



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Conversión del precursor de la vitamina D (25OHVD3) a su forma activa la 1,25OHVD3 por macrófagos (MDM) en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo de hiperglucemia *in vitro*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**LEONARDO DANIEL VILLALANA ALVAREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ  
Ciudad Universitaria, CDMX., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

1. Datos del alumno  
Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

2. Datos del tutor  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.  
Título  
Subtítulo  
Número de páginas  
Año

1. Datos del alumno  
Villalana  
Alvarez  
Leonardo Daniel  
53 38 32 18  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311016327

2. Datos del tutor  
Dra.  
Yolanda  
González  
Hernández

3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Martha  
Torres  
Rojas

4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Luis Horacio  
Gutiérrez  
González

5. Datos del sinodal 3  
M. en C.  
Fernando  
Hernández  
Sánchez

6. Datos del sinodal 4  
Dr.  
Augusto José  
González  
Canto

7. datos del trabajo escrito  
Conversión de la vitamina D (25OHVD3) a su forma activa la 1,25OHVD3 por macrófagos (MDM) en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo de hiperglucemia *in vitro*.  
56 p  
2018

## **Agradecimientos**

Primero quiero agradecer a mis padres que se esforzaron para que pudiera salir adelante y que no dudaron que lograría mi cometido, que me dieron su apoyo incondicional, por lo que no les podré pagar con dinero sino con esfuerzo y dedicación, pues así verán el fruto de la semilla que plantaron de ese árbol que está creciendo y que ha concluido una etapa importante de su vida gracias a ellos. Con cariño, amor, orgullo y respeto.

A mi asesora la Dra. Yolanda González Hernández por brindarme su tiempo y compartirme sus conocimientos, y su paciencia. Por brindarme la oportunidad de obtener mi título en su espacio de trabajo y confiarme parte de un proyecto más grande.

A la Dra, Martha Torres, al Dr. Luis Horacio Gutiérrez y al M. en C. Fernando Hernández por sus comentarios, observaciones y sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Augusto José González Canto por su constante apoyo en mi formación profesional. Por ser el primero en proporcionarme un espacio en un laboratorio para poder formarme como Biólogo. Por su paciencia y las llamadas de atención que me permitieron formar las habilidades necesarias para las etapas venideras.

A mis amigos y compañeros por sus consejos, pero especialmente a Ariel Salazar Mondragón por sus continuas porras, por brindarme su mano en los momentos más difíciles, en su consejo y regaño y por estar siempre que le necesite. A Ana Karen Fraga Osnaya por explicarme las cosas que no lograba entender de química, por ayudarme siempre que acudí a ella y acompañarme a dónde nadie más lo hizo.

Y a todas aquellas personas que han influenciado de alguna manera en este trabajo, en mi formación y en general en mi vida. Pues me han acompañado en ciertos trayectos que en su momento fueron importantes.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 Vitamina D.....	7
1.1.1 Metabolismo del precursor de la Vitamina D .....	8
1.1.2 Acciones metabólicas de la vitamina D .....	9
1.1.3 Metabolismo de la vitamina D en células del sistema inmune.....	9
1.1.4 Vitamina D y la inducción de péptidos antimicrobianos.....	12
1.2 Vitamina D y tuberculosis.....	13
1.3 Diabetes y tuberculosis.....	14
1.3.1 Diabetes tipo 1.....	15
1.3.2 Diabetes tipo 2.....	16
1.4 Vitamina D, Diabetes y tuberculosis.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo general .....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
5. MÉTODO.....	20
5.1 Muestras sanguíneas.....	20
5.2 Separación de células mononucleares de sangre periférica.....	20
5.3 Separación de monocitos CD14+ por perlas metálicas .....	20
5.4 Cultivos celulares y condiciones de hiperglucemia <i>in vitro</i> .....	21
5.5 Extracción de proteínas de citoplasma y núcleos celulares.....	22
5.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	23
5.7 Evaluación de la pureza de los núcleos por FACS.....	23
5.8 Extracción de mRNA de MDM .....	24
5.9 Síntesis de DNA complementario por transcripción reversa .....	25
5.10 Expresión de genes por PCR en tiempo real .....	26
5.11 Análisis de los datos por el método $\Delta\Delta CT$ .....	27

