mitocondria, con la consiguiente disipación de energía como calor. Esto es acentuado por el factor movilizador de lípidos ZAG-2 (Bing y cols., 2004). Otro ciclo fútil que representa una pérdida de energía de al menos 300 kcal/día es el ciclo de Cory (Eden y col, 1984), en estos pacientes hay un importante gasto de glucosa que es convertida en lactato, debido a que la tensión de oxígeno es muy baja como para que el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa operen. El lactato producido circula hacia el hígado y es reconvertido en glucosa en un proceso conocido como el ciclo de Cory (Figura1).

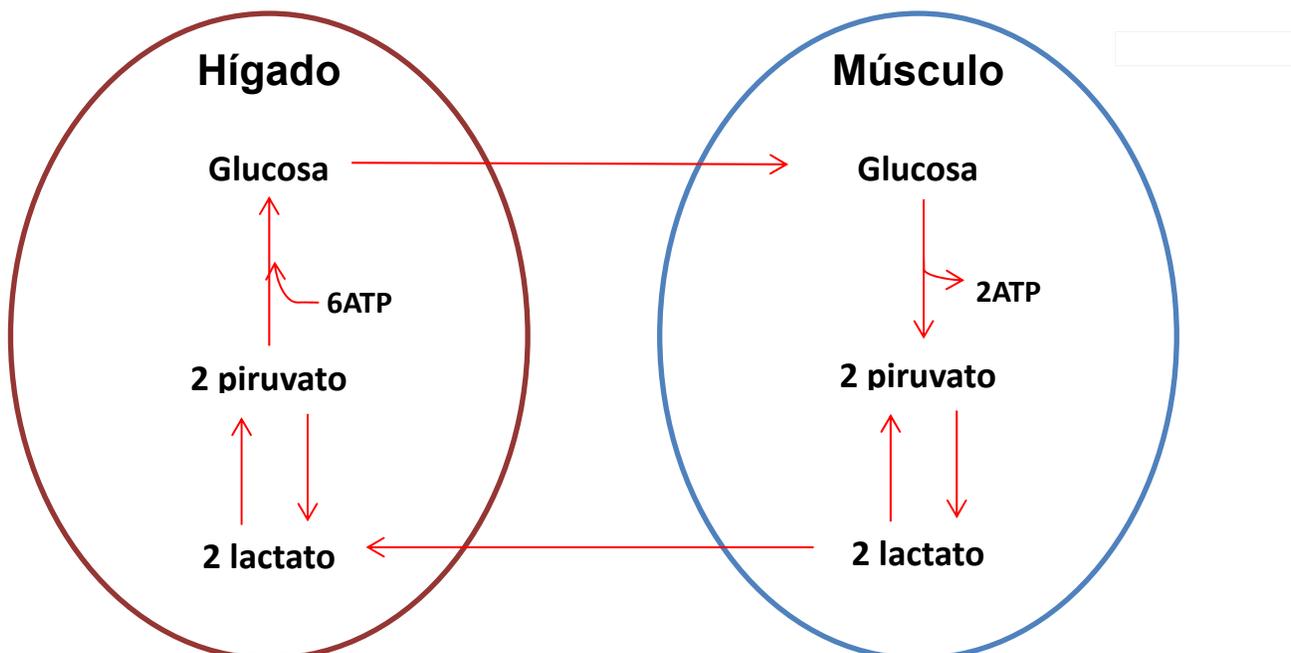


Figura 1 Ciclo de Cory. Vía anaerobia de fermentación de la glucosa la cual conlleva un gasto neto de energía de 4 ATP.

Este ciclo es responsable del 20% de la conversión de glucosa (Lehninger, 1995), sin embargo, en la CQX se ha demostrado un incremento en su participación del 50%. La gluconeogénesis usa 6 moléculas de ATP por cada ciclo lactato glucosa y es muy ineficiente para el hospedero, contribuyendo de esta manera a la pérdida de peso (Holroyde y col, 1975).

ZAG-2 es una glicoproteína de 43-kDa que está ligada fuertemente como un mediador de la CQX en pacientes con cáncer. Las funciones biológicas de esta glicoproteína son pobremente conocidas, no obstante, se ha comprobado que su actividad inicia gracias a la lipasa sensible a hormonas que es activada por un incremento de AMP cíclico encontrado dentro de los adipocitos. Recientemente se han realizado estudios con el antagonista SR59230 que bloquea los adrenorreceptores  $\beta_3$  indicando que la actividad de ZAG-2 está mediada por receptores  $\beta$  adrenérgicos (Russell y col, 2002).

Otro mecanismo que incrementa el gasto energético es la expresión mitocondrial de las proteínas desacopladas (UCP). Estas son proteínas translocadoras de protones a través de la membrana mitocondrial en un proceso desacoplado de la fosforilación de ADP, esa energía es perdida como calor. La UCP1 es la proteína principal de este grupo, se encuentra en el tejido adiposo café y la UCP3 se encuentra solo en tejido adiposo y músculo esquelético (Shellock y col, 1986).

**Factores que regulan la masa de tejido adiposo y músculo esquelético.** La masa de tejido adiposo es determinante en la síntesis de triglicéridos para la circulación de lipoproteínas, el rango de hidrólisis de ácidos grasos y glicerol. La enzima lipoproteinlipasa (LPL) está encargada en la extracción de ácidos grasos de las lipoproteínas plasmáticas y el rango de síntesis está determinado por los sustratos provenientes del hígado. La grasa tiene el valor calórico más alto de todas las macromoléculas (Lehninger, 1995), por lo que la demanda energética está compensada por la hidrólisis de triglicéridos por la hormona sensible a lipasa (HSL) que es regulada por los niveles de AMP cíclico (Russell y col, 2002).

El músculo esquelético contiene la mayor parte de las proteínas del cuerpo, éste no actúa como almacén de energía como es el caso del tejido adiposo en condiciones normales. En todos los casos la atrofia muscular, se presenta como un incremento en la expresión y actividad de la vía proteolítica de la ubiquitin proteasoma. En este proceso las proteínas son marcadas para la degradación por la poliubiquitina, ésta es reconocida por la subunidad 26S, la proteína es entonces convertida a pequeños oligopéptidos por pequeñas proteínas residentes de la superficie de la subunidad 20S (Lecker y col, 1999).

## **Cambios en el tejido adiposo y el tejido muscular.**

Las altas concentraciones de glicerol en el torrente sanguíneo son evidencia de un incremento en la lipólisis de la vacuola de triglicéridos que se encuentra en los adipocitos. Los ácidos grasos son rápidamente oxidados en el hígado después de haber sido transportados unidos a albúmina, lo que aumenta un 20% la oxidación que se lleva a cabo en sujetos sanos, el aumento de estos ácidos grasos funciona como una búsqueda de energía en el tejido adiposo café para la alimentación de ciclos metabólicos fútiles para la obtención de energía (Thompson y col, 1993).

Estudios realizados en pacientes con cáncer muestran evidencia de un decremento en la síntesis de proteínas del músculo esquelético (Emery y col, 1984) y un incremento en la degradación de las mismas (Lundholm y col, 1976), el proceso de la síntesis de proteínas requiere de un balance correcto de aminoácidos, sin embargo, la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR y la proteína amiloide sérica generan un desbalance en su síntesis en hígado debido a que requieren una gran cantidad de aminoácidos sulfatados (Reeds y col, 1994), esto disminuye las concentraciones de las cadenas de aminoácidos en el plasma, reduciendo los estímulos para la síntesis de proteínas en músculo, no obstante, la suplementación nutricional o la administración de estimulantes del apetito como el acetato de megestrol no presentan efectos favorables para la recuperación de la masa corporal perdida en pacientes en estado de CQX (Loprinzi y col, 1993), esto sugiere que un estímulo catabólico es mayor o supera a la disminución en el anabolismo, sin defectos específicos en la maquinaria de síntesis de proteínas.

## **Factores implícitos en el catabolismo del tejido en pacientes con caquexia.**

Algunas moléculas expresadas por el hospedero, juegan un papel crítico en la pérdida de tejido, estas moléculas incluyen citocinas como el TNF- $\alpha$ , el INF- $\gamma$  y las interleucinas 1 y 6, el Factor lipolítico ZAG-2 y el factor inductor de proteólisis lo cual trae como consecuencia la pérdida de peso y todas las complicaciones clínicas antes mencionadas (Morley y col., 2006).

**Citocinas.** Las citocinas son proteínas asociadas a las células con función de mediadores intercelulares. La inflamación sistémica mediada a través del daño celular o la activación del sistema inmune desencadena una respuesta inflamatoria aguda que causa una elaboración excesiva de estas proteínas. Las citocinas juegan un papel importante en la inmunomodulación y están implicadas en la etiología de la anorexia, la pérdida de peso, la disfunción cognitiva, anemia y debilidad. La producción excesiva de IL-1 e IL-6, INF- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  son la causa más común de CQX observada en pacientes enfermos (figura 2). Una de las similitudes entre la pérdida de peso en el cáncer, la inflamación, la infección y el daño tisular es el desarrollo de una respuesta de fase aguda en la que el hígado cambia la síntesis de albúmina por la producción de PCR, fibrinógeno y antitripsina, los pacientes con cáncer pulmonar presentan un incremento de PCR asociada a la pérdida de masa corporal (McMillan y col, 1998). Los mecanismos implícitos en el desgaste de tejidos inducidos por citocinas son los siguientes.

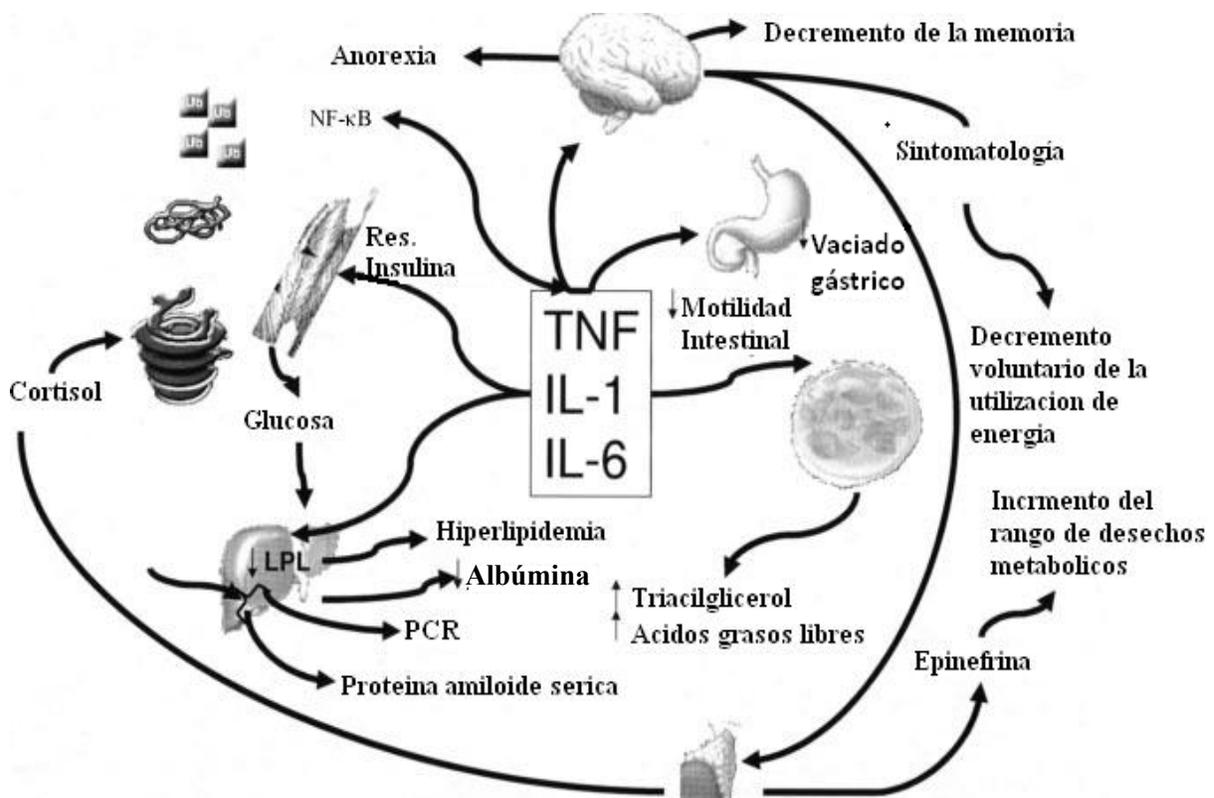


Figura 2. El papel fisiopatológico de las citocinas en la producción de caquexia. TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; IL-1, interleucina 1; IL-6, interleucina 6; PCR, proteína C reactiva; LPL, lipólisis (Morley y col., 2006).

