



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Expresión de los receptores de fagocitosis  
CD209, CD36, CD16, CD163 y CD206 en monocitos que  
fagocitan a *M. tuberculosis*  
y el efecto del tratamiento con 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en monocitos  
de pacientes con DM2**

**T E S I S**

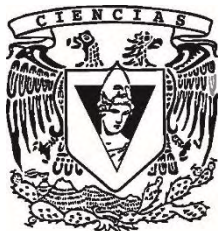
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIOLOGA**

**P R E S E N T A:**

**Lesli Angelina Mendoza Ramirez**

**DIRECTORA DE TESIS :**

**Dra. Yolanda González Hernández**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

Abreviaturas.....	1
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Tuberculosis .....	3
Diabetes mellitus.....	4
Diabetes mellitus tipo 2 y tuberculosis pulmonar.....	4
Respuesta inmune hacia <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
Macrófagos.....	6
Receptores de macrófagos para <i>M. tuberculosis</i> .....	6
JUSTIFICACIÓN .....	9
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS .....	10
MATERIAL Y MÉTODO.....	11
Grupos de estudio.....	11
Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). .....	12
Purificación de monocitos a partir de los PBMCs.....	13
Evaluación de pureza de monocitos CD14+.....	13
Tinción de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra con diacetato de fluoresceína (DAF).....	14
Disgregación de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra teñida con DAF.....	14
Cuantificación de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra.....	14
Ensayos de infección y fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i> -DAF en monocitos. .....	15
Cultivos de monocitos con vitamina D (1,25(OH) <sub>2</sub> D3).....	15
Expresión de receptores de fagocitosis en monocitos .....	15
Análisis por citometría de flujo.....	16
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSION .....	25
BIBLIOGRAFÍA .....	26

## **DEDICATORIA**

A Dios y a sus Ángeles, A mis hermanos, A mis abuelos, A mis padres.

Por su amor y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora de tesis, por su apoyo en todo el proyecto de tesis.

A mi tía, que me ha acompañado durante estos años.

A mis familiares, amigos y maestros.

## Abreviaturas

ADA: American Diabetes Association	NK: natural killer
BD: Becton, Dickinson and Company	PBMCs: célula mononuclear de sangre periférica
°C: grados Celsius	PBS: solución amortiguadora por fosfatos
DAF: diacetato de fluoresceína	PPD: derivado proteico purificado
dl: decilitro	rpm: revoluciones por minuto
DM2: diabetes mellitus tipo 2	RPML: medio Roswell Park Memorial Institute
g: gramos	SFB: suero fetal bovino
Hb: hemoglobina	SRCR: receptores tipo scavenger con dominios extracelulares ricos en cisteína
HbA1c: Hemoglobina glucosilada	TB: tuberculosis
h: horas	TSH: hormona estimulante de la tiroides
MTB o <i>M. tuberculosis</i> :	UFC: unidades formadoras de colonia
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	VIH: virus de inmunodeficiencia humana
INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	VD: vitamina D
LAM: lipoarabinomanana	VDR: receptor de la vitamina
LPS: lipopolisacárido bacterianos	
MAC: macrófagos	
mg: miligramos	
ml: mililitro	
µl: microlitros	
MOI: multiplicidad de infección	
FACS: Clasificador de células activadas por fluorescencia	

# RESUMEN

## Introducción.

La diabetes es una enfermedad metabólica que incrementa la susceptibilidad a la infección por *M.tuberculosis*. Los monocitos-macrófagos son los encargados de eliminar a *M.tuberculosis* por el reconocimiento y fagocitosis de la bacteria a través de receptores de fagocitosis como CD14, CD16, CD206, CD209, CD36, CD163. Se ha reportado que los monocitos de pacientes con DM2 tienen disminuida la capacidad de fagocitar a *M.tuberculosis* y por otro lado, se ha demostrado que la forma activa la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriol) incrementa la fagocitosis de *M.tuberculosis* por medio de la inducción de los receptores CD14 y CD206.

## Objetivo.

Se evaluó el efecto de la forma activa de la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) en la capacidad fagocítica hacia *M.tuberculosis* y en la expresión de los receptores CD14, CD16, CD206, CD209, CD36, CD163 en monocitos de pacientes con DM2.

## Metodología.

Monocitos obtenidos de las células mononucleares de sangre periférica por selección positiva (CD14+) se infectaron con *M.tuberculosis*-DAF (MOI 10) durante 1h en condiciones basales y después de 24 h de incubación con la forma activa de la vitamina D, para evaluar el porcentaje de monocitos CD14+ que fagocitaron a *M.tuberculosis* y el número de micobacterias fagocitadas por cada monocito (IMF). Después de la infección, los monocitos CD14+ se incubaron con los anticuerpos anti-CD14 Pe-TxRed, CD16 Alexa 700, CD206 APC-Cy7, CD209 Pe-Cy7, CD36 APC y CD163 PerCP-Cy5.5 durante 15 min, para evaluar el porcentaje de monocitos que expresan cada receptor y el número de receptores expresados en cada monocito (IMF) por citometría de flujo.

**Resultados.**

En condiciones basales, la capacidad de fagocitar a *M.tuberculosis* por monocitos de pacientes con DM2 es similar a la de los sujetos sanos,

Sin embargo, la estimulación con la vitamina D disminuye el porcentaje de células CD14+CD206+ e incrementa el número de receptores CD163 y CD209 en los monocitos que fagocitaron a *M.tuberculosis* en pacientes con DM2.

**Conclusión.** La forma activa vitamina D incrementa el número de micobacterias fagocitadas por monocito posiblemente a través de los receptores DC-SIGN (CD209) y el scavenger B (CD163) ya que su expresión se induce significativamente en pacientes con DM2.

# INTRODUCCIÓN

## Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria gram-positiva con un genoma rico de G+C <sup>1</sup>. La infección en el pulmón se inicia después de la inhalación de aerosoles que contienen un pequeño número de bacilos que son internalizados en los macrófagos alveolares (macrófagos residentes del pulmón) <sup>2</sup>. Los rasgos característicos del bacilo de la tuberculosis incluyen: lento crecimiento, latencia prolongada, envoltura celular compleja, patogénesis intracelular y homogeneidad genética. El tiempo de generación de *M. tuberculosis*, en medio sintético o en animales infectados, es de aproximadamente 24 horas <sup>3</sup>. La tuberculosis latente es un conjunto de interacciones entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmune del hospedero. *M. tuberculosis* tiene la capacidad de seguir siendo viable en hospederos infectados por un tiempo prolongado; esto se debe a su capacidad de sobrevivir en el granuloma del huésped asintomático en un estado latente que puede reactivarse posteriormente para causar la enfermedad activa <sup>4</sup> El envejecimiento o la supresión inmune puede inducir reactivación de las bacterias, lo que puede causar brote de la enfermedad a menudo muchas décadas después de la infección inicial <sup>5</sup>.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud la tuberculosis (TB) sigue siendo un importante problema sanitario a escala mundial. La cifra estimada de nuevos casos en 2012 fue de 8,6 millones, y 1,3 millones murieron por esta causa (entre ellos 320 000 seropositivos para el VIH) <sup>4</sup>. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la tuberculosis fue la séptima causa de morbilidad hospitalaria en el año 2002, ya que el 6% del total de pacientes atendidos tuvieron este diagnóstico <sup>6</sup>.