5.12 ELISA .....	28
5.12.2 Cuantificación del 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	29
5.12.1 Cuantificación del receptor de vitamina D (VDR).....	29
5.13 Análisis de datos .....	30
6. RESULTADOS .....	31
6.1 Características de las muestras biológicas.....	31
6.2 Los monocitos se obtuvieron con una pureza promedio del 99% .....	32
6.3 Los núcleos se obtuvieron con una pureza promedio del 70% .....	33
6.4 La forma activa de la vitamina D se produce en bajas concentraciones y no se afecta su concentración por la hiperglucemia, la infección con <i>M. tuberculosis</i> o la estimulación con 25(OH)D <sub>3</sub> .....	34
6.5 Las concentraciones del VDR en núcleo no se modifican con la hiperglucemia, la infección con <i>M. tuberculosis</i> o la estimulación con 25(OH)D <sub>3</sub> .....	36
6.6 La hiperglucemia in vitro no modifica la expresión de CYP27B1, VDR y LL37 en MDM...	39
6.7 La estimulación con el precursor de la vitamina D 25(OH)D <sub>3</sub> ) aumenta la expresión de LL-37 .....	40
6.8 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induce la expresión de la enzima CYP27B1 .....	41
6.9 El precursor de la vitamina D (25OH) y la infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induce la expresión de LL-37 en 30mM de glucosa .....	42
7. DISCUSIÓN.....	44
8. CONCLUSIONES .....	46
8. REFERENCIAS .....	47
9. ANEXOS .....	52

## ABREVIATURAS.

°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1α,25-dihidroxicolecalciferol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-dehidrocoleciferol
AgSHB	Antígeno de superficie de la hepatitis B
BDP	Proteína transportadora de la vitamina D ( <i>vitamin D-binding protein</i> )
DC	Células dendríticas ( <i>dendritic cell</i> )
cDNA	DNA complementario ( <i>DNA complementary</i> )
CYP27A1	Enzima coleciferol-25-hidroxilasa
CYP27B1	25-hidroxicolecalciferol-1α,25-hidroxilasa
dL	Decilitros
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FACS	Clasificación de células exitadas por fluorescencia ( <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> )
HBD	β-defensinas humanas ( <i>human beta-defensins</i> )
HRP	Peroxidasa del rábano ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN	Interferón
IL	Interleucina
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Kg	Kilogramo
LL-37	Catelicidina
LS	Tamaño grande ( <i>large size</i> )
MDM	Macrófagos derivados de monocitos ( <i>monocyte-derived macrophages</i> )
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Índice de multiplicidad de infección ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	RNA mensajero ( <i>messenger RNA</i> )
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nmol	Nanomoles
O.D.	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHO	Organización Panamericana de la Salud ( <i>Pan American Health Organization</i> )
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>pathogen-associated</i> )

*molecular patterns)*

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaccion</i> )
PDB	Banco de datos de proteínas ( <i>protein data banck</i> )
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT-qPCR	PCR cuantitativo por transcripción reversa ( <i>quantitative reverse transcription</i> )
PRR	Prueba de detección para sífilis
RI	Resistencia a insulina
rpm	Revoluciones por minuto
SALUD	Secretaría de Salud
TB	Tuberculosis
TLR	Receptores tipo Toll ( <i>Toll like receptor</i> )
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
UFC	Unidades formadoras de colonias
VDR	Receptor de la vitamina D ( <i>vitamin D receptor</i> )
VDRE	Elementos de respuesta a la vitamina D ( <i>vitamin D response element</i> )
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana



## RESUMEN

**Introducción.** Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tienen una probabilidad de 2 a 8 veces mayor de padecer tuberculosis (TB) que una persona sana; lo cual representa un serio problema de salud pública. Se ha sugerido a la deficiencia de vitamina D como posible factor de susceptibilidad al desarrollo de TB ya que tanto los pacientes con DM2 como los pacientes con TB presentan menores niveles séricos de vitamina D, además se ha demostrado in vitro que las altas concentraciones de glucosa glucosilan el receptor de la vitamina D (VDR), que es el factor de transcripción encargado de inducir la expresión de péptidos antimicrobianos como el LL-37, este péptido es importante ya que controla el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en monocitos o macrófagos. Se ha demostrado que las acciones microbicidas dependientes de la vitamina D están reguladas en los monocitos y/o macrófagos, para que se induzcan se requiere del reconocimiento de patógenos los cuales inducen a la enzima CYP27B1, además de la presencia del precursor de la vitamina D y de su receptor VDR.

**Objetivo.** Evaluar la conversión de la 25(OH)D<sub>3</sub> a su forma activa la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, así como su actividad a través del péptido LL-37 en MDM infectados con *M. tuberculosis* en condiciones de hiperglucemia in vitro.

**Método.** Se cultivaron MDM con 5.5, 15 y 30mM de glucosa durante 24 horas, transcurrido este tiempo fueron infectados con *M. tuberculosis* y estimulados con 25(OH)D<sub>3</sub> 1µM durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la extracción de proteínas del citoplasma y de los núcleos de los MDM y se cuantificó a la enzima CYP27B1, al VDR y a la forma activa de la vitamina D por el método de ELISA. En ensayos paralelos en las mismas condiciones, los MDM se lisaron para la extracción de mRNA total y se cuantificó la expresión del mRNA de CYP27B1, de VDR y del LL-37 por PCR en tiempo real.

**Resultados.** Las concentraciones de glucosa 15 y 30mM en combinación, con la infección con *M. tuberculosis* y/o con la estimulación con el precursor 25(OH)D<sub>3</sub> no induce la producción del VDR, de la CYP27B1 o la forma activa de la vitamina D. Sin embargo, cuando se evaluó la expresión del VDR, de la CYP27B1 y de la inducción del péptido antimicrobiano LL-37, se observó que la estimulación con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> en las condiciones de 15 y 30mM de glucosa induce la expresión de LL-37 (p = 0.0003 y p = 0.0214 respectivamente); esto sugiere que ya se encontraba presente la enzima CYP27B1. Cuando se infectan los MDM con *M. tuberculosis*, se induce el mRNA CYP27B1 en 5.5 (p = 0.0214), 15 (p = 0.0113) y 30mM (p = 0.0057), pero no se induce el péptido LL-37, lo que sugiere un posible mecanismo de inhibición por *M. tuberculosis*. Al estimular los MDM con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> e infectar con *M. tuberculosis*, se observó que, a pesar de que no se induce la enzima CYP27B1, la expresión del mRNA de LL-37 se induce en la concentración de glucosa 30mM. Debido a que ese mismo efecto se observa cuando se adiciona el precursor de la vitamina D sin ningún otro estímulo, podemos sugerir que se debe al efecto de la enzima presente y que convierte el precursor a la forma activa de la vitamina D.

**Conclusión.** La estimulación con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> en altas concentraciones de glucosa (30mM) induce la expresión del mRNA LL-37 en MDM infectados con *M. tuberculosis*.