**Tejido adiposo.** Todas las citocinas inhiben la enzima LPL, con diferente intensidad. Esto originalmente sugería que la pérdida de tejido adiposo en pacientes con CQX se debía a la nueva síntesis de triglicéridos, sin embargo, la inhibición de la enzima LPL no tiene un efecto considerable en las reservas de lípidos, ya que la hiperlipidemia tipo 1 es causada por la deficiencia hereditaria de esta enzima, por lo que el tejido adiposo es normal y no presenta la atrofia característica de la CQX. (Thompson y col., 1993). Se ha reportado que el TNF- $\alpha$  suele estimular la termogénesis en ratas, lo que incrementa la expresión del mensajero de UCP2 y UCP3 en el músculo esquelético (Moore y col., 2005), proporcionando una ruta de oxidación y movilidad de ácidos grasos.

**Músculo esquelético.** El tratamiento a base de pentoxifilina (inhibidor de la síntesis de TNF- $\alpha$ ) o suramin (bloqueador del efecto periférico de citocinas como el TNF- $\alpha$  e IL-6) a ratas con hepatomas, ha demostrado que previenen la pérdida de masa muscular y reduce significativamente la actividad del proteasoma (Costelli y col., 2002), sin embargo, en la literatura existen reportes de que el uso de pentoxifilina suprime la síntesis de TNF- $\alpha$  en humanos pero carece de efectividad en el tratamiento de la anorexia y la CQX (Goldberg y col., 1995).

Se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  induce un incremento en la expresión del gen de la ubiquitina en exposiciones prolongadas *in vitro* (Llovera y col., 1997), mientras que la transcripción de NF- $\kappa$ B induce la pérdida de proteínas (Li y Reid, 2000), estos reportes muestran sinergismo entre estas citocinas en la expresión del gen (figura 3), no obstante, en ocasiones el TNF- $\alpha$  o INF- $\gamma$  por si solos tienen un efecto mínimo en la expresión de las cadenas pesadas de miosina en los miotúbulos murinos, pero en conjunto reducen la transcripción de ARN mensajero para la síntesis de esta proteína (Acharyya y col., 2004).

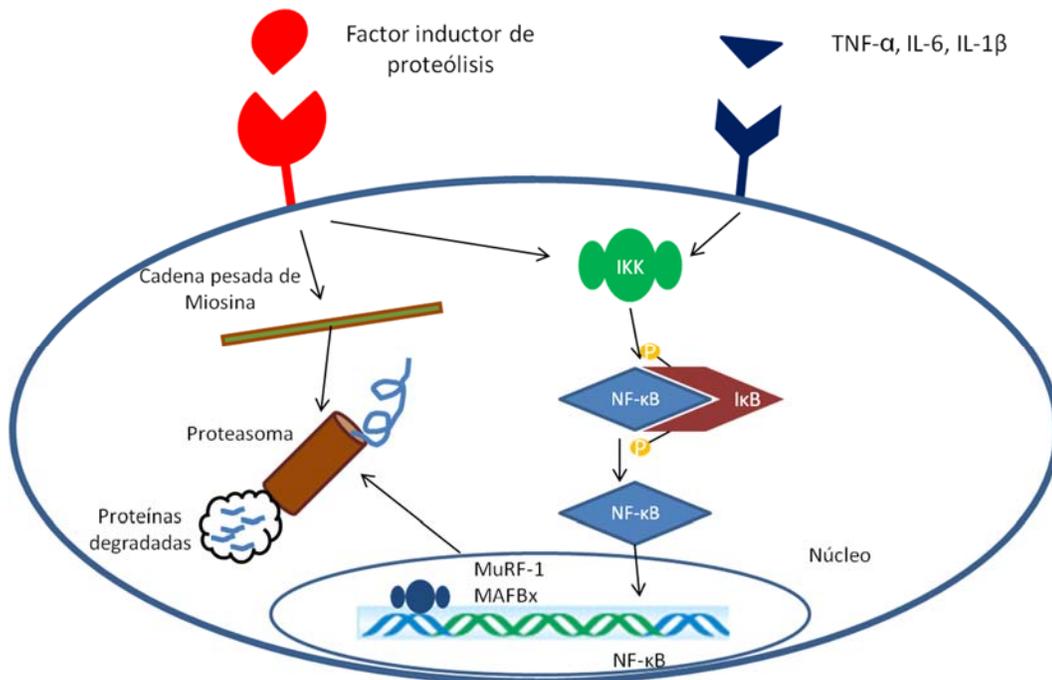


Figura 3. Vía de señalización del proteasoma. Cascada de activación inducida por el TNF- $\alpha$  y otras citocinas y el factor inductor de proteólisis.

El comportamiento de la enfermedad es atribuido a los efectos periféricos y centrales mediados por citocinas en el sistema nervioso central los cuales generan apatía, malestar y anhedonia, comprometiendo seriamente el consumo de energía (Morley y col., 2006). La CQX es una característica representativa de los pacientes con Tb ya que aproximadamente dos tercios de ellos, presentan una dramática pérdida de peso con las consecuencias ya conocidas, un pronóstico pobre y la elevación del riesgo de mortalidad en pacientes que no reciben tratamiento o éste es inadecuado (Chang y col., 2013), por otra parte, la mayoría de los pacientes presentan una mejoría clínica y una ganancia de peso después de algunas semanas de iniciado el tratamiento (Evans y col., 2008).

## Tuberculosis

A pesar que la Tb es considerada desde 1993 un problema de salud pública a nivel mundial, en el 2012 se reportaron 8.6 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes por la enfermedad (WHO, 2013); se estima que dos terceras partes de los pacientes con enfermedad activa también padecen CQX (Chang y col., 2013). La marcada malnutrición que sufren los infectados por MTb está considerada como un factor de riesgo similar a los trastornos metabólicos ocasionados por la diabetes y la obesidad, que predisponen al desarrollo de la enfermedad activa o a la reactivación en el caso de la Tb latente (Barrios-Payan y col., 2012) por las deficiencias que causan en el sistema inmunológico. El problema mundial de salud pública que representa Tb aunado al padecimiento de CQX, ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar estudios que favorezcan el asentamiento de las bases moleculares de esta enfermedad.

La Tb es una enfermedad infectocontagiosa cuyo agente causal es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* un bacilo aerobio obligado, sin movilidad, de crecimiento muy lento, y que no produce cápsula de polisacáridos. Su envoltura celular es poco usual, presenta una membrana citoplasmática cubierta por una extensa capa de péptidoglicano unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con ácidos micólicos. Lo cual, le brinda una apariencia cerosa, le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a un buen número de antibióticos y tinciones habituales. Sin embargo, ésta es una de las propiedades que le da afinidad por la tinción de Ziehl Neelsen. La Tb se transmite de persona a persona cuando un enfermo tose, estornuda o escupe, éste expulsa bacilos al aire en forma de aerosoles conformados por pequeñas gotas de saliva de entre 1 y 2 mm de diámetro en las que viajan las bacterias (Kaufmann, 2001). Basta con que una persona inhale unos bacilos para quedar infectada. Tradicionalmente su órgano blanco son los pulmones y la enfermedad se conoce como Tb pulmonar, sin embargo, puede afectar otros órganos lo cual se conoce como Tb extrapulmonar (Barrios-Payan y col., 2012).

Se estima que una tercera parte de la población mundial tiene Tb latente; es decir, están infectadas por el bacilo pero no han enfermado ni pueden transmitir la infección. Estas personas tienen un riesgo de vida de desarrollar la enfermedad activa de un 10% (WHO, 2013). Sin embargo, este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunológico está dañado, como ocurre en casos de infección por el VIH, malnutrición o diabetes, en quienes consumen tabaco e hipertensos (figura 4).

Cuando la forma activa de la enfermedad se presenta, los síntomas son: tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etc., pueden ser leves durante muchos meses, esta situación favorece que los pacientes tarden en buscar atención médica y durante ese periodo son bacilíferos y diseminan la bacteria a otras personas. A lo largo de un año, un enfermo tuberculoso puede infectar entre 10 y 15 personas por contacto estrecho (figura 4). Si las personas infectadas no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos tuberculosos mueren (WHO, 2013).

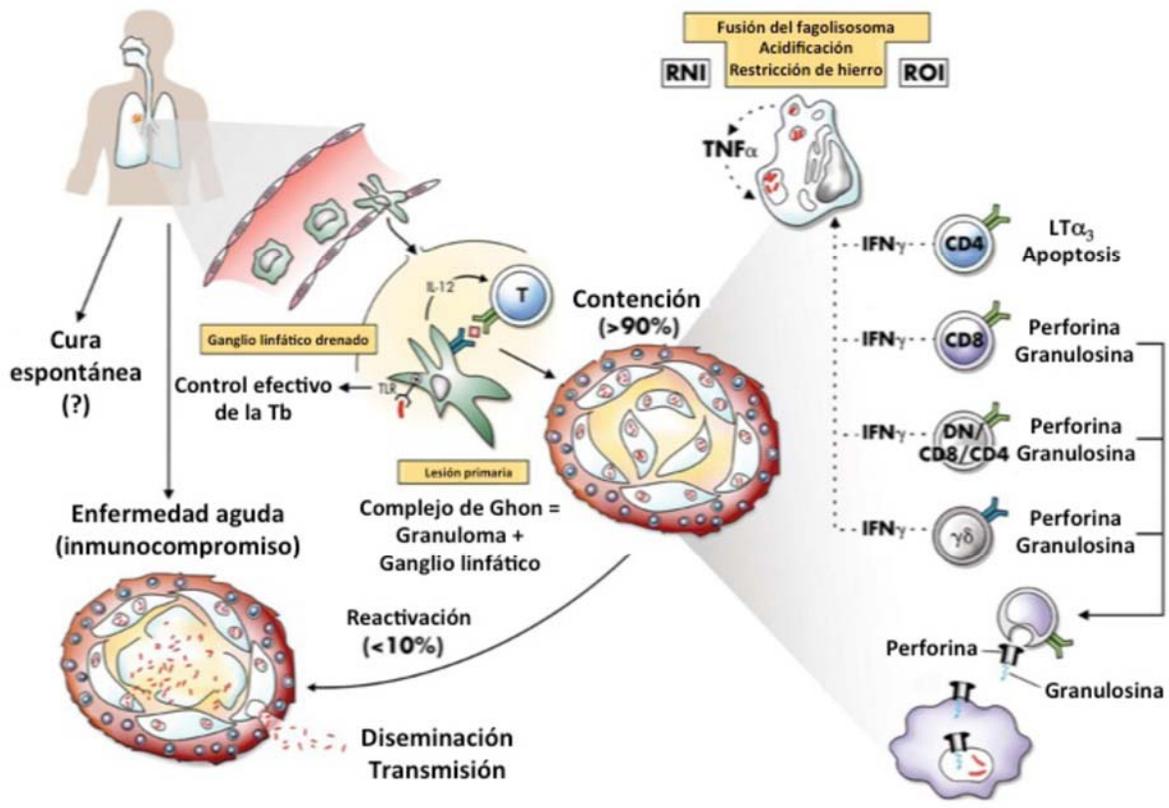


Figura 4. Principales características de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. De la infección a la defensa del huésped. Éstas son las 3 posibles vías de la infección de MTb. A) la frecuencia de la cura espontánea a la infección es desconocida, pero se asume que es en un minuto. B) En el hospedero inmunocomprometido, la enfermedad puede desarrollarse directamente después de la infección. C) En la mayor parte de los casos, la micobacteria es contenida en un granuloma y la enfermedad puede desarrollarse después en una reactivación. El granuloma es el sitio de la infección, persistencia, patología y protección (Kaufmann, 2001).