## **Diabetes mellitus.**

La diabetes es la enfermedad crónica en la que el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula los niveles de glucosa en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos <sup>7</sup>. La diabetes mellitus tipo 1 se produce en personas predispuestas genéticamente como consecuencia de la destrucción de las células beta del páncreas que secretan insulina<sup>8</sup>. La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica crónica que resulta de defectos tanto en la secreción como en la acción de la insulina <sup>9</sup>.

El número de diabéticos en el año 2000 fue de 171 millones, se espera que este número crezca a 366 o 440 millones en 2030, con tres cuartas partes de los pacientes en los países de bajos ingresos <sup>10</sup>.

## **Diabetes mellitus tipo 2 y tuberculosis pulmonar.**

Se ha reportado que la Diabetes Mellitus tipo 2 es un factor de riesgo que incrementa la susceptibilidad a muchas infecciones, incluyendo la TB <sup>11</sup>. Las personas con diabetes tienen aproximadamente una probabilidad 2,5 veces mayor de desarrollar tuberculosis <sup>12</sup>. La prevalencia (%) de diabetes es dos veces mayor en personas con tuberculosis que en personas sin dicha enfermedad <sup>13</sup>. En un estudio donde se analizó el impacto de la diabetes sobre el tratamiento a tuberculosis, se observó que las personas con diabetes tienen más probabilidades de que fracase el tratamiento y de morir durante el mismo en comparación con quienes no tienen la infección <sup>14</sup>.

Se ha sugerido que la DM2 causa una reducción en la respuesta inmune (quimiotaxis reducida, fagocitosis y presentación de antígenos) ante la infección de *M. tuberculosis*, lo que facilita la infección y la progresión de los síntomas de la

enfermedad <sup>6263</sup>. En los pacientes con DM2 los monocitos tienen una actividad fagocítica reducida hacia *M. tuberculosis* en comparación con pacientes no diabéticos <sup>64</sup>.

### **Respuesta inmune hacia *Mycobacterium tuberculosis*.**

Las células implicadas en limitar o eliminar a *M. tuberculosis*, son los monocitos, neutrófilos y macrófagos que han sido reclutados al pulmón por citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y por quimiocinas <sup>1516</sup>. Estas moléculas son producidas en conjunto por células epiteliales, endoteliales y macrófagos alveolares <sup>1718</sup>.

La fagocitosis es el proceso por el cual las células fagocitan partículas extrañas, se produce desde organismos unicelulares como eucariotas que lo utilizan para nutrición, hasta los mamíferos en donde juega un papel clave en la inmunidad innata <sup>19</sup>. La fagocitosis es iniciada por la unión de ligandos de partículas a una variedad de receptores en la superficie celular. Esto desencadena una diversidad de señales que conducen a la reorganización del citoesqueleto de actina <sup>20</sup>, un paso controlado por varias GTPasas de pequeño tamaño de la familia Rho/Rac <sup>21</sup> <sup>22</sup>. Fosfatidilinositol 3 quinasa también es reclutado hacia la membrana plasmática (MP), donde contribuye a la extensión de pseudópodos y la formación del fagosoma o vesícula fagocítica <sup>23 24</sup>.

Los fagosomas se forman por invaginaciones de la membrana plasmática <sup>25</sup>. Para superar la pérdida de la membrana de la superficie celular, se cree que los componentes de la membrana plasmática presentes en los fagosomas son reciclados rápidamente a la superficie celular <sup>26</sup>, mientras que las membranas adicionales son reclutadas a los fagosomas de maduración a través de eventos de fusión con orgánulos de endocitosis y vías Post Golgi <sup>27 28 29 30</sup>.

## Macrófagos

Los macrófagos comprenden más del 95% de las células de lavado bronqueoalveolar. Solo uno o dos macrófagos se encuentran por alvéolo, que varían de 9-90  $\mu\text{m}$  de diámetro <sup>31</sup> Estas células constituyen la primera línea de defensa contra macrófagos <sup>65</sup>.

### Receptores de macrófagos para *M. tuberculosis*.

*M. tuberculosis* ha desarrollado numerosos mecanismos para entrar en los macrófagos humanos. *M. tuberculosis* utiliza dos mecanismos distintos para ser opsonizado: con el complemento (la vía y de captura de C2a alternativa), dos ligandos diferentes para diferentes dominios de unión de CR3, y un mínimo de receptores distintos para el reconocimiento de macrófagos <sup>32</sup>.

Receptor LPS (CD14). El CD14 es una glicoproteína de membrana de 55kDa originalmente clasificado como antígeno de diferenciación de la línea mielomenocítica. Está presente en monocitos, macrófagos y granulocitos desactivados, así como en líneas celulares tumorales maduras. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es el principal componente estructural de la pared externa de las bacterias Gram negativas, es un iniciador potente de una respuesta inflamatoria y sirve como un indicador de la infección bacteriana. CD14 se ha identificado como el principal receptor de LPS <sup>33</sup>.

Receptor de baja afinidad de IgG, FcyRIII (CD16). CD16 fue descrito originalmente en Natural Killer (NK) y granulocitos. En el linaje de monocitos, CD16 se encuentra en un subconjunto de los macrófagos maduros donde juega un importante papel en la fagocitosis.

Receptor de manosa (CD206). El Receptor de manosa de macrófagos (MRC1) también identificado como CD206, es una proteína transmembrana de 175 kDa. Los macrófagos derivados de monocitos humanos se unen a *M. tuberculosis* y la internalizan a través de receptores de manosa <sup>34</sup> . CD206 se expresa en

macrófagos <sup>6667</sup>, monocitos derivados de los macrófagos y células dendríticas <sup>68</sup> pero no en monocitos <sup>6869</sup>.

Receptor DC-SIGN (CD209). DC-SIGN sirve como un receptor para la captación del patógeno y media la interacción con una gran cantidad de patógenos entre ellos *M. tuberculosis* <sup>35</sup>. DC-SIGN permite la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDCs) para reconocer a los miembros del complejo *M. tuberculosis* a través de lipoarabinomano (LAM), un lipoglicano abundante en la envoltura de las micobacterias <sup>36</sup>, a través de otras moléculas, tales como lipomano (LM) y arabinomano <sup>37</sup>.

Receptor CD36. Es una glicoproteína de membrana presente en las plaquetas, los fagocitos mononucleares, adipocitos, miocitos, hepatocitos, y algunos epitelios <sup>38</sup>. En los fagocitos, reconoce fosfolípidos y lipoproteínas oxidadas específicas, participa en la internalización de células apoptóticas y de ciertos patógenos, de lipoproteínas de baja densidad modificada, que contribuyen a las respuestas inflamatorias. CD36 también se une a ácidos grasos de cadena larga y facilita su transporte en las células, de esta manera en la utilización muscular de lípidos, almacenamiento de energía en los adipocitos, y la absorción de grasa intestinal. Posiblemente, contribuye a la patogénesis de trastornos metabólicos, como la diabetes y la obesidad <sup>39</sup>.