# 1. MARCO TEÓRICO

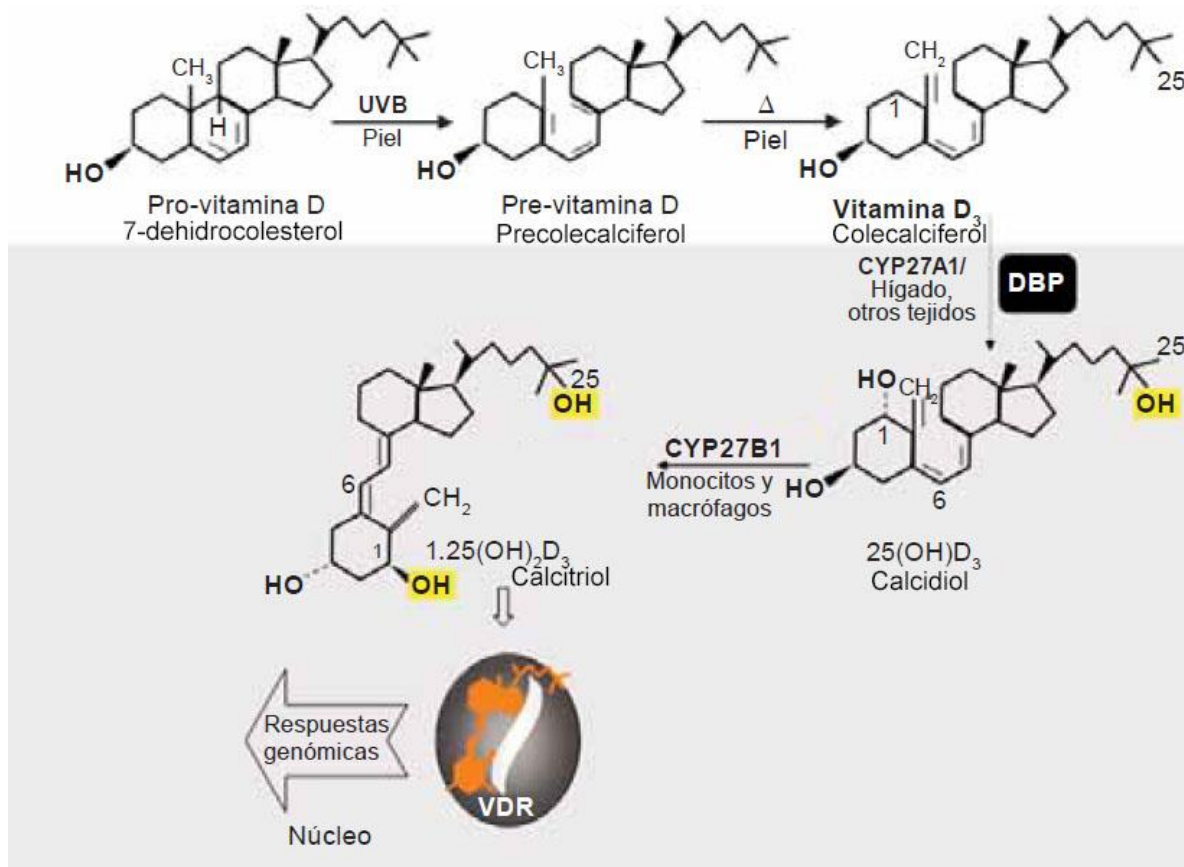
## 1.1 Vitamina D

La vitamina D, también conocida como calcitriol o  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , es una hormona liposoluble involucrada en un complejo sistema endócrino (González-Padilla *et al.*, 2011), cuya principal función está relacionada con la mineralización ósea y con la homeostasis del calcio; es un micronutriente esencial para los animales superiores. La vitamina D tiene otras funciones importantes en el sistema inmunológico como la diferenciación de monocitos a macrófagos o células dendríticas y la eliminación de agentes patógenos; su deficiencia se asocia con numerosos procesos patológicos, tanto infecciosos como crónico degenerativos (Flores & Lozada, 2011). En el ser humano, la suficiencia de vitamina D es referida a la concentración de su precursor la  $25\text{(OH)D}_3$  (colecalfiferol) en el suero. Cuando la concentración de la  $25\text{(OH)D}_3$  es menor a 50 nmol/L se considera deficiencia moderada, valores entre 50 hasta 75 nmol/L se considera insuficiencia y valores por arriba de 75 nmol/L es considerada como suficiencia de vitamina D (Flores & Lozada, 2011; Heaney & Holick, 2011).