## Inmunología de la tuberculosis

En la primoinfección los bacilos se multiplican lentamente en los pulmones, donde sólo producen una leve inflamación y los macrófagos alveolares contienen la infección, las personas con infección latente son asintomáticas, las bacterias sobreviven en los pulmones y otros órganos por un largo periodo de tiempo disminuyendo su metabolismo y tasa de replicación. El 10% de esos pacientes pueden cursar por un proceso de reactivación en un lapso de tiempo que comprende dos años posteriores al contacto (figura 5).

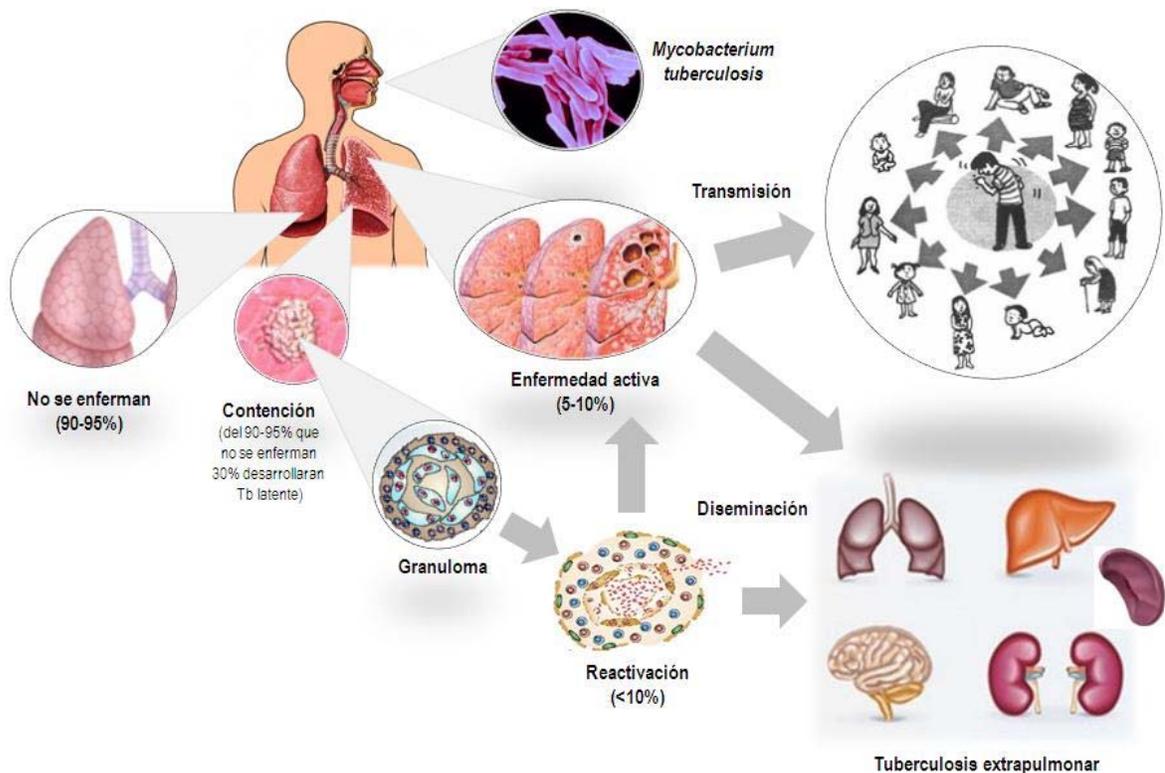


Figura 5. Vías de diseminación y patogenia de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Del 90-95% de los infectados no enferman de esos del 90-95% llevan a cabo la formación de un granuloma y de ellos el 30% desarrollan estado de latencia de estos en un proceso de inmunosupresión aproximadamente el 10% reactivan la infección la cual se disemina a otros órganos o se transmite a la población.

MTb usa preferente macrófagos como su hábitat, esto tiene dos implicaciones importantes para su supervivencia, primeramente, los macrófagos son células fagocíticas profesionales que están dotadas de varios receptores de superficie que facilitan la captación de antígenos como receptores de manosa, receptores para lipopolisacárido, CD38, etc., de este modo, se lleva a cabo el primer paso para la invasión del hospedero, en segundo lugar: están sus sofisticados mecanismos de replicación, el bacilo sobrevive dentro del fagosoma, evitando su maduración en una fase temprana previniendo la formación del fagolisosoma por medio de la proteína llamada TACO (proteína de membrana triptófano aspartato) (Kaufmann, 2001).

Dentro del fagosoma MTb asegura un acceso a la maquinaria presentadora de antígeno MHC de clase II la cual utiliza para iniciar el reclutamiento celular para la formación del granuloma. Los linfocitos T CD4+ cooperadores son específicos en contra del bacilo, son potentes productores de INF- $\gamma$ , el cual es un factor de activación central de células con actividad antimicobacteriana a través de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en macrófagos y es considerado crucial para la protección contra la Tb (Abbas, 2010).

Unos seis a ocho días después, la infección alcanza los ganglios linfáticos regionales, con la consiguiente activación de los linfocitos T CD4+ y T CD8+. (Abbas, 2010). Estos linfocitos T producen TNF- $\alpha$  que es un promotor de la inflamación, activa a los macrófagos y potencia su capacidad para destruir a los bacilos fagocitados, también participa en la activación local de los macrófagos. Se ha demostrado de forma experimental en trabajos con ratones sin el receptor para TNF se vuelven muy susceptibles a las infecciones micobacterianas, la reacción de los linfocitos T es adecuada para controlar la propagación del microorganismo, sin embargo, el bacilo sobrevive dentro de los macrófagos. (Abbas, 2010). La importancia del TNF- $\alpha$  en humanos, radica en su participación durante la formación y mantenimiento del granuloma, los pacientes que padecen alguna enfermedad que requiere tratamiento anti-TNF- $\alpha$  tienen un incremento en el riesgo de reactivación (Kaufmann, 2001).

Por otra parte, se ha comprobado que el TNF- $\alpha$  tiene un papel ambiguo ya que varios síntomas de la Tb como la fiebre, la pérdida de peso y el daño tisular, recaen dentro de los efectos patológicos de esta citocina. Los pacientes con Tb que reciben un tratamiento con Talidomida mostraron una menor sintomatología y una rápida recuperación de peso, lo que sigue una participación paradójica de esta citocina en la inmunopatología de la Tb. Esta actividad ambigua podría definirse por el patrón de citocinas predominantes Th1 o Th2. (Hernandez-Pando y col., 1997). Por lo tanto, una posible explicación a la paradoja de TNF- $\alpha$  se puede proponer que: se libera en un sitio inflamatorio mediado casi por completo por Th1, donde puede actuar simplemente como activador de los macrófagos, pero, cuando se libera en

un sitio donde la respuesta es mixta Th1/Th2 con alta concentración de IL-4 causa daño (Hernandez-Pando y col., 2004).

**Formación del granuloma.** La Tb es un ejemplo de infección por una bacteria intracelular en la que coexisten inmunidad protectora e hipersensibilidad patológica y en la que las lesiones se deben fundamentalmente a la respuesta inmunológica del huésped. La activación continua de los linfocitos T conduce a la formación de granulomas, cuya función es la de contener y/o eliminar al bacilo (Abbas, 2010).

Un granuloma es en su expresión más básica, un agregado de linfocitos, neutrófilos y macrófagos maduros que responden a un estímulo persistente, estas últimas se caracterizan por un incremento en su espacio citoplasmático y un aumento en el número de organelos y ondulaciones en sus membranas, que las hace más fagocíticas y microbicidas (Kumar, 2010).

Los macrófagos del granuloma pueden convertirse en células gigantes multinucleadas o diferenciarse a células espumosas, las cuales están caracterizadas por una acumulación de lípidos. Particularmente en el granuloma, los macrófagos maduros pueden experimentar una transformación a células epiteloideas las cuales, tienen membranas celulares interdigitadas como cremalleras para unirse a las células adyacentes, estas células rodean el granuloma de manera que también participan en su formación (figura 6). Dentro del granuloma pueden existir áreas de necrosis caseosa principalmente compuesta por detritos celulares. El término “caseoso” es derivado de la apariencia blanca que toma esa área de necrosis parecida al queso (Kumar, 2010). Otro tipo de células que se encuentran en el granuloma son: neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B y T, células NK, fibroblastos y células secretoras de componentes de la matriz extracelular. Las células epiteloideas pueden fagocitar pero en algunos casos no contienen ninguna bacteria en ellas. Los macrófagos también pueden fusionarse entre ellos para dar lugar a las células gigantes multinucleadas o diferenciarse a células espumosas que se han observado con más frecuencia en el borde del centro necrótico de un tuberculoma maduro (Ramakrishnan, 2012).

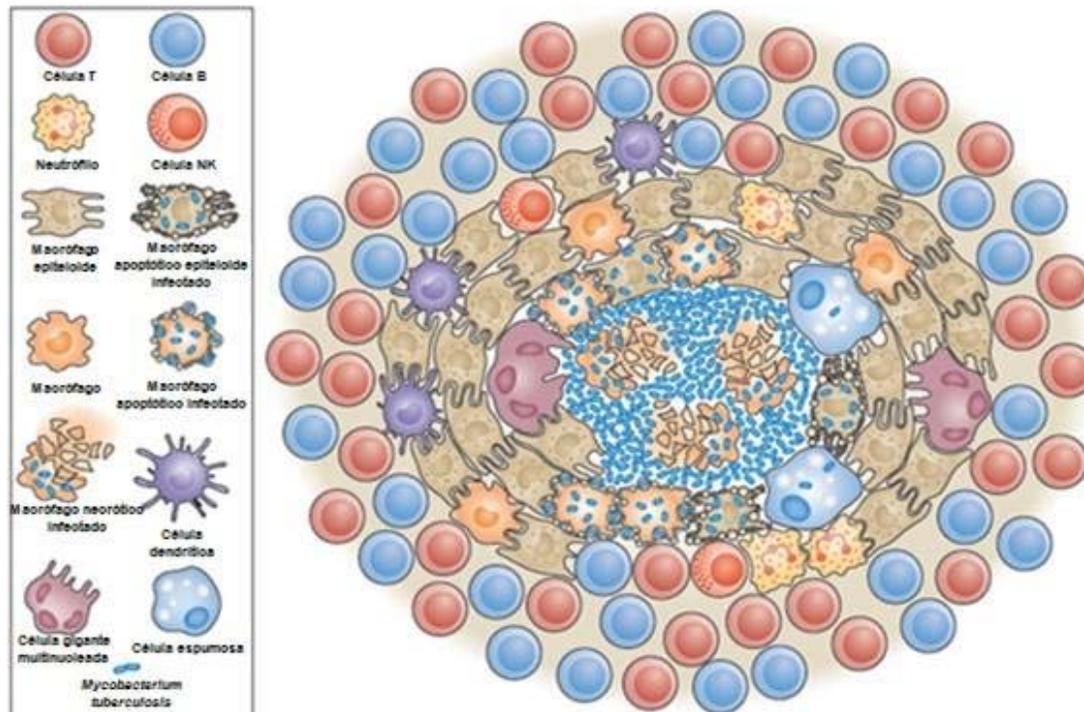


Figura 6. Estructura de un granuloma. Éste es conformado por un cúmulo de varias estirpes celulares perfectamente organizadas para la contención y eliminación del bacilo.(Ramakrishnan, 2012).

Los macrófagos alveolares (MA) son la primera línea de defensa contra MTb poseen diferentes mecanismos efectores por medio de los cuales controlan el crecimiento de las micobacterias, entre ellos se encuentran la fusión fagolisosomal, la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno. Los MA también secretan citocinas inflamatorias que inducen la producción de óxido nítrico (ON), uno de los principales mecanismos contra MTb, por otra parte, también producen TNF que está involucrado con el control de la infección, participa en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), interviene en la migración celular, así como en la localización de MTb en los tejidos y promueve la formación, organización y mantenimiento del granuloma. La producción de ON por los MA es considerado un eficiente mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares, sin embargo, en la literatura hay reportes que indican que la presencia de iNOS/TNF en la infección puede inducir caquexia en pacientes con EPOC (Agusti y col., 2004).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del inóculo de micobacterias

La cepa *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* fue cultivada en agar líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO™, USA) enriquecido con glicerol (JT BAKER™, USA) y albúmina, dextrosa catalasa (BECTON DICKINSON™, USA), en agitación a 100 rpm, durante 21 días a 37°C con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. El inóculo para infectar a los ratones fue de 250,000 UFC suspendidas en 100 µL de solución salina isotónica estéril (Barrios-Payan y col., 2012) (FRESENIUS KABI™, México).