Receptor CD163. Miembro de los receptores ricos en cisteína (SRCR) de la superfamilia clase B, está altamente expresado en los macrófagos tisulares residentes <sup>40</sup>. La molécula actúa como un receptor para los complejos de hemoglobina y haptoglobina para mediar las interacciones célula-célula entre los macrófagos <sup>41</sup>. CD163 es receptor de macrófagos para las bacterias Gram positivas y negativas, durante la infección bacteriana, en macrófagos tisulares actúa como un sensor inmune innato y un inductor de la inflamación local <sup>40</sup>.

### **Papel de la vitamina D en el control de *M. tuberculosis*.**

La vitamina D está presente en leche fortificada , peces grasos, aceite de hígado de pescado y, en menor medida huevos <sup>42</sup>. La piel también puede producir vitamina D cuando se expone a la luz solar. Existen estudios recientes que sugieren que la vitamina D puede favorecer la prevención o el tratamiento de cáncer y enfermedades autoinmunes <sup>42 43</sup>. El precursor inmediato en la ruta biosintética del colesterol es el 7 dehidrocolesterol (7-DHC). El 7-DHC se produce en cantidades relativamente grandes en la piel de muchos animales vertebrados, incluyendo los seres humanos. Durante la exposición a la luz solar, el 7-DHC absorbe los rayos ultravioleta (UVB) de radiación con longitudes de onda de 290 a 315nm y se convierte en previtamina D3 (preD3). La vitamina D se metaboliza en el hígado por la 25 hidroxilasa (25-OHase) mediante la adición de un grupo hidroxilo a 25 hidroxivitamina D3 [25(OH) D3]. [25(OH) D3] vuelve a entrar en circulación en el riñón y se convierte en 1- $\alpha$ -hidroxilasa (1-OHase) generando así la forma activa de la vitamina D 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D3) o calcitriol <sup>43</sup>. 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 no es sólo producida por las células renales sino que también es secretada por los macrófagos <sup>44</sup>.

Kreutz et al, 2014 <sup>45</sup> demostraron que en cultivos primarios de elutriación en monocitos de sangre purificada el metabolito activo de la vitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D3) podría inducir la maduración de monocitos a los macrófagos en la ausencia de cualquier proteína de suero.

Se ha demostrado una disminución de los niveles de la vitamina D tanto en la progresión de la tuberculosis como en la susceptibilidad a la infección <sup>46 47 15</sup>. La vitamina D mejora la actividad quimiotáctica y la capacidad fagocítica de los macrófagos <sup>48</sup>.

El papel principal de la vitamina D en su forma activa es el de inducir la producción de la catelicidina o LL37. Tras la infección con *M. tuberculosis*, los monocitos, entre otras células involucradas, expresan LL-37. Esto basta para indicar un papel activo

en la eliminación del patógeno, pues está demostrado que la incubación directa de *M. tuberculosis* con LL-37 promueve la muerte del bacilo <sup>70</sup>. La fagocitosis mediada por la vitamina D ocurre a través de la inducción de receptores de membrana como son CD14 y el receptor de manosa (CD206) <sup>71</sup>.

## **JUSTIFICACIÓN**

Se ha reportado que la disminución en la capacidad de fagocitar a *M.tuberculosis* por monocitos incrementa la susceptibilidad a la infección por *M.tuberculosis* y el desarrollo de la enfermedad activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Por otro lado, se ha demostrado que la forma activa la vitamina D (1,25(OH)2D3 o calcitriol) incrementa la fagocitosis de *M.tuberculosis* por medio de la inducción de los receptores CD14 y CD206. Debido a que los pacientes con DM2 tienen bajos niveles de vitamina D en suero, en este estudio se evaluó el efecto de la forma activa de la vitamina D en la fagocitosis y la expresión de receptores involucrados en la fagocitosis de *M.tuberculosis* en monocitos de pacientes con DM2.

## **HIPÓTESIS**

La vitamina D incrementa la expresión de receptores de fagocitosis en monocitos y su actividad fagocítica hacia *M. tuberculosis* en pacientes con DM2.

## OBJETIVOS

1. Evaluar la capacidad de fagocitosis de *M. tuberculosis* monocitos en pacientes con DM2 y sujetos sanos.
2. Evaluar los porcentajes de expresión de CD209, CD36, CD16, CD163 y CD206, receptores involucrados en la fagocitosis de *M. tuberculosis* en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.
3. Evaluar el efecto de la vitamina D en la expresión de receptores y la fagocitosis de *M. tuberculosis* en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Grupos de estudio.**

Se estudiaron 9 pacientes con diagnóstico de DM2 y 9 sujetos sanos, que fueron analizados por pares. Los pacientes diabéticos fueron seleccionados por los médicos de la clínica del metabolismo del INER. Los sujetos sanos que participaron en el proyecto fueron familiares de los pacientes. Todos los voluntarios que aceptaron participar en el estudio proporcionaron su consentimiento informado por escrito. A los voluntarios se les realizó:

- 1.- Evaluación clínica completa por dos médicos internistas y aplicación de un cuestionario estructurado.
- 2.- Exámenes de laboratorio biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática, pruebas de función tiroidea (TSH), HbA1c, y aplicación de PPD.

### **Criterios de Inclusión.**

#### **Pacientes con DM2**

- 1.- Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 65 años.
- 2.- Tener diagnóstico de DM2 según los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA):
  - a) Síntomas de diabetes como: poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso y glucosa en sangre al azar mayor de 200mg/dl.
  - b) Glucosa en sangre en ayuno (mínimo de 8hrs) igual o mayor a 126 mg/dl.
  - c) Glucosa en sangre igual o mayor a 200 mg/dl, 2hrs después de haber recibido una carga de 75g de glucosa (prueba de tolerancia oral a la glucosa).
- 3.- Hemoglobina glucosilada HbA1c >6% (glucosa de 135mg/dl, en los últimos 2 a 3 meses).

#### **Sujetos sanos**

1. No referir alguna enfermedad en el cuestionario clínico.
2. Tener resultados normales de las pruebas de laboratorio clínico (biometría hemática y química sanguínea).



3. Tener valores de hemoglobina glucosilada HbA1c <6%

### **Criterios de Exclusión.**

#### **Pacientes con DM2**

- 1.- Prueba positiva VIH.
- 2.- Pacientes con nefropatía diabética avanzada definida por el estadio 3 de la Current National Kidney Foundation con depuración de creatinina calculada en 30-59 ml/min por 1.73m<sup>2</sup> de superficie corporal ó pacientes con franca insuficiencia renal crónica.
- 3.- Mujeres embarazadas.
- 4.- Niveles de Hb inferiores a 10 mg/dl.
- 5.- Evidencia clínica de procesos infecciosos o enfermedad inflamatoria crónica.

#### **Sujetos sanos**

- 1.- Prueba positiva VIH.
- 2.- Mujeres embarazadas.
- 3.- Niveles de Hb inferiores a 10 mg/dl.
- 4.- Evidencia clínica de procesos infecciosos o enfermedad inflamatoria crónica.