En el hombre, la fuente de obtención de la vitamina D proviene de la transformación cutánea del 7-dehidrocolesterol en presencia de la luz solar. El 7-dehidrocolesterol se encuentra en grandes cantidades en las membranas celulares de los queratinocitos (Maskin, 2009). La transformación ocurre por la exposición a la luz ultravioleta con una longitud de onda entre 290-315nm, los fotones son absorbidos por el 7-dehidrocolesterol de la membrana de las células de la epidermis y la dermis. La absorción de la radiación ultravioleta abre el anillo B del 7-dehidrocolesterol, formando el precolecalciferol. Esta sustancia es inestable y rápidamente se convierte en colecalfiferol (Valero & Hawkins, 2007). Tanto el colecalfiferol (Vit  $\text{D}_3$ ) como el ergocalciferol (Vit  $\text{D}_2$ ) son precursores de la vitamina D y pueden ser adquiridos en diversos alimentos, como huevo, leche, mantequilla y pescado (Marazuela, 2005).

### 1.1.1 Metabolismo del precursor de la Vitamina D

Después de ser sintetizado o ingerido, el colecalciferol se une a la proteína transportadora de vitamina D (BDP), y viaja por torrente sanguíneo hasta que llega al hígado (Valero & Hawkins, 2007), allí la enzima colecalciferol-25-hidroxilasa (CYP27A1) hidroxila al colecalciferol en la posición 25, para formar a la 25-dehidrocolecalciferol ( $25(\text{OH})\text{D}_3$ ), también conocido como calcidiol o precursor de la vitamina D. El  $25(\text{OH})\text{D}_3$  tiene una segunda hidroxilación en el carbono 1 (figura 1) por acción de la oxigenasa mitocondrial 25-hidroxicolecalciferol- $1\alpha$ ,25-hidroxilasa (CYP27B1) en el riñón y otros órganos, para producir la vitamina D activa, también conocida como calcitriol o  $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Voet, Voet, & Pratt, 2009).



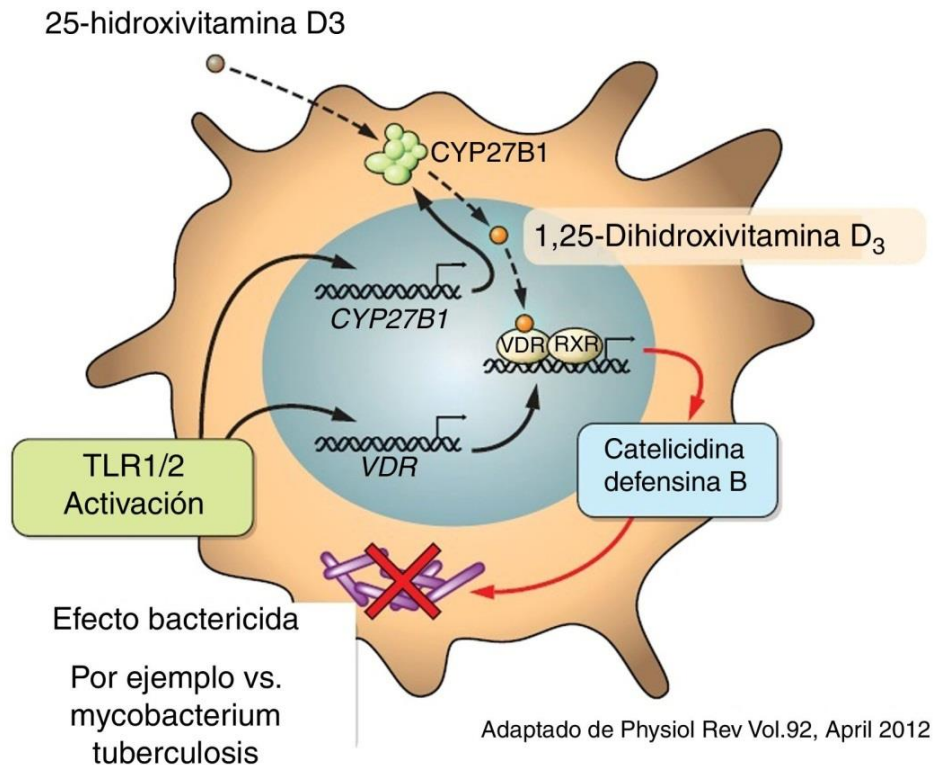
**Figura 1. Metabolismo de la vitamina D.** Imagen modificada de Hernández Sánchez, Teresa, Barrios, & Rojas (2011).