### Modelo murino

Se utilizaron 60 ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad con un peso inicial aproximado de 22 gramos, se mantuvieron con ciclo circadiano de 12 horas a 25 °C aproximadamente.

### Estrategia experimental.

Se hicieron dos grupos de 10 ratones por microaislador para cada grupo de estudio y se alojaron dentro de un sistema de ventilación individual de presión positiva (ALLENTOWN™, USA) las cajas se etiquetaron con el nombre de los grupos (infectados *ad libitum*, sanos a dieta y sanos *ad libitum*). Cada ratón fue identificado con un código de perforaciones en el pabellón auricular, cada perforación fue correspondiente a un número del 1 al 20. Se realizaron 3 sacrificios en los días 21, 60, 120 postinfección, sacrificando 5 ratones por grupo/día.

Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados con éter anhidro (JT BAKER™, USA) y se hizo un corte en el plexo braquial para cortar la vena subclavia e inducir la muerte por exanguinación, la sangre fue recolectada en un tubo cónico de 1.5 mL (EPPENDORF™, USA). Se hizo una pequeña incisión a la altura del pubis, seguida de un corte longitudinal por la línea

media hasta la garganta del ratón, se separaron los planos de piel y se cortó la capa muscular desde el pubis hasta el apófisis xifoides para exponer la cavidad peritoneal y torácica, posteriormente se recolectó el bazo, hígado, tejido adiposo peritesticular, pulmones y el músculo cuádriceps, todas las muestras se colocaron en criotubos estériles de 2 mL (CORNING™, USA) y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido, también se colectaron las cabezas de los ratones haciendo un corte en la base del cuello, se colocaron en hielo para su conservación y poder trasladarlas al final del sacrificio al departamento de neuroinmunoendocrinología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente” con la Dra. María Eugenia Hernández, experta en la disección para la extracción del hipotálamo e hipocampo. Una parte del tejido adiposo, fue fijada con paraformaldehído (JT BAKER, USA) para realizar cortes semifinos y teñirlos con azul de toluidina. El pulmón izquierdo de los ratones y el músculo cuádriceps se fijaron con etanol absoluto (JT BAKER, USA) para realizar cortes histológicos (Barrios-Payan y col., 2012).

### **Grupo *ad libitum* infectado**

Cada ratón fue anestesiado con 125µL de sevofluorano (ABBOTT™,USA) e inoculado vía intratraqueal con 250,000 unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37rv suspendidas en 100µL de solución salina utilizando una cánula de 22Gx1” (CADENCE SCIENCE INC. REF7901 CATALOG NUMBER 1207T65, USA), se registró el peso inicial de los animales y se les dio acceso *ad libitum* a 250 gramos de alimento y agua por microaislador (Barrios-Payan y col., 2012).

### **Sanos *ad libitum***

En este grupo que fue utilizado como grupo control se registró el peso inicial de los ratones en el día de la infección del grupo *ad libitum* infectado y se colocaron en microaisladores, dándoles acceso *ad libitum* a 250 gramos de alimento y agua.

## **Sanos a dieta**

Este grupo tuvo las mismas condiciones con respecto al anterior, con la diferencia en el acceso al alimento, ya que sólo se les proporcionaba la cantidad de alimento que ingerían los ratones infectados, fungiendo de esta manera como grupo control, esta condición provocó que la dieta de estos animales comenzara 2 días después de iniciado el experimento.

### **Registro de pesos y consumo de alimento.**

A cada ratón se le tomó el peso corporal utilizando una balanza analítica (LIBROR™, JAPON) los días lunes, miércoles y viernes durante los 120 días de experimentación y antes de cada sacrificio, los datos fueron graficados en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft 2007™, USA). Todo el proceso se realizó en un cuarto de contención de bioseguridad nivel 3 y dentro de una campana de flujo laminar nivel 3 (LABCONCO, USA) iniciando con los grupos sanos y después los ratones infectados. Se registró el alimento consumido cada tres días haciendo un cálculo de la diferencia entre el alimento inicial y la cantidad del alimento encontrado, los datos fueron graficados en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft 2007™, USA).

### **Preparación de tejido pulmonar y muscular de origen murino para histología**

El pulmón izquierdo del ratón se perfundió inyectando 1mL de alcohol etílico absoluto (JT BAKER™, USA) a través de la tráquea utilizando una jeringa desechable (BD Plastipak™, México) con aguja de 21Gx32mm, una vez retirado el tejido de la cavidad se depositó en un tubo cónico de 50 cc (FALCON™, USA) junto con el tejido muscular y 25 mL del mismo alcohol, para su fijación.

Para el análisis histológico de los tejidos recolectados, se hicieron cortes de 4µM de grosor en un microtomo semiautomatizado modelo RM2145 (LEICA™, USA) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para su análisis morfométrico, brevemente: los tejidos se desparafinaron en estufa a 65°C por 10min y se les dieron dos baños de xilol (JT BAKER™,

USA), posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación con xilol/alcohol, alcohol absoluto, etanol al 95 % y etanol al 75% para finalizar con agua destilada. A los tejidos se les dio un baño con hematoxilina por 2 minutos, se enjuagaron con agua corriente, se eliminó el exceso de colorante con alcohol/ácido, se enjuagaron con agua corriente, un baño en solución de carbonato de litio saturado para virar la hematoxilina y agua corriente para posteriormente contrastarse con eosina después se deshidrataron con dos cambios de alcohol al 95% y alcohol absoluto. Los remanentes de alcohol se retiraron utilizando xilol y se montó con resina (MACRON™, USA) para su análisis (Barrios-Payan y col., 2012).

### **Conteo de unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

El pulmón derecho de cada ratón en el grupo infectado se utilizó para determinar la carga bacilar por el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los tejidos se homogeneizaron con un Polytron (BIOSPEC™,USA) En 1 mL de PBS-tween 0.05% y se realizaron diluciones seriadas hasta  $1 \times 10^{-6}$ . Se sembraron 10  $\mu$ L de cada dilución por duplicado en cajas de Petri con medio de cultivo Middlebrok 7H10 (DIFCO™, USA) enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) (BECTON DICKINSON™, USA) y glicerol (MACRON, USA), posteriormente las cajas se incubaron a 37°C con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> por 21 días, se realizó un conteo preliminar el día 14 y un definitivo el día 21 (Barrios-Payan y col., 2012) . Para obtener el número de bacterias por pulmón, se multiplicó el número de UFC encontradas por el factor de dilución correspondiente mostrado a continuación (tabla 3).

Tabla 3. Factores de dilución para el conteo de unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Dilución	Factor de dilución
Concentrado	0.0001
-1	0.001
-2	0.01
-3	0.1
-4	1
-5	10
-6	100

### **Análisis Morfométrico**

El análisis morfológico de las muestras de músculo cuádriceps tomados en el día 120, se realizó utilizando microscopia óptica convencional acoplada al software application suite versión 4, 2013 (LEICA™,SUIZA). Se midieron las áreas de un corte transversal de 20 fibras musculares por muestra y se obtuvo un promedio de área por grupo, el análisis estadístico y los gráficos se realizaron en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft 2007™, USA).

Se realizaron cortes semifinos de tejido adiposo peritesticular de 3 micras de grosor en un ultramicrotomo modelo EMUC7 (LEICA™,SUIZA). Los cuales se tiñeron con azul de toluidina por su naturaleza hidrofóbica la cual ayuda a contrastar los límites de cada adipocito facilitando las mediciones del diámetro (Kumar y col., 2010).

### **Análisis Estadístico**

Se realizó un análisis estadístico de varianza de una vía (ANOVA) para comparar la posible diferencia entre las mediciones utilizada utilizando un intervalo de confianza del 95% y un análisis de T de Test y de Bonnferroni para comparar la posible diferencia pareada entre los grupos estudiados. Se considero  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Registro de pesos corporales y alimento consumido

Los ratones de los grupos sanos e infectados con alimentación *ad libitum* tuvieron un comportamiento similar desde el comienzo del seguimiento o monitorización hasta la cuarta semana postinfección, a partir de este punto la tendencia del peso entre ambos grupos cambió, los ratones sanos *ad libitum* aumentaron un 27% su peso corporal, hasta llegar a un peso promedio de 28.7g y a partir de la semana 9 y hasta el final del experimento hubo una baja oscilación de esta cifra. Mientras que los ratones del grupo infectado a partir de la semana 4 empezaron a perder peso de manera progresiva hasta perder el 18% del peso al final del experimento.

Los ratones del grupo sanos a dieta perdieron peso de manera abrupta desde una etapa temprana (2ª semana), y para la etapa final del experimento (semana 14) donde ya todos los animales habían perdido un 31% de peso corporal. Esta situación podía estar favorecida porque los ratones no tienen un proceso infeccioso por lo tanto no hay presencia de citocinas proinflamatorias que generarían un decremento en la utilización voluntaria de energía a nivel de SNC (figura 7).

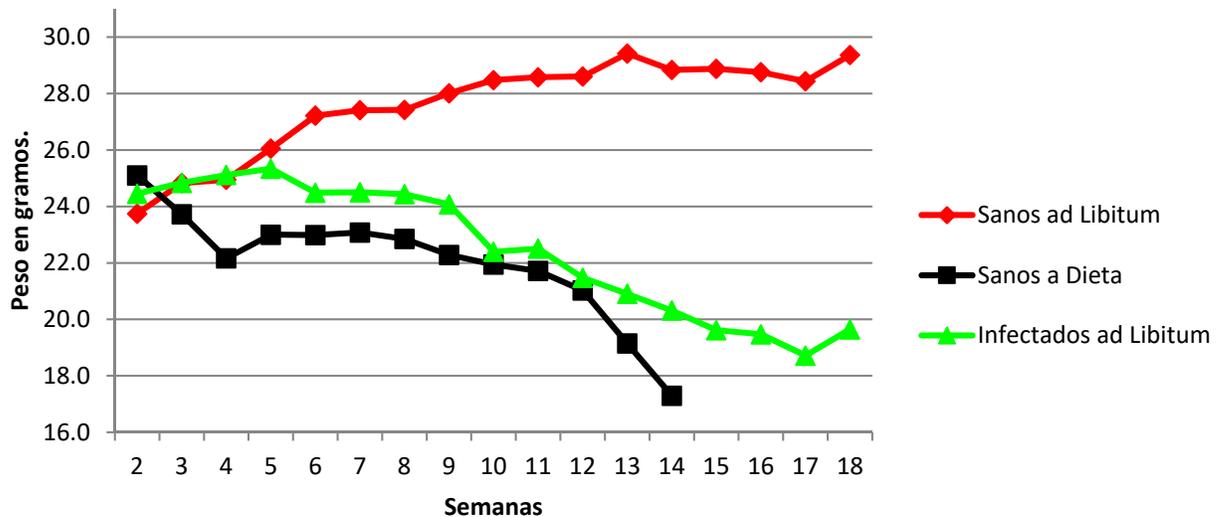


Figura 7. Cinética del peso promedio de cada grupo. Muestra el comportamiento de los 3 grupos: grupo 1 sanos *ad libitum*: al final del experimento incrementaron su masa corporal un 28.7%, grupo 2 sano a dieta: su masa corporal disminuyó un 18%, finalmente el grupo 3 infectados *ad libitum*: perdió un 18%. Resultados que muestran una diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0.01^{**}$  según el análisis estadístico de ANOVA.