### **Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).**

Se obtuvieron 80 ml de sangre venosa periférica por flebotomía con heparina como anti-coagulante con técnica convencional. La sangre venosa se diluyó 1:1 con 80 ml de medio RPMI suplementado con glutamina (Lonza, Walkersville USA). A 40 ml de la sangre diluida, se agregó hasta el fondo con una pipeta Pasteur y se adicionó 10ml de la solución separadora de leucocitos. Los tubos se centrifugaron a 1200rpm, 25°C sin freno durante 45 minutos. Se separó el anillo leucocitario por aspiración con una pipeta de transferencia y se colocó en un tubo cónico de 50ml. Las células se lavaron tres veces con 50ml medio RPMI suplementado con glutamina para eliminar el remanente de solución separadora de leucocitos, las PBMC se resuspenden 10 ml de medio RPMI suplementado con glutamina.

### **Purificación de monocitos a partir de los PBMCs.**

Los PBMC purificados se centrifugaron 10 min a 1500rpm a 4°C para eliminar el medio RPMI y se resuspendieron en 80 ml de buffer de Miltenyi (2mM EDTA, 0.5%BSA en PBS) por cada  $10^7$  PBMC y se les adicionó 10  $\mu$ l del anticuerpo anti-CD14-microbeads (Miltenyi Biotech, Alemania) por cada  $10^7$  PBMC. Se incubaron las células durante 15 min a 4°C y se lavaron adicionando 80  $\mu$ l de buffer de Miltenyi por cada  $10^7$  PBMC, las células se centrifugaron a 1500rpm durante 10 min a 4°C para eliminar el exceso de anticuerpo y se resuspendieron en 500ul de buffer de Miltenyi. Para separar los monocitos CD14+, se colocó una columna en un soporte magnético con un prefiltro ((Miltenyi Biotech, Alemania) y se agregaron las PBMC marcadas. Las células que no son retenidas en la columna corresponden a la fracción negativa a CD14 y fueron colectadas en un tubo como fracción negativa. Posteriormente se lavó la columna con buffer de Miltenyi 3X para eluir las células no adheridas. Después se retiró la columna del soporte magnético y se colocó sobre un tubo nuevo, se adiciono 1ml de buffer de Miltenyi y se obtuvieron las células CD14+ presionando con la ayuda de un émbolo dentro de la columna, esta fracción corresponde a las células CD14+. Los monocitos CD14+ se centrifugaron a 1500rpm durante 10min a 4°C y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con glutamina y 10% de PSH (pool de suero humano) descomplementado. Se contaron los monocitos y se ajustaron a  $1 \times 10^6$ /ml con medio RPMI suplementado con glutamina y 10% de PSH.

### **Evaluación de pureza de monocitos CD14+.**

Para evaluar el porcentaje de monocitos en cada muestra, en tubos de poliestireno de 12 X 75 (Falcon, Norte America) se adicionaron  $0.2 \times 10^6$  de monocitos CD14+ (fracción positiva),  $0.5 \times 10^6$  de No-monocitos CD14- (fracción negativa) y  $0.5 \times 10^6$  de PBMC y se les adicionó 5  $\mu$ L del anticuerpo anti-CD14 marcado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, Madrid España), se mezclaron los tubos y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después, para eliminar el anticuerpo no unido, se adicionó 1 ml de sol de lavado para FACS y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y a cada tubo se le

adicionó 200  $\mu$ L de solución de lavado para FACS y se adquirieron 50000 eventos de cada tubo en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Systems, San Diego California). La pureza de los monocitos fue mayor a 96% en todas las muestras.

### **Tinción de *M. tuberculosis* H37Ra con diacetato de fluoresceína (DAF)**

Para evaluar la capacidad de los monocitos para fagocitar a *M. tuberculosis* por citometría de flujo, primero se acopló con un colorante fluorescente a la bacteria de *M. tuberculosis* H37Ra. Un lote de 30 viales de *M. tuberculosis* a una concentración de  $8 \times 10^{13}$  por vial, se les adicionó 5  $\mu$ l de DAF (Fluka, Suiza) a una concentración de 5 mg/ml se agitó y se incubó durante 10 minutos a 4°C. Para la eliminación del exceso de DAF, se adicionó 1 ml de PBS (Lonza, Walkersville USA) frío 10X y se centrifugaron los viales cada vez a 8000 rpm durante 8 minutos. Una vez eliminado el colorante, las bacterias se resuspendieron en PBS.

### **Disgregación de *M. tuberculosis* H37Ra teñida con DAF**

*M. tuberculosis* -DAF se disgregó con una jeringa de 3 ml subiendo y bajando la suspensión celular durante 10 veces y posteriormente con una jeringa de insulina otras 10 veces. Los viales se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos y se colectó el sobrenadante de las bacterias disgregadas y se almacenaron a -20° hasta su uso. Para los ensayos de fagocitosis antes de infectar con *M. tuberculosis*-DAF, se disgregaron las bacterias con una jeringa de 1 ml, subiendo y bajando la suspensión celular durante 10 veces.

### **Cuantificación de *M. tuberculosis* H37Ra.**

La cuantificación de la concentración de *M. tuberculosis*-DAF se realizó mediante el conteo de UFC. Brevemente, se adicionaron 100  $\mu$ l de *M. tuberculosis* a un tubo conteniendo 900  $\mu$ l de medio líquido 7H9 Middlebrook (Difco, Detroit, MI), y se realizaron 19 diluciones seriadas, después de cada dilución se colocaron 10  $\mu$ l de cada dilución por triplicado en placas de medio sólido Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI). Las placas de agar se incubaron durante 21 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se obtuvo una concentración de  $7.3 \times 10^6$  /ml.

### **Ensayos de infección y fagocitosis de *M. tuberculosis*-DAF en monocitos.**

Se colocaron  $0.5 \times 10^6$  monocitos CD14+ recién purificados (basal) en tubos de poliestireno de 12 X 75 y se adicionó *M. tuberculosis* H37Ra-DAF a un MOI de 1:10 y se incubaron durante 1 hr a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min y se decantó el sobrenadante. Los monocitos se lavaron con 2 ml de PBS frío para eliminar las bacterias no fagocitadas y se continuó con la tinción de superficie.

### **Cultivos de monocitos con vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D3).**

$0.5 \times 10^6$  monocitos CD14+ se estimularon con 10 nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D3 durante 24h. Después de la incubación se infectó con *M. tuberculosis* H37Ra-DAF MOI 1:10 por 1 hr a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, los monocitos se lavaron con 2 ml de PBS frío para eliminar las bacterias no fagocitadas, se continuó con la tinción de superficie.

### **Expresión de receptores de fagocitosis en monocitos**

$0.2 \times 10^6$  monocitos CD14+ se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-human CD14 Pe-TxRed, CD16 Alexa 700, CD206 APC-Cy7, CD209 Pe-Cy7, CD36 APC y CD163 PerCP-Cy5.5 (BioLegend San Diego California), se incluyeron como controles células sin tinción, tubos de compensación y tubos FMO. Para los ensayos con vitamina D, primero se realizó la tinción de viabilidad adicionando con 1 µl del reactivo fluorescente eFluor650 (Fixable Viability Dye Cell Staining, e-Bioscience USA) durante 15 minutos protegidos de la luz. Las células se lavaron con 1ml de solución de lavado y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, posteriormente se incubaron los monocitos con anticuerpos anti- CD14 Pe-TxRed, CD16 Alexa 700, CD206 APC-Cy7, CD209 Pe-Cy7 y CD163 PerCP-Cy5.5, los tubos se agitaron para mezclar los monocitos con los anticuerpos y se incubaron durante 15 minutos a 4°C protegidos de la luz. Como controles se incluyeron: células sin tinción, tubos de compensación y tubos FMO. Transcurrido el período

de incubación se adicionó 1ml de solución de lavado para FACS, y se centrifugaron los tubos a 1500 rpm, 5 minutos, los monocitos fueron resuspendidos en 200 µl de solución de lavado y almacenadas a 4°C hasta su adquisición en un período no mayor a (24 horas).