Según los criterios clínicos establecidos en el consenso internacional de CQX y lo encontrado por Evans y colaboradores (Evans y col., 2008), el grupo infectado puede considerarse caquéxico debido a que los ratones perdieron el 27% de su peso corporal en presencia de una enfermedad subyacente en este caso Tb. Se ha observado que la pérdida de peso a partir del día 28 (4ª semana) se debe a que durante los primeros días postinfección se monta una respuesta principalmente inflamatoria de tipo Th1 en la cual la presencia de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-12 e INF- $\gamma$  causan en el pulmón la patología clásica de la Tb en la fase primaria o aguda que está caracterizada por inflamación alveolar-intersticial, perivascular y peribronquial con abundantes macrófagos en el lumen alveolar (Hernandez-Pando y cols., 1996). Los niveles de estas citocinas en especial TNF- $\alpha$  han demostrado un incremento en la expresión del gen de la ubiquitina en exposiciones prolongadas *in vitro* (Llovera y cols., 1997). La transcripción de NF- $\kappa$ B induce por medio de TNF- $\alpha$  la pérdida de proteínas (Li y Reid, 2000). Estas evidencias muestran claramente que las citocinas causan un sinergismo en la expresión del gen encargado de sintetizar el proteasoma. Aunado a esto, Acharyya y colaboradores (2004) encontraron que ambas citocinas reducen el ARN mensajero

para la síntesis de las cadenas pesadas de miosina. Esos resultados sugieren que las citocinas tengan un potencial de sinergismo que induce el catabolismo del músculo esquelético. Lo cual en conclusión conlleva a una pérdida de peso por afectación al tejido muscular. La pérdida de peso encontrada en nuestro trabajo fue al comienzo de una respuesta tipo Th2 según lo reportado por Hernández y colaboradores (1996). A pesar que no lo evaluamos en el presente trabajo se infiere esto debido a que el modelo experimental es exactamente el mismo que el de Hernández y colaboradores publicado en 1996 en el cual se utilizaron los mismos ratones, el mismo inóculo y las mismas condiciones de trabajo al ser ratones singénicos su genoma prácticamente es el mismo. Esto se debe a que los ratones infectados durante la etapa aguda consumen sus reservas energéticas (tejido adiposo) y proteicas para conservar una respuesta inmune óptima, pero cuando la enfermedad se torna crónica estas reservas ya no pueden regenerarse, lo que provoca que las proteínas y la energía se tomen de la masa muscular y almacenes de glucógeno muscular y hepático respectivamente. Un animal que está siendo consumido por la enfermedad y ha desgastado sus reservas para la síntesis de macromoléculas utilizadas para la contención de la infección, tiene un efecto contraproducente, ya que inhibe la ingesta de alimento a nivel del SNC debido a las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  secretadas en la respuesta inmunológica (figura 8).

La pérdida de peso además de deberse a la pérdida de tejido muscular debida a procesos proteolíticos y a la disminución de proteínas estructurales, también puede ser ocasionada por el desbalance energético negativo ocasionado por el uso de ciclos metabólicos fútiles encontrados por Liao y Florén (1994), el cual consiste en una inducción de la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación por TNF- $\alpha$  causando un decremento en la actividad de LPL en hígado y tejido adiposo y a un incremento en la actividad del receptor de LDL en el adipocito, seguido de un subsecuente aumento en la síntesis de VLDL lo cual resulta en una hipertrigliceridemia (Liao y Floren, 1994).

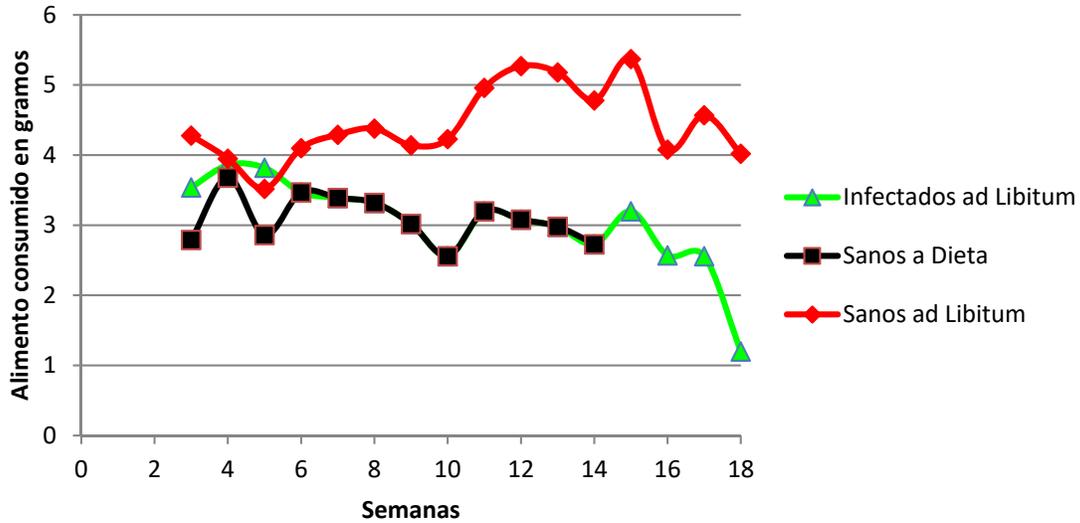


Figura 8. Grafica del consumo de alimento individual promedio. En la grafica se muestra el comportamiento en cada semana de la cinética experimental en el cual el consumo de alimento promedio de los ratones del grupo infectados *ad libitum* tuvo una disminución de un 28.5 %\*\* con respecto al consumo en el día de la infección.

### Análisis Morfométrico

Las mediciones entre los días 21, 60 y 120 mostraron una pérdida paulatina en el área de los adipocitos del grupo *ad libitum* infectado. Sin embargo, los ratones del grupo sanos a dieta que sufrieron de inanición perdieron su tejido adiposo dramáticamente en los primeros 60 días del experimento. La morfometría del tejido muscular se realizó sólo en muestras del día 120 para realizar la comparación entre los tres grupos de estudio. Esto se debe a que los cambios morfométricos en el desgaste muscular se presentan cuando la enfermedad se encuentra en una fase más avanzada.

## Morfometría de tejido adiposo

Los adipocitos de los ratones de cada grupo se estudiaron de dos maneras: primero para comparar las alteraciones encontradas entre los individuos de un mismo grupo y segundo para detectar las discrepancias entre el área celular de los tres grupos. En el primer caso, las mediciones del área de cada grupo se compararon con el día 21. Los ratones sanos *ad libitum* no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en el área celular de los adipocitos en toda la cinética (figura 9), ya que al ser el grupo control las condiciones de mantenimiento eran idóneas para un desarrollo normal de los individuos.

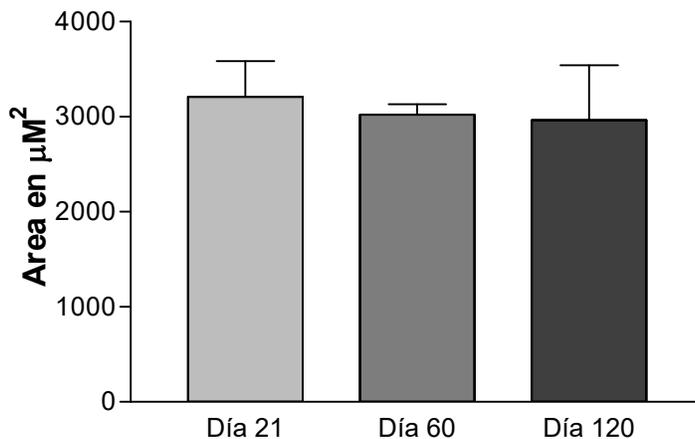


Figura 9. Área promedio de los adipocitos del grupo sanos *ad libitum*. En este grupo no hubo diferencias significativas. ( $p \geq 0.05$ ) entre las 3 mediciones correspondientes a los días de sacrificio.

Los ratones del grupo *ad libitum* infectado tuvieron una diferencia estadísticamente significativa entre la pérdida del área de los adipocitos entre los días 60 y 120 (figura 10). Esto demuestra una pérdida de tejido adiposo paulatina en los primeros 60 días con una pérdida abrupta en la etapa crónica de la infección. Este hallazgo coincide con lo reportado en la literatura, en la CQX la pérdida más importante de peso se debe en gran medida a la pérdida de músculo ya sea dependiente o independiente de la pérdida de tejido adiposo (Muliawati y cols.,

2012). Sin embargo hay muchas causas de esta pérdida, una de las más aceptadas por la comunidad científica es que ésta se debe a la concentración de citocinas proinflamatorias liberadas como respuesta a la enfermedad subyacente en este caso la Tb.

Rydén y colaboradores (2004) encontraron en tejido adiposo una importante lipólisis inducida por la resistencia a la insulina causada por TNF- $\alpha$  en el estado de CQX. Éste podría ser uno de los mecanismos implícitos en nuestro trabajo y que podrían demostrar la pérdida de área de los adipocitos en el tejido adiposo. Por otra parte, Bing y colaboradores (2004) encontraron que la proteína ZAG-2 expresada en adipocitos de ratón es activada también por TNF- $\alpha$ , lo cual causa una disminución en el volumen celular por la metabolización de la vacuola de triglicéridos por dicha enzima. Estos resultados causan un desbalance energético sobre todo a nivel hepático y que aunado a la resistencia a la insulina en músculo generada por TNF- $\alpha$  y reportada por Hotamisligil (2013) se causa la pérdida de peso corporal en los ratones infectados con la pérdida de tejido adiposo.

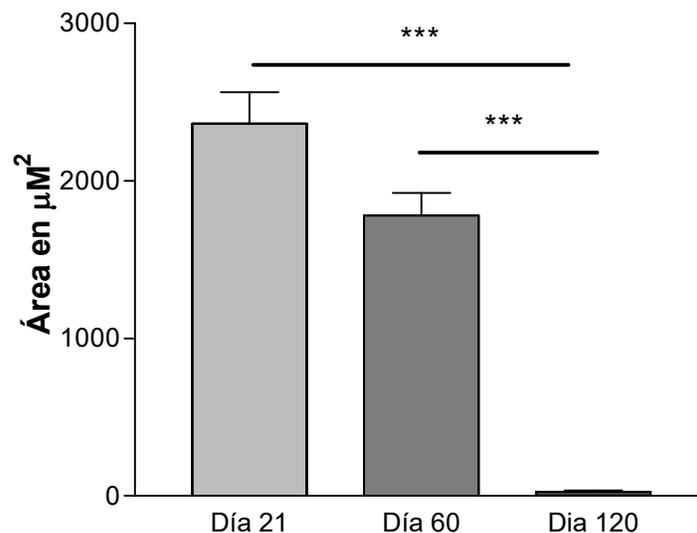


Figura 10. Área promedio de los adipocitos del grupo *ad libitum* infectado. En este grupo no hubo diferencias significativas entre el día 21 y 60. Sin embargo, la pérdida de área entre el día 21 y el 120 fue estadísticamente significativa ( $<0.001$ )\*\*\* al igual que entre el día 60 y el día 120

Histológicamente se encontraron alteraciones que muestran en el día 120 algunos indicadores importantes de atrofia en el tejido adiposo como la presencia de células inflamatorias y fibroblastos, ambos indicadores de un proceso fibrótico, además de una disminución estadísticamente significativa ( $p \leq 0.005$ ) del área promedio de los adipocitos que fue  $2361 \mu^2$  en el día 21 (figura 11) a  $26 \mu^2$  en el día 120 (figura 12).

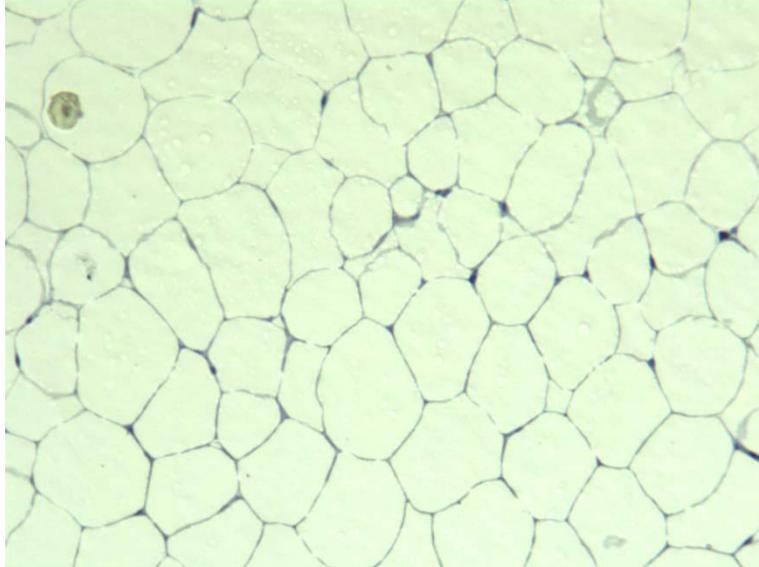


Figura 11. Adipocitos de un ratón del grupo *ad libitum* infectados sacrificado el día 21. No muestra alteraciones generales en la integridad del tejido adiposo. Imagen tinción con azul de toluidina a 20x.