### **Análisis por citometría de flujo**

Se adquirieron 300000 eventos/células en un período no mayor a 24h, en FACS Canto II equipado con láseres de 488 y 633 nm. Los resultados fueron analizados con el software FACS DIVA (BD Systems, San Diego California) en gráficos de puntos e histogramas para cuantificar el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los receptores acoplados a fluorocromos.

### **Análisis estadístico.**

Los datos fueron normalizados con la fórmula: Unidades arbitrarias (% del control)= porcentaje de células positivas del paciente / porcentaje de células positivas del sano X 100, y para la intensidad media de fluorescencia es: Unidades arbitrarias de fluorescencia (% del control)= IMF de células positivas del paciente / IMF de células positivas del sano X 100. Los datos se analizaron con la prueba de Mann-Whitney mediante un programa de software (GraphPad Software, USA). Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### Características clínicas de los grupos.

Los pacientes con diabetes tipo 2 fueron principalmente mujeres, con una edad promedio de 49 años, un IMC de 28, lo que indica que tenían sobrepeso, y un tiempo de evolución de diabetes de 8 años en promedio, con colesterol y triglicéridos elevados ( más de 150 mg/dl y de 200 mg/dl respectivamente) y sin control glucémico (Hemoglobina glicada de 9.5) y valores de vitamina D bajos (< 50mM). Los sujetos sanos se encuentran en valores normales excepto el colesterol que se encontraron elevados en ambos grupos (Tabla 1).

**Tabla 1. Datos clínicos del grupo con DM2 y sujetos sanos.**

	<b>DM2</b>	<b>SANOS</b>
<i>Edad</i>	49 (29-59)	47 (36-58)
<i>Género (F/M)</i>	5 / 4	6 / 3
<i>Peso kg</i>	73 (69-78)	68 (53-92)
<i>Talla m</i>	2 (1.59-1.7)	2 (1.5-1.78)
<i>IMC</i>	27 (23.45-30.5)	25 (20.7-28.9)
<i>Evolución de DM2 (años)</i>	8 (2-15)	-
<i>Glucosa</i>	182 (110-283)	97 (95-105)
<i>Hemoglobina glicada</i>	9.5 (6-12.6)	6 (5.2-6.2)
<i>Colesterol</i>	206 (149-294)	181 (167-221)
<i>Triglicéridos</i>	275 (141-587)	137 (73-210)
<i>LDL</i>	127 (77-187)	113 (97-153)
<i>HDL</i>	42 (31-63)	45 (33-64)
<i>Vitamina D 25(OH)D3 en suero (nM)</i>	48.3 (32.5-68.25)	53.4 (27.75-80.5)
<i>PPD</i>	6(+) / 3(-)	6(+) / 3(-)

LDL y HDL: lípidos de baja y alta densidad

IMC: Índice de masa corporal

PPD: prueba cutánea de derivado proteico purificado

## **Análisis de la fagocitosis de *M. tuberculosis* en monocitos CD14+ y la expresión de receptores CD209, CD36, CD16, CD163.**

Se utilizaron tres estrategias para el análisis:

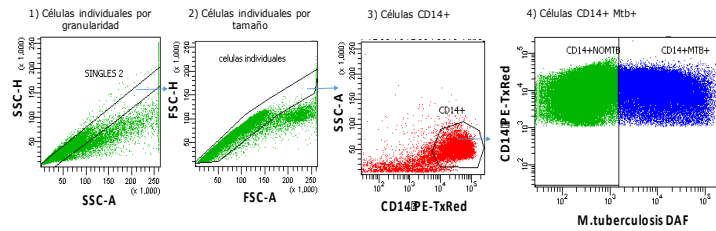
La primera fue para evaluar la fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF en monocitos CD14+ recién aislados, en dónde se seleccionaron las células individuales por granularidad y tamaño para discriminar entre células individuales y agregados celulares, posteriormente se seleccionaron las células CD14+ y células CD14+ vs *M.tuberculosis*-DAF+ (Figura 1a).

El segundo análisis fue para evaluar la fagocitosis *M.tuberculosis*-DAF en monocitos CD14+ estimulados con la vitamina D después de 24h de incubación, aquí se discriminó entre células individuales y agregados celulares, posteriormente se seleccionaron las células CD14+ vivas y por ultimo se selecciono las células CD14+*M.tuberculosis*-DAF+ (Figura 1b).

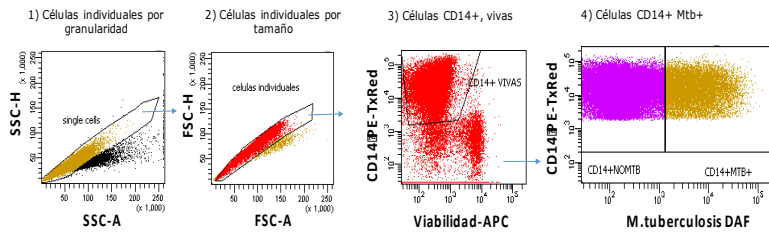
Por ultimo, siguiendo las estrategias anteriores, posteriormente se analizó la expresión de CD209, CD36, CD16, CD163 en los monocitos CD14+*M.tuberculosis*-DAF+ (Figura 1c).

Con base a las estrategias anteriores se analizaron los ensayos de fagocitosis y de expresión en el grupo de pacientes con DM2 y sujetos sanos y los datos fueron normalizados con la fórmula: Expresión (% del control)= porcentaje de células positivas del paciente / porcentaje de células positivas del sano X100.

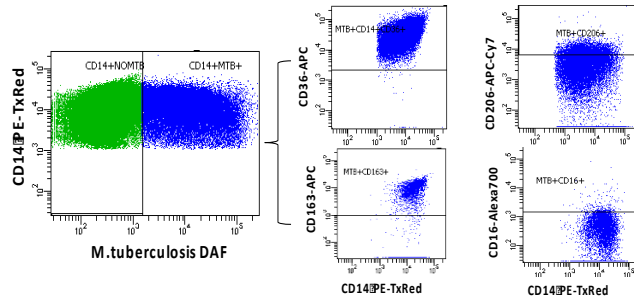
**a) Estrategia de análisis para evaluar la fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF**



**b) Estrategia de análisis para evaluar la fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF en monocitos estimulados con Vitamina D**



**c) Estrategia de análisis para evaluar la expresión de receptores en monocitos infectados con *M.tuberculosis*-DAF.**



**Figura 1. Estrategia de análisis.** a) Fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF. a) Análisis para evaluar la fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF en monocitos recién aislados: identificación de subpoblaciones de acuerdo a su granularidad (1), a su tamaño (2), a la expresión de CD14 (3) y las células CD14+M*tuberculosis*-DAF+ (4). b) Análisis para evaluar la fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF en monocitos estimulados con vitamina D (1,25(OH)D3): identificación de subpoblaciones de acuerdo a su granularidad (1) tamaño (2), selección de células CD14+ vivas con la sonda LIVE/DEAD- APC (3) y selección de las monocitos CD14+*M. tuberculosis*-DAF+. c) Análisis de receptores CD209, CD36, CD16, CD163 en monocitos infectados con *M.tuberculosis*-DAF.



**La fagocitosis de *M. tuberculosis* no se encuentra alterada en los monocitos de pacientes con DM2.**

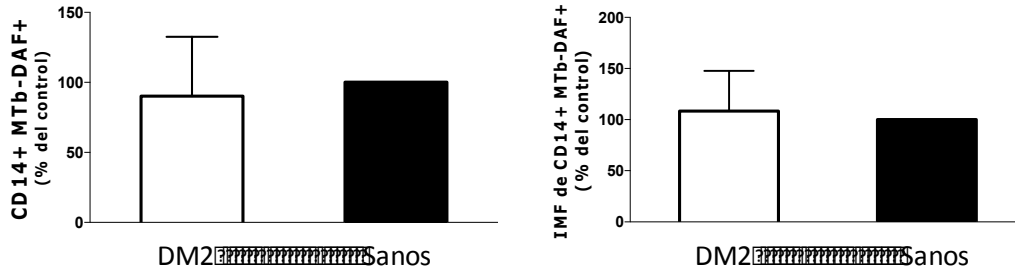
Para evaluar si el proceso de fagocitosis se encontraba alterado en los monocitos de pacientes con DM2, se analizó el porcentaje de monocitos CD14+ que eran positivos a *M.tuberculosis*-DAF y la cantidad de *M.tuberculosis*-DAF dentro de cada monocito CD14+ por medio de la intensidad media de fluorescencia de *M.tuberculosis* (IMF) de acuerdo a la estrategia de análisis mostrada en la Figura 1.

Como se observa en la Figura 2a. No encontramos diferencia en el porcentaje de monocitos que fagocitaron a *M.tuberculosis*-DAF ni en la cantidad de bacterias fagocitadas Figura 2a por monocito en los pacientes con diabetes ( $p > 0.05$ ).

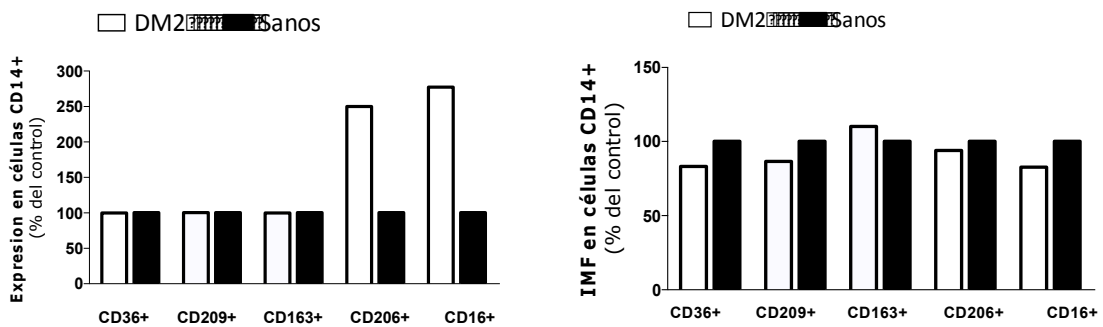
**La expresión de los receptores CD36, CD216, CD206, CD163 y CD209 no se encuentran alterados en los monocitos CD14+*M. Tuberculosis*-DAF+ en pacientes con DM2.**

Con base a la hipótesis de que la fagocitosis de *M. tuberculosis* es se encontraba disminuida, evaluamos el fenotipo por medio de la expresión de los receptores CD209, CD36, CD16, CD163 y CD206 en los monocitos que tienen la capacidad de fagocitar a *M.tuberculosis* en pacientes con DM2. Sin embargo, no hay cambios significativos en la expresión de los receptores en los monocitos de los pacientes con DM2 cuando se compara con la expresión de los sujetos sanos, ni en el porcentaje de monocitos o en el número de receptor expresado por célula (IMF) Figura 2b.

a) Fagocitosis de *M.tuberculosis*-DAF



b) Fenotipo de los monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos



**Figura 2. Fagocitosis de *M.tuberculosis* en los monocitos de los pacientes con DM2 (n: 9) y sujetos sanos y sujetos sanos (n: 9).** a) Grafica de barras del porcentaje de células CD14+*M.tuberculosis*-DAF+ (izquierda), y grafica de barras del la intensidad media de fluorescencia (IMF) de células CD14+*M.tuberculosis*-DAF+, de los pacientes con DM2 y sujetos sanos). b) Porcentaje (izquierda) e IMF (derecha) de expresión de receptores de membrana CD36, CD209, CD163, CD206, CD16+ en los monocitos de los pacientes con DM2 y sujetos sanos. Los datos fueron normalizados con respecto al % del control y se compararon con la prueba U de Mann Whitney una  $p > 0.05$  es considerada como diferencia significativa, se muestra la mediana de cada grupo.

**La estimulación con vitamina D 1,25(OH)D<sub>3</sub> incrementa el número de bacterias de *M. tuberculosis* fagocitadas en los monocitos de pacientes con DM2.**

Con base a que se ha reportado que la forma activa de la vitamina D 1,25(OH)D<sub>3</sub> incrementa la fagocitosis de *M. tuberculosis*, se evaluó el efecto de la vitamina D en la fagocitosis de *M. tuberculosis*-DAF en los monocitos de los pacientes con DM2,

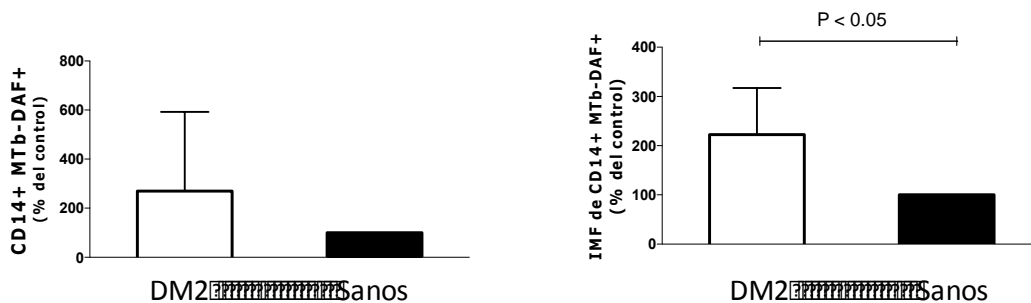
Se observó que la vitamina D incrementa el número de bacterias de *M. tuberculosis*-DAF por monocito CD14+ (  $p < 0.05$ ) Figura 3a.