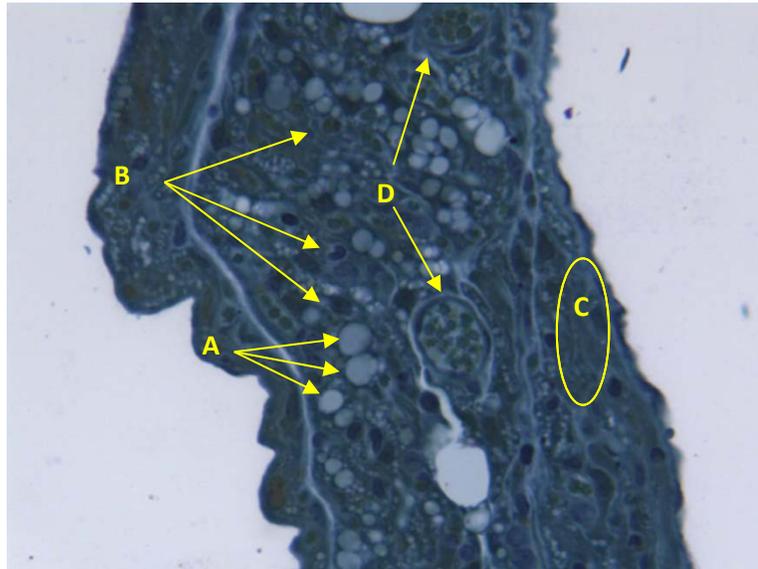


Figura 12. Adipocitos de un ratón del grupo *ad libitum* infectado sacrificado el día 120. Muestra alteraciones en la integridad del tejido adiposo como reemplazo de los adipocitos por tejido conjuntivo denso cicatricial, infiltrado de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos características de un proceso fibrótico. A) Adipocitos, B) células inflamatorias, C) fibroblastos D) vasos sanguíneos Imagen tinción con azul de toluidina a 20x.

En el caso de los ratones sanos a dieta también se presentó una pérdida de peso y una alteración en el tamaño de los adipocitos perdiendo por completo su tejido adiposo en el día 120 y mostrando el inicio de un proceso fibrótico en el día 60 (figura 13), situación que fue más abrupta en comparación con el grupo *ad libitum* infectados. A esta condición se le conoce como inanición que se diferencia según lo encontrado por Evans y colaboradores como estado pre-caquético debido a que no cumple con otros dos criterios además de la pérdida de peso (Evans y col., 2008). Esta situación se originó en este grupo de dieta debido a que fue sometido a un consumo de alimento condicionado por los ratones enfermos los cuales, al tener un estado de CQX inducido por la infección sufrieron una disminución voluntaria de la utilización de energía como ha sido descrito por Morley y cols., 2006; el grupo sometido a dieta no padece esa disminución porque no tiene el proceso de afección neuronal causada por las citocinas proinflamatorias generadas en respuesta al proceso infeccioso en cuestión.



Figura 13. Adipocitos de un ratón del grupo sanos a dieta sacrificado el día 60. Muestra alteraciones en la integridad del tejido adiposo como disminución del tamaño celular y reemplazo de los adipocitos por tejido conjuntivo denso cicatricial, infiltrado de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos características de un proceso fibrótico. Imagen tinción con azul de toluidina a 20x.

En el día 21 postinfección hay un pico en la respuesta inmunológica del ratón según el modelo de Hernández-Pando y cols., (Hernandez-Pando y col., 1996) en este experimento se muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio, los adipocitos de los ratones sanos *ad libitum* no mostraron alteraciones en su morfología, y al ser el grupo control sirvieron como punto de comparación con el sano a dieta.

Los adipocitos en este tiempo del experimento tuvieron una diferencia estadísticamente significativa según el análisis hecho por ANOVA con un valor de  $p \leq 0.05$ . Además, en este día se muestra como los ratones del grupo sano a dieta tuvieron una pérdida de área estadísticamente significativa en el análisis de Bonferroni, comparado con el grupo sano *ad libitum* como se muestra en la figura 14.

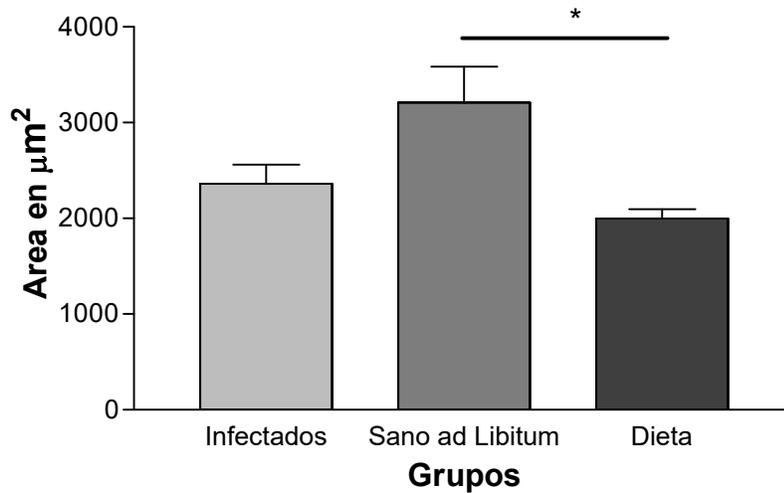


Figura 14. Tejido adiposo al día 21. Entre el grupo sano *ad libitum* y el grupo sano a dieta  $^*(p \leq 0.05)$  se observa una pérdida más temprana de tejido adiposo en los ratones del grupo de dieta que en los ratones del grupo infectado.

Este es un resultado esperado ya que los ratones que sufren de una disminución en la cantidad de alimento consumido estando sanos no sufren un decremento voluntario en la utilización de energía (Morley y cols., 2006), en estos animales se observó una conducta fuera de lo normal, se observaban ansiosos y agresivos entre ellos, consecuencias del estrés por la escasez de alimento. Histológicamente el tejido adiposo del grupo sanos a dieta e infectados *ad libitum* a pesar de la disminución del área celular no mostraron desorden alguno comparados con el grupo control.

En el día 60 el grupo sano a dieta mostró una pérdida del tejido adiposo periférico a los testículos equivalente al 8.76% de su masa corporal y su ansiedad fue más notable. Histológicamente se mostró una atrofia en el tejido adiposo peritesticular con características de un proceso fibrótico en los que se encuentran fibroblastos tomando el lugar de los adipocitos, células inflamatorias y adipocitos extremadamente disminuidos en su área total (figura 15). En este tiempo del experimento los ratones infectados empezaron a mostrar una disminución prominente en el área celular donde hubo una disminución cercana al 25% comparada con el día 21, sin embargo, esta no fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ), (figura 16).

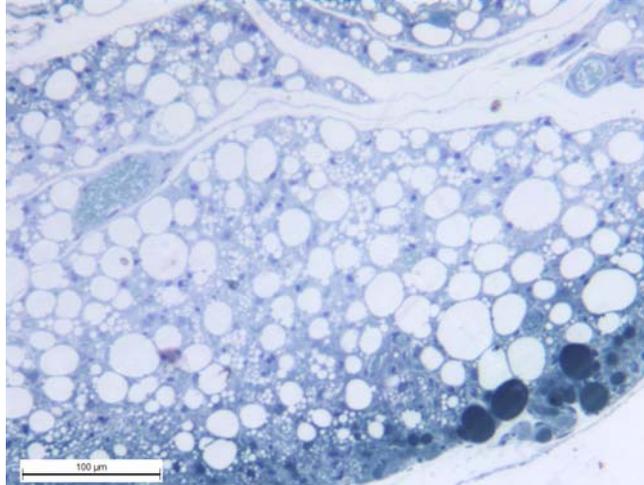


Figura 15. Tejido adiposo de un ratón del grupo sano a dieta. Donde se muestran indicios de un proceso fibrótico como la presencia de células inflamatorias, y reemplazo de los adipocitos por tejido conjuntivo denso cicatricial. Teñidos con azul de toluidina y observada a 20x.

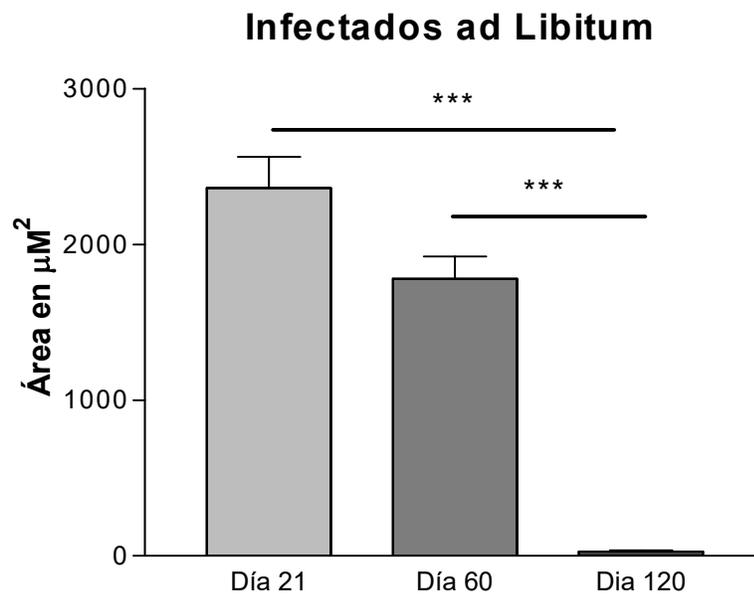


Figura 16. Tejido adiposo del grupo *ad libitum* infectado. Se observa una pérdida progresiva de tejido adiposo en la cual hay una disminución estadísticamente significativa ( $\geq 0.001$ ) entre el día 21 v el día 120.

En el día 120 se sacrificaron los ratones de todos los grupos. En el grupo sano a dieta hubo un evento importante que ocasionó la pérdida de ratones a causa de la falta de alimento, razón por la cual al final del experimento sólo se contó con un animal. La necropsia demostró que el tejido adiposo había desaparecido por completo se tomaron muestras del área donde anatómicamente debería encontrarse y se realizaron distintos cortes histológicos, a pesar de la búsqueda minuciosa, no fue posible encontrar tejido adiposo para hacer el análisis estadístico, por eso se tomo el área celular como cero (figura 17).

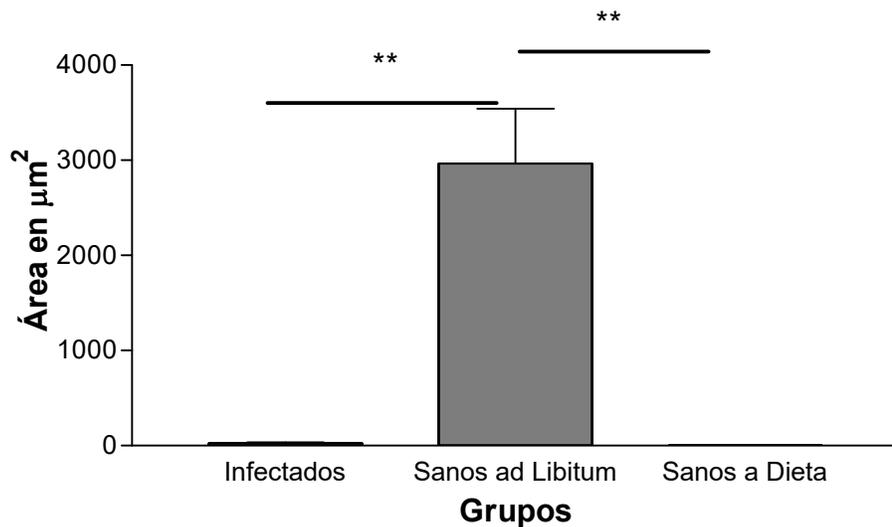


Figura 17 Tejido adiposo presente en los tres grupos en el día 120. El análisis de Bonferroni mostró diferencia significativa en el área celular total de los adipocitos tanto en los grupos infectado y dieta ( $p \leq 0.01$ ), comparados con el grupo sano *ad libitum*.

En los animales *ad libitum* infectado no hubo bajas considerables en la población lo cual quiere decir que el sistema inmunológico del ratón estaba conteniendo la infección y por consecuencia se le asocia con la pérdida de peso. Histológicamente se mostró una pérdida de la integridad en el tejido adiposo encontrado, con señales de un proceso fibrótico y un área celular extremadamente disminuida al final del experimento, con una pérdida del 98.8% del tejido, resultado que fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.001$ )\*\*\* en el análisis de Bonferroni (figura 17).

### **Morfometría de tejido muscular**

La CQX se caracteriza por una excesiva disminución en la masa muscular. Una de las ventajas de trabajar con modelos experimentales *in vivo* es poder obtener la muestra en el momento en que se presenta el evento de interés. Gracias a lo anterior se pudo realizar la recolección del músculo cuádriceps, en el que se realizó un corte transversal de 4  $\mu\text{m}$  para apreciar el diámetro de las fibras musculares en los 3 grupos con los ratones que llegaron al final del experimento, de esta manera se compararon las áreas promedio para medir la pérdida o ganancia de masa muscular entre cada uno de los grupos. En el caso del grupo sano *ad libitum* la morfología de las células musculares fue totalmente normal. Se aprecian sus múltiples núcleos en la periferia y su abundante citoplasma (figura 18).

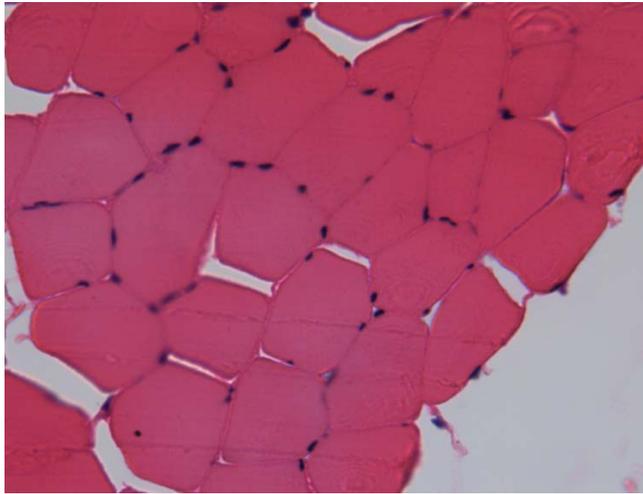


Figura 18. Micrografía transversal del músculo cuádriceps de un ratón sano *ad libitum*. En este grupo no se encontró anomalía histológica alguna. Tinción de hematoxilina y eosina.

Microfotografía 20x.

En este caso al realizar el análisis morfométrico para medir el área en micrómetros al cuadrado se observó una media promedio de  $1969 \mu\text{m}^2$  por célula, en el grupo sanos a dieta se apreció una disminución del área promedio el cual fue de  $645 \mu\text{m}^2$  por célula equivalente a una tercera parte del área promedio del grupo sanos *ad libitum*. En el análisis histológico además de la reducción del área celular no se mostró ninguna alteración en la integridad (figura 19). En el grupo *ad libitum* infectado se observó una disminución en el promedio del área celular la cual fue de aproximadamente  $528 \mu\text{m}^2$ , lo que se aproxima a casi la cuarta parte del área de una célula muscular de un ratón sano, sin embargo en el análisis histológico no se detectó pérdida de la integridad celular (figura 20).

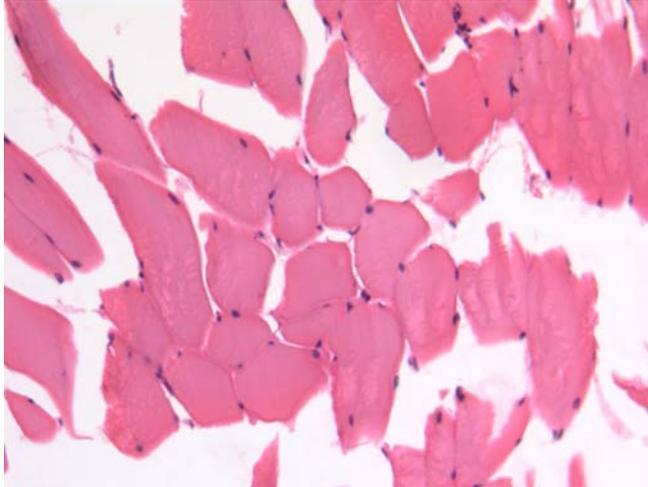


Figura 19. Micrografía transversal del cuádriceps de un ratón del grupo sano a dieta. En este grupo no se encontró anomalía histológica alguna a pesar de la disminución de área celular. Teñida con hematoxilina y eosina y observada a 20x.

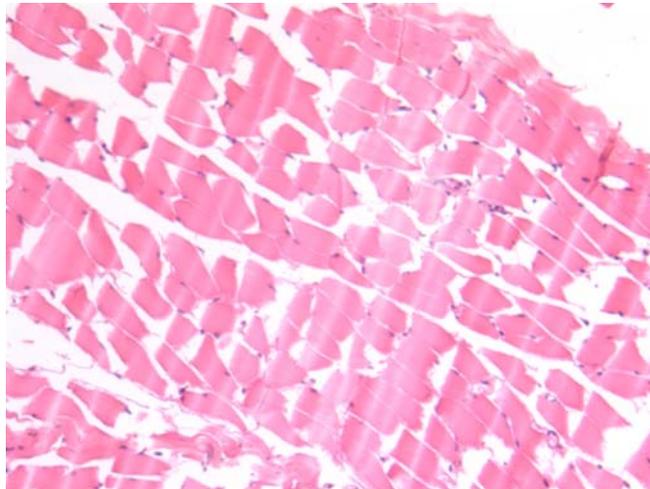


Figura 20. Micrografía de un corte transversal del cuádriceps de un ratón infectado. El área de estos animales es casi 4 veces menos que el de uno sano *ad libitum*. Tinción hematoxilina y eosina (HE) 20x.

En el análisis morfométrico, tanto el grupo de dieta como el grupo infectado perdieron músculo en altos porcentajes (figura 21). En el caso de los ratones infectados la pérdida de tejido muscular fue mayor a la de los ratones del grupo de dieta. Lo cual comprueba que los ratones cursaban por un estado de CQX debido a que su pérdida mayoritaria fue de tejido muscular equivalente al 22.5%, siendo esto una característica clásica de los pacientes con Tb ya que se aumenta la proteólisis debido a que por la privación calórica se necesitan esas reservas para la síntesis de proteínas claves en la respuesta inmunológica (Morley et al., 2006). El análisis estadístico a estos resultados arrojó una diferencia estadísticamente significativa \*\* ( $p \leq 0.01$ ) entre el grupo sanos *ad libitum* y el grupo *ad libitum* infectado.

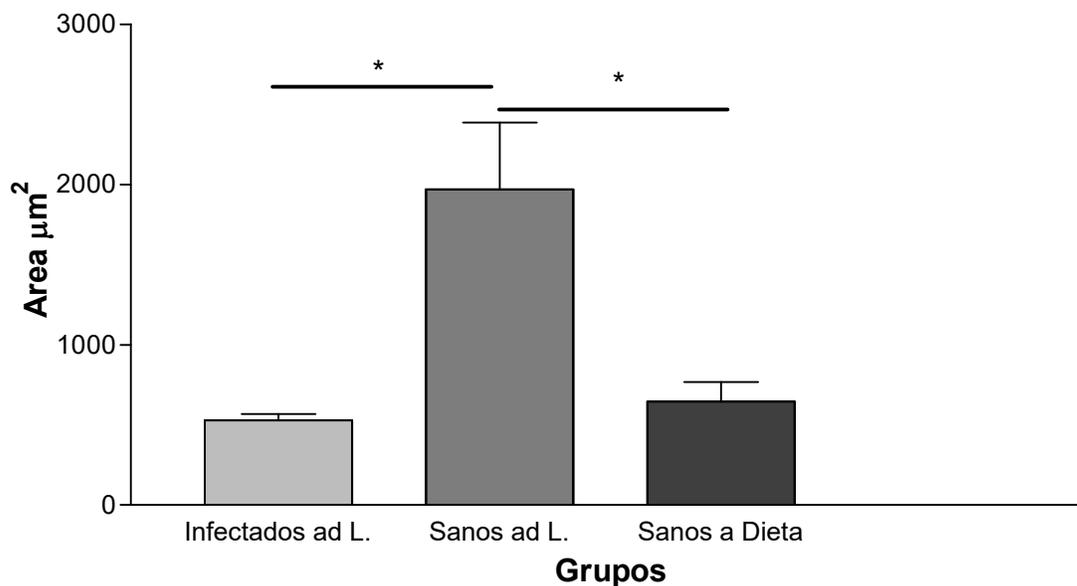


Figura 21. Análisis de la morfometría del músculo al día 120. Se encontró una diferencia significativa \*\* ( $p \leq 0.01$ ) entre los grupos *ad libitum* infectado y sanos *ad libitum*. Entre el grupo sanos *ad libitum* y sanos a dieta hubo una diferencia estadísticamente significativa \* ( $p \leq 0.05$ ).

Sin embargo, no hubo una diferencia significativa entre los grupos sanos a dieta e *ad libitum* infectado.

La proteólisis intracelular cumple una importante función, ya que muchos aspectos fisiológicos y del desarrollo celular son controlados por la degradación de proteínas específicas. La regulación de la proteólisis muscular juega un papel importante en la homeostasis

energética, el control de la masa muscular y el crecimiento corporal, así como diferentes situaciones fisiológicas y patológicas (Guttridge y col., 2000). En este estudio, los ratones del grupo infectado mostraron indicios de un aumento del catabolismo proteico por un balance energético negativo, los cuales en conjunto con la pérdida de peso, la disminución de los adipocitos y la anorexia sugieren que se puedan considerar animales caquéxicos, sin embargo para confirmar estas sospechas es necesario hacer pruebas de biología molecular para la búsqueda específica de la expresión de ciertos genes implicados tanto en la movilidad de lípidos como en la proteólisis muscular.

### Conteo de unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*

Como comprobación de que la pérdida de peso en el caso de los ratones del grupo ad libitum infectado fue debido a la infección, se hizo un conteo de UFC en el que se observó la cantidad de bacterias viables en pulmón y se relacionó su aumento con una baja del sistema inmunológico al cual asociamos el estado de CQX (figura 22).

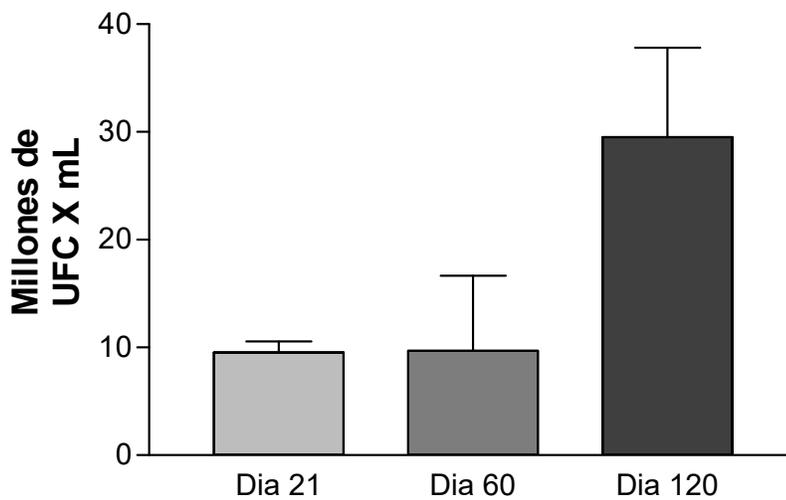


Figura 22. Conteo de unidades formadoras de colonias de la cepa H37Rv aisladas de pulmón. Se muestra cómo la población de bacterias se mantuvo en los primeros dos días de sacrificio. Habiendo una exacerbación hacia el día 120.