**La vitamina D (1,25(OH)D<sub>3</sub>) disminuye la expresión de CD206 y aumenta la expresión de receptores CD163 Y CD209 en los monocitos *M. tuberculosis*+ en pacientes con DM2.**

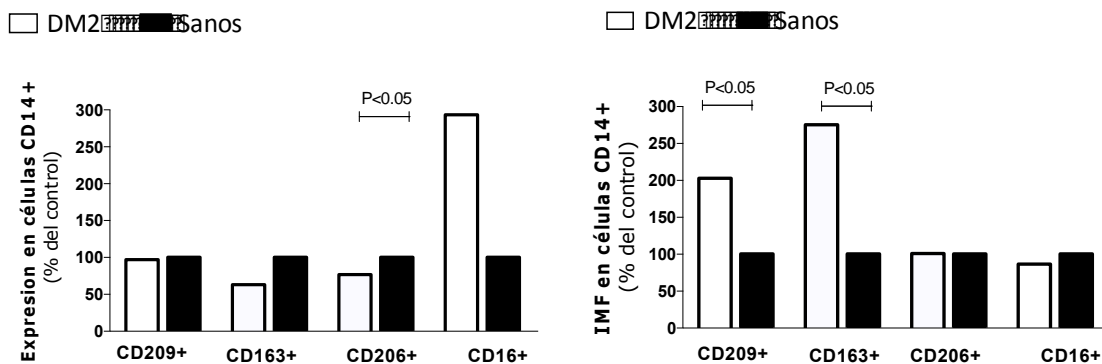
Se ha reportado que el mecanismo por el cual la vitamina D 1,25(OH)D<sub>3</sub> incrementa la fagocitosis de *M. tuberculosis* es a través de la inducción del receptor de manosa CD206 en monocitos de sujetos sanos, por lo que se evaluó el efecto de la vitamina D en la expresión de CD209, CD36, CD16, CD163 y CD206 en monocitos de pacientes con DM2.

Con vitamina D e infectadas con *M. tuberculosis*, los monocitos de los pacientes con DM2 presentan una disminución significativa del porcentaje de células CD206+ (  $p < 0.05$ ) Figura 3b y un aumento significativo en la IMF de CD163 y CD209 respectivamente de con (  $p < 0.05$ ) (Figura 3b).

a) Efecto de la vitamina D en la fagocitosis de *M. tuberculosis*-DAF



b) Efecto de la vitamina D en el fenotipo de los monocitos de pacientes con DM2



**Figura 3. Efecto de la vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en la fagocitosis y el fenotipo de monocitos *M. tuberculosis*-DAF+ en pacientes con DM2 (n: 6) y sujetos sanos (n: 6).** a) Grafica de barras del porcentaje de células CD14+*M. tuberculosis*-DAF+, (izquierda), y grafica de barras del la intensidad media de fluorescencia (IMF) de células CD14+*M. tuberculosis*-DAF+, de los pacientes con DM2 y sujetos sanos. 2b). Porcentaje (izquierda) e IMF (derecha) de expresión de receptores de membrana, CD209, CD163, CD206, CD16+ en los monocitos de los pacientes con DM2 y sujetos sanos. Los datos fueron normalizados con respecto al % del control y se compararon con la prueba U de Mann Whitney una p>0.05 es considerada como diferencia significativa, se muestra la mediana de cada grupo.

## DISCUSIÓN

La diabetes es una enfermedad metabólica que incrementa la susceptibilidad a la infección por *M.tuberculosis*, se sabe que la eliminación de *M.tuberculosis* se lleva a cabo por los monocitos-macrófagos por el reconocimiento la bacteria a través de receptores de fagocitosis como CD14, CD16, CD206, CD209, CD36, CD163, y la fagocitosis para su eliminación <sup>50</sup>.

Se ha reportado que los macrófagos diferenciados a monocitos de pacientes con DM2 tienen disminuida la capacidad de fagocitar a *M.tuberculosis* <sup>71</sup>, Sin embargo, nuestros datos muestran que los monocitos de los pacientes con DM2 recién extraídos del ambiente hiperglucémico no tienen afectada la capacidad de fagocitar a *M.tuberculosis-DAF*, estas diferencias posiblemente se deban a otros factores en la diferenciación. Y debido a que se ha reportado que uno de los mecanismos asociados a la disminución de la fagocitosis es por la modificación de receptores de membrana como CD14 y CD209 <sup>70</sup>, evaluamos la expresión de receptores de fagocitosis de *M.tuberculosis* clásicos como el CD16, CD206, CD14 y CD209 y los receptores de fagocitosis scavenger CD163, CD209 para identificar mecanismos asociados a la susceptibilidad a *M.tuberculosis*. De acuerdo a los resultados observados en la fagocitosis, tampoco la expresión de los receptores se encuentra alterada en los monocitos con DM2.

Considerando la hipótesis de que la fagocitosis de *M.tuberculosis* se encontraría disminuida en los pacientes con DM2 y a que se había reportado que la forma activa la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> o calcitriol) incrementa la fagocitosis de *M.tuberculosis* por medio de la inducción de los receptores CD14 y CD206, también se analizó si la forma activa de la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> o calcitriol) podía mejorar el proceso de fagocitosis.

Encontramos que la forma activa de la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> o calcitriol) incrementa el número de bacterias de *M.tuberculosis-DAF* fagocitadas por monocitos en pacientes con DM2. Estos resultados concuerdan con lo reportado en sujetos sanos, en dónde la estimulación con vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) induce la fagocitosis de *M. tuberculosis*<sup>70</sup>. Sin embargo, aquí observamos mayor efecto en los pacientes con DM2.

A analizar si la expresión de los receptores CD163, CD209, CD36, CD16 y CD14 estaban regulados por la vitamina D encontramos que en los pacientes con DM2 la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) disminuye el porcentaje de monocitos CD206+ y aumenta la expresión de receptores CD209 y CD163 en el grupo de los pacientes con DM2. Estos resultados muestran un efecto modulador de la vitamina D diferente en pacientes con diabetes tipo 2, por lo que más estudios se requieren para saber si la vitamina D favorece el control de *M.tuberculosis* en los pacientes con DM2<sup>53 70</sup>.

## **CONCLUSION**

La forma activa vitamina D incrementa el número de micobacterias fagocitadas por monocito posiblemente a través de los receptores DC-SING (CD209) y el Scavenger B (CD163) ya que su expresión se induce significativamente en pacientes con DM2.

## BIBLIOGRAFÍA

1. De Cock, K. M. Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 579–580 (1995).
2. Kaufmann, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 20–30 (2001).
3. Kaufmann, S. H. E., Cole, S. T., Mizrahi, V., Rubin, E. & Nathan, C. Mycobacterium tuberculosis and the host response. *J. Exp. Med.* **201**, 1693–1697 (2005).
4. La, S. & Para, C. R. Informe mundial sobre la tuberculosis 2013. *Organ. Mund. la Salud* (2013).
5. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
6. Vargas Ruiz, M., Ríos Núñez, L., Salazar Lezama, M. A. & Cano Valle, F. Costos de Atención de la Tuberculosis: Caso del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* (2003).
7. OMS. OMS | Diabetes. *Nota descriptiva No312 1* (2012). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
8. Group, D. P. T.-T. 1 S. *et al.* Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care* **28**, 1068–1076 (2005).
9. DeFronzo, R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* **131**, 281–303 (1999).
10. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047–1053 (2004).