La figura 22 muestra una contención de la infección hasta el día 60, sin embargo para el día 120 el número de bacterias viables en el pulmón aumentó casi al triple. Este aumento en la carga bacilar coincide con los análisis de la pérdida de tejido adiposo y de músculo lo cual sugiere que se puede deber a una deficiencia del sistema inmunológico ocasionada por la disminución en la síntesis de macromoléculas necesarias para la respuesta causada por un balance energético negativo.

## CONCLUSIONES

- La pérdida de peso de los ratones infectados fue mayor al 5% del peso premórbido lo cual es un indicador de CQX, los ratones sanos a dieta perdieron más del 5% de su peso corporal sin estar sometidos a un proceso infeccioso, lo cual indica un estado de profunda desnutrición debido al proceso de inanición al que fueron sometidos.
- Los ratones del grupo sometido a dieta perdieron peso más rápidamente que el grupo infectado, debido al proceso de inanición que sufrieron.
- El conteo de UFC's del grupo infectado mostró un déficit en la contención de la infección entre el día 60 y el día 120. Mismos días en los que se presentó la mayor pérdida tisular. Por lo tanto se encontró una relación directamente proporcional entre la pérdida tisular y la carga bacteriana.
- Se concluye que en la CQX causada por Tuberculosis en un modelo experimental murino hay anomalías similares a las causadas por EPOC como la presencia de un proceso inflamatorio que termina causando neumonía y disfuncionalidad pulmonar.

## **PERSPECTIVAS**

Para comprobar las diferentes rutas por las que los ratones infectados sufren CQX y como ésta afecta la respuesta inmunológica y el balance energético, es imprescindible continuar el trabajo con la búsqueda de genes que están implicados en los distintos procesos metabólicos y exámenes bioquímicos en el suero sanguíneo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acharyya, S., K. J. Ladner, L. L. Nelsen, J. Damrauer, P. J. Reiser, S. Swoap, D. C. Guttridge, 2004, Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products: *J Clin Invest.* 114. 370-8.
- Agusti, A., M. Morla, J. Sauleda, C. Saus, and X. Busquets, 2004, NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight: *Thorax*, 59, 483-7.
- Agusti, A. G., J. Sauleda, C. Miralles, C. Gomez, B. Togores, E. Sala, S. Batle, X. Busquets, 2002, Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease: *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 485-9.
- Alvarez Hernandez, J., 1996, Wasting syndrome in patients with HIV infection: *Rev Clin Esp*, 196, 32-8.
- Barrios-Payan, J., M. Saqui-Salces, M. Jeyanathan, A. Alcantara-Vazquez, M. Castanon-Arreola, G. Rook, R. Hernandez-Pando, 2012, Extrapulmonary locations of mycobacterium tuberculosis DNA during latent infection: *J Infect Dis*, 206, 1194-205.
- Bindels, L. B., N. M. Delzenne, 2013, Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target?: *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2186-90.
- Bing, C., Y. Bao, J. Jenkins, P. Sanders, M. Manieri, S. Cinti, M. J. Tisdale, P. Trayhurn, 2004, Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2500-5.
- Brusik, M., J. Ukropec, P. Joppa, B. Ukropcova, P. Skyba, M. Balaz, P. Pobeha, T. Kurdiová, I. Klimes, I. Tkac, D. Gasperikova, R. Tkacova, 2012, Circulatory and adipose tissue leptin and adiponectin in relationship to resting energy expenditure in patients with chronic obstructive pulmonary disease: *Physiol Res*, 61, 469-80.

- Chang, S. W., W. S. Pan, D. Lozano Beltran, L. Oleyda Baldelomar, M. A. Solano, I. Tuero, J. S. Friedland, F. Torrico, R. H. Gilman, 2013, Gut hormones, appetite suppression and cachexia in patients with pulmonary TB: PLoS One, 8, 54564.
- Costelli, P., M. Bossola, M. Muscaritoli, G. Grieco, G. Bonelli, R. Bellantone, G. B. Doglietto, F. M. Baccino, F. Rossi Fanelli, 2002, Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats: Cytokine, 19, 1-5.
- Dhindsa, S., R. Garg, A. Bandyopadhyay, and P. Dandona, 2003, Angiotensin II Inflammation: The Effect of ACE Inhibition and Angiotensin II Receptor Blockade: Metab Syndr Relat Disord, 1, 255-9.
- Eagan, T. M., E. C. Gabazza, C. D'Alessandro-Gabazza, P. Gil-Bernabe, S. Aoki, J. A. Hardie, P. S. Bakke, P. D. Wagner, 2012, TNF-alpha is associated with loss of lean body mass only in already cachectic COPD patients: Respir Res, 13, 48.
- Eden, E., S. Edstrom, K. Bennegard, T. Schersten, K. Lundholm, 1984, Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding: Cancer Res, 44, 1718-24.
- Egen, J. G., A. G. Rothfuchs, C. G. Feng, N. Winter, A. Sher, R. N. Germain, 2008, Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas: Immunity, 28, 271-84.
- Emery, P. W., R. H. Edwards, M. J. Rennie, R. L. Souhami, D. Halliday, 1984, Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer: Br Med J (Clin Res Ed), 289, 584-6.
- Evans, W. J., J. E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W. E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S. D. Anker, 2008, Cachexia: a new definition: Clin Nutr, 27, 793-9.

- Goldberg, R. M., C. L. Loprinzi, J. A. Mailliard, J. R. O'Fallon, J. E. Krook, C. Ghosh, R. D. Hestorff, S. F. Chong, N. F. Reuter, and T. G. Shanahan, 1995, Pentoxifylline for treatment of cancer anorexia and cachexia? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial: *J Clin Oncol*, 13, 2856-9.
- Grunfeld, C., and K. R. Feingold, 1992a, Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome: *N Engl J Med*, 327, 329-37.
- Grunfeld, C., and K. R. Feingold, 1992b, The role of the cytokines, interferón alpha and tumor necrosis factor in the hypertriglyceridemia wasting of AIDs: *J Nutr*, 122, 749-53.
- Guttridge, D. C., M. W. Mayo, L. V. Madrid, C. Y. Wang, A. S. Baldwin, Jr., 2000, NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia: *Science*, 289, 2363-6.
- Hernandez-Pando, R., D. Aguilar, M. L. Hernandez, H. Orozco, G. Rook, 2004, Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis: *Eur J Immunol*, 34, 174-83.
- Hernandez-Pando, R., H. Orozco, A. Sampieri, L. Pavon, C. Velasquillo, J. Larriva-Sahd, J. M. Alcocer, M. V. Madrid, 1996, Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis: *Immunology*, 89, 26-33.
- Hernandez-Pando, R., L. Pavon, K. Arriaga, H. Orozco, V. Madrid-Marina, and G. Rook, 1997, Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection: *Infect Immun*, 65, 3317-27.
- Holroyde, C. P., T. G. Gabuzda, R. C. Putnam, P. Paul, and G. A. Reichard, 1975, Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma: *Cancer Res*, 35, 3710-4.
- Hopkinson, J. B., D. N. Wright, C. Foster, 2008, Management of weight loss and anorexia: *Ann Oncol*, 19 Suppl 7, vii289-93.

Kaufmann, S. H., 2001, How can immunology contribute to the control of tuberculosis?: *Nat Rev Immunol*, 1, 20-30.

Kotler, D. P., 2000, Cachexia: *Ann Intern Med*, 133, 622-34.

Kumar v. 2010. *Patología estructural y funcional*, 8va ed. Barcelona. Elsevier. 1449

Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch, A. L. Goldberg, 1999, Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states: *J Nutr*, 129, 227s-237s.

Lehninger A., 1995 *Principios de Bioquímica* 2da ed. Barcelona. Ediciones Omega. 1013 pag.

Li, Y. P., M. B. Reid, 2000, NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279, R1165-70.

Liao, W., C. H. Floren, 1994, Upregulation of low density lipoprotein receptor activity by tumor necrosis factor, a process independent of tumor necrosis factor-induced lipid synthesis and secretion: *Lipids*, 29, 679-84.

Llovera, M., C. Garcia-Martinez, N. Agell, F. J. Lopez-Soriano, J. M. Argiles, 1997, TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles: *Biochem Biophys Res Commun*, 230, 238-41.

Loprinzi, C. L., D. J. Schaid, A. M. Dose, N. L. Burnham, M. D. Jensen, 1993, Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate: *J Clin Oncol*, 11, 152-4.

Lundholm, K., A. C. Bylund, J. Holm, T. Schersten, 1976, Skeletal muscle metabolism in patients with malignant tumor: *Eur J Cancer*, 12, 465-73.

Mathews C.K., Van Holde K.E. Ahern K.G., 2002 *Bioquímica* 3ra ed. Madrid, Pearson educación, 1335pag.

Martignoni, M. E., P. Kunze, H. Friess, 2003, Cancer cachexia, *Mol Cancer*, 2: England, 36.

- McMillan, D. C., H. R. Scott, W. S. Watson, T. Preston, R. Milroy, and C. S. McArdle, 1998, Longitudinal study of body cell mass depletion and the inflammatory response in cancer patients: *Nutr Cancer*, 31, 101-5.
- Moore Carrasco, R. E., S. Busquets Rius, F. J. López Soriano, and J. M. Argilés Huguet, 2005, Factores de transcripción en el desgaste muscular asociado a la caquexia. *Revista de investigacion clinica*, México 23-5
- Morley, J. E., D. R. Thomas, M. M. G. Wilson, 2006, Cachexia: pathophysiology and clinical relevance: *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 735-743.
- Muliawati, Y., H. Haroen, L. W. Rotty, 2012, Cancer anorexia - cachexia syndrome: *Acta Med Indones*, 44, 154-62.
- Penié, J. B., S. S. Porbén, C. M. González, 2000, Desnutrición e infecciones respiratorias, *in* S. P. Sergio, ed., La Habana Cuba, Acta medica.
- Ramakrishnan, L., 2012, Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis: *Nat Rev Immunol*, 12, 352-66.
- Reeds, P. J., C. R. Fjeld, F. Jahoor, 1994, Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states?: *J Nutr*, 124, 906-10.
- Russell, S. T., K. Hirai, M. J. Tisdale, 2002, Role of beta3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor: *Br J Cancer*, 86, 424-8.
- Ryden, M., E. Arvidsson, L. Blomqvist, L. Perbeck, A. Dicker, P. Arner, 2004, Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes: *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 168-75.
- Sharma, R., S. Anker, 2001, First Cachexia Symposium, Berlin, Germany, 1st-2nd December, 2000, *Eur J Heart Fail*, 3: Netherlands, 751-4.

- Shellock, F. G., M. S. Riedinger, M. C. Fishbein, 1986, Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia: *J Cancer Res Clin Oncol*, 111, 82-5.
- Sosa-Sanchez, R., K. Sanchez-Lara, D. Motola-Kuba, D. Green-Renner, 2008, The cachexia-anorexia syndrome among oncological patients: *Gac Med Mex*, 144, 435-40.
- Summerbell, C., 1994, Nutrition and HIV infection: *Practitioner*, 238, 558, 561-2.
- Thompson, M. P., S. T. Cooper, B. R. Parry, and J. A. Tuckey, 1993, Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients: *Biochim Biophys Acta*, 1180, 236-42.
- Von Roenn, J. H., R. L. Murphy, N. Wegener, 1990, Megestrol acetate for treatment of anorexia and cachexia associated with human immunodeficiency virus infection: *Semin Oncol*, 17, 13-6.
- Von Roenn, J. H., E. L. Roth, R. Craig, 1992, HIV-related cachexia: potential mechanisms and treatment: *Oncology*, 49 Suppl 2, 50-4.
- Wang, Q., and M. D. Whim, 2013, Stress-induced changes in adrenal neuropeptide Y expression are regulated by a negative feedback loop: *J Neurochem*, 125, 16-25.
- WHO, World Health Organization 2013, Global Tb Report, World Health Organization, 306.