11. Martens, G. W. *et al.* Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 518–524 (2007).
12. Ottmani, S. E. *et al.* Consultation meeting on tuberculosis and diabetes mellitus: Meeting summary and recommendations. in *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **14**, 1513–1517 (2010).
13. Goldhaber-Fiebert, J. D., Jeon, C. Y., Cohen, T. & Murray, M. B. Diabetes mellitus and tuberculosis in countries with high tuberculosis burdens: Individual risks and social determinants. *Int. J. Epidemiol.* **40**, 417–428 (2011).
14. Baker, M. A. *et al.* The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review. *BMC Med.* **9**, (2011).
15. Chabalgoity, J., Pereira, M. & Rial, A. Inmunidad contra los agentes infecciosos.
16. Law, K. *et al.* Increased release of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 799–804 (1996).
17. Valledor, A. F., Borràs, F. E., Cullell-Young, M. & Celada, A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 405–417 (1998).
18. Shinnick, T. M. *Tuberculosis*. **215**, (Springer Berlin Heidelberg, 1996).
19. Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
20. May, R. C. & Machesky, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **114**, 1061–1077 (2001).
21. Caron, E. & Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717–1721 (1998).



22. Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J. C. & Chavrier, P. Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* **17**, 6219–6229 (1998).
23. Cox, D., Tseng, C. C., Bjekic, G. & Greenberg, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **274**, 1240–1247 (1999).
24. Vieira, O. V *et al.* Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* **155**, 19–25 (2001).
25. Heine, J. W. & Schnaitman, C. A. A method for the isolation of plasma membrane of animal cells. *J. Cell Biol.* (1971).
26. Pitt, A., Mayorga, L. S., Stahl, P. D. & Schwartz, A. L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J. Clin. Invest.* **90**, 1978–1983 (1992).
27. Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G. & Griffiths, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* **124**, 677–688 (1994).
28. Jahraus, A. *et al.* In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 30379–30390 (1998).
29. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).
30. Takashiba, S. *et al.* Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor  $\kappa$ B. *Infect. Immun.* **67**, 5573–5578 (1999).
31. Fels, A. O. & Cohn, Z. A. The alveolar macrophage. *J. Appl. Physiol.* **60**, 353–369 (1986).
32. Ernst, J. D. Macrophage Receptors for Mycobacterium tuberculosis.

- Infection and Immunity* **66**, 1277–1281 (1998).
33. Triantafilou, K., Triantafilou, M. & Dedrick, R. L. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* **2**, 338–345 (2001).
  34. Schlesinger, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* **150**, 2920–2930 (1993).
  35. Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Engering, A., 't Hart, B. A. & van Kooyk, Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 33–54 (2004).
  36. Maeda, N. *et al.* The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **278**, 5513–5516 (2003).
  37. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* **197**, 7–17 (2003).
  38. Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 785–791 (2001).
  39. Hirsch, C. S., Ellner, J. J., Russell, D. G. & Rich, E. A. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J. Immunol.* **152**, 743–753 (1994).
  40. Fabriek, B. O. *et al.* The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* **113**, 887–892 (2009).
  41. Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198–201 (2001).
  42. Webb, A., Pilbeam, C., Hanafin, N. & Holick, M. An evaluation of the relative contributions of exposure to sunlight and of diet to the circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D in an elderly nursing home population in Boston. *Am J Clin Nutr* **51**, 1075–1081 (1990).

43. Garland, C. F. *et al.* The role of vitamin D in cancer prevention. *American Journal of Public Health* **96**, 252–261 (2006).
44. Stoffels, K. *et al.* Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-D3-1alpha-hydroxylase in human monocytes. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 37–47 (2006).
45. Kreutz, M. & Andreesen, R. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* **76**, 2457–2461 (1990).
46. Liu, P. T. & Modlin, R. L. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 371–376 (2008).
47. Nnoaham, K. E. & Clarke, A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* **37**, 113–119 (2008).
48. Van Halteren, A. G. S., Tysma, O. M., Van Etten, E., Mathieu, C. & Roep, B. O. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis. *J. Autoimmun.* **23**, 233–239 (2004).
49. Gomez, D., Twahirwa, M., Schlesinger, L. & Restrepo, B. Reduced *Mycobacterium tuberculosis* association with monocytes from diabetes patients that have poor glucose control. *Tuberculosis* (2013). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979212001904>>
50. Hossain, M. M. & Norazmi, M.-N. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword? *Biomed Res. Int.* **2013**, 179174 (2013).
51. Stew, S. S., Martinez, P. J., Schlesinger, L. S. & Restrepo, B. I. Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity. *Tuberculosis (Edinb)*. **93 Suppl**, S78–82 (2013).
52. Satoh, N., Shimatsu, A. & Himeno, A. Unbalanced M1/M2 Phenotype of Peripheral Blood Monocytes in Obese Diabetic Patients Effect of pioglitazone. *Diabetes ...* (2010). at <<http://care.diabetesjournals.org/content/33/1/e7.short>>

53. Parsa, R. Macrophage activation phenotypes in type 1 diabetes pathogenesis and therapy. (2009).
60. Restrepo BI, Camerlin AJ, Rahbar MH et al. Cross-sectional assessment reveals high diabetes prevalence among newly-diagnosed tuberculosis cases. *Bull World Health Organ* 2011; 89: 352–359.
61. Dooley KE, Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: Convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 737–746.
62. Gómez DI, Twahirwa M, Schlesinger LS, Restrepo BI. Reduced Mycobacterium tuberculosis association with monocytes from diabetes patients that have poor glucose control. *Tuberculosis* 2013; 93: 192–197.
63. Gordon SB, Read RC. Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br Med Bull.* 2002; 61:45–61.
64. Wileman TE, Lennartz MR, Stahl PD. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83:2501–2505.
65. McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17:18–24.
66. Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10:50–55.
67. Stahl PD. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4:49– 52.
68. Hernández Sánchez, F., Herrera Barrios M.T, Torres Rojas M., Papel de la vitamina D en la infección con Mycobacterium tuberculosis: Evidencias en torno a su papel protector, *Neumol Cir Torax Vol. 70 - Núm. 4:252-260.* (2011).

69. Lüdemann A, Debarry J, Singh PB., Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. *Epigenetics*. Volume 6. (2011).
70. Selvaraj P., Afsal K., Harishankar M., Vitamin D and macrophage functions in tuberculosis, Department of Immunology, National Institute for Research in Tuberculosis (Formerly Tuberculosis Research Centre), Indian Council of Medical Research. (2015).
71. Zabaleta, J. et al. "Diminished Adherence And/or Ingestion of Virulent *Mycobacterium Tuberculosis* by Monocyte-Derived Macrophages from Patients with Tuberculosis." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5.5: 690–694 (1998).

1. Datos del alumno  
Mendoza Ramírez Lesli Angelina  
Celular: 5531929910  
Email: leslimr90@gmail.com  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
Número de cuenta: 307552437

2. Datos del tutor  
Dra.  
Yolanda González Hernández

3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Martha Torres Rojas

4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Joel Armando Vázquez Pérez

5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Esmeralda Juárez Carvajal

6. Datos del sinodal 4  
Dr.  
Luis Horacio Gutiérrez Gonzáles

7. Datos del trabajo escrito  
Expresión de los receptores de fagocitosis CD209, CD36, CD16, CD163 y CD206 en monocitos infectados con M. tuberculosis y el efecto del tratamiento con 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en monocitos de pacientes con DM2.  
32 páginas.  
2017.