### **1.1.2 Acciones metabólicas de la vitamina D**

Las funciones de la vitamina D en el organismo son: la absorción intestinal de calcio y fósforo que se ingiere en la dieta, la mineralización de la matriz ósea, la resorción ósea y la reabsorción de calcio (Devlin, 2004). Además del metabolismo óseo, la vitamina D tiene acciones sobre células del sistema inmune, como es la apertura de canales de calcio y cloro en osteoblastos, la migración de células endoteliales, tiene una actividad anti-inflamatoria inhibiendo citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el interferón (IFN- $\gamma$ ) y la interleucina 6 (IL-6), y es un importante inductor de los péptidos antimicrobianos hCTD y las  $\beta$ -defensinas (HBD), en particular HB2 y HB3 (Enith *et al.*, 2011; Olmos *et al.*, 2015).

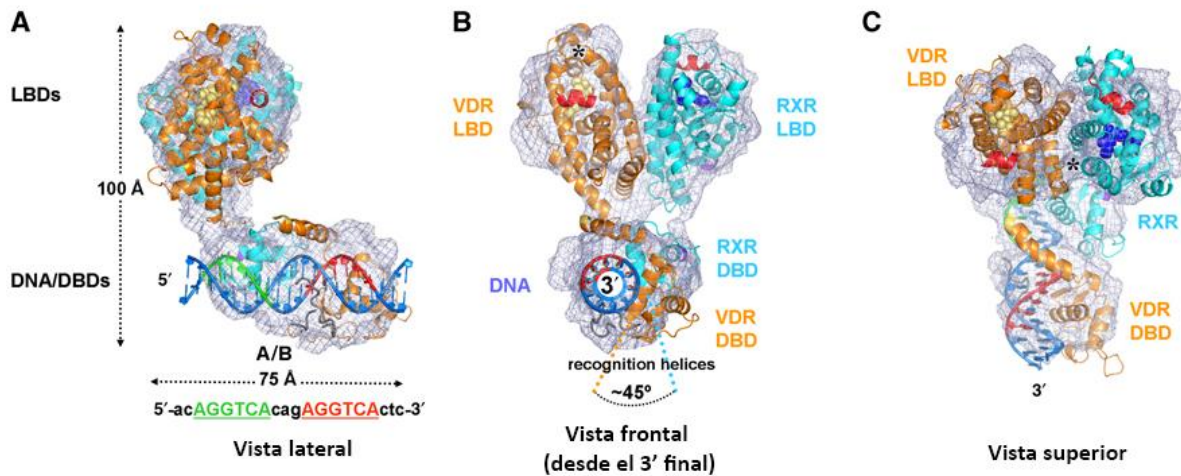
### **1.1.3 Metabolismo de la vitamina D en células del sistema inmune**

Aún no se conoce con certeza la forma en la que el precursor de la vitamina D entra a las células del sistema inmune, se cree que es captado el precursor por receptores o bien ingresa sin mediadores. Una vez que el precursor 25(OH)D<sub>3</sub> (calcidiol) ingresa a las células, es necesario para su conversión a la forma activa de la vitamina D (calcitriol) la enzima CYP27B1, la cual se induce a través del reconocimiento patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por los receptores tipo Toll (TLRs) expresados en la superficie de los monocitos/macrófagos (figura 2) (Chun *et al.*, 2014; Güerri-Fernández, *et al.*, 2009; White & Cooke, 2000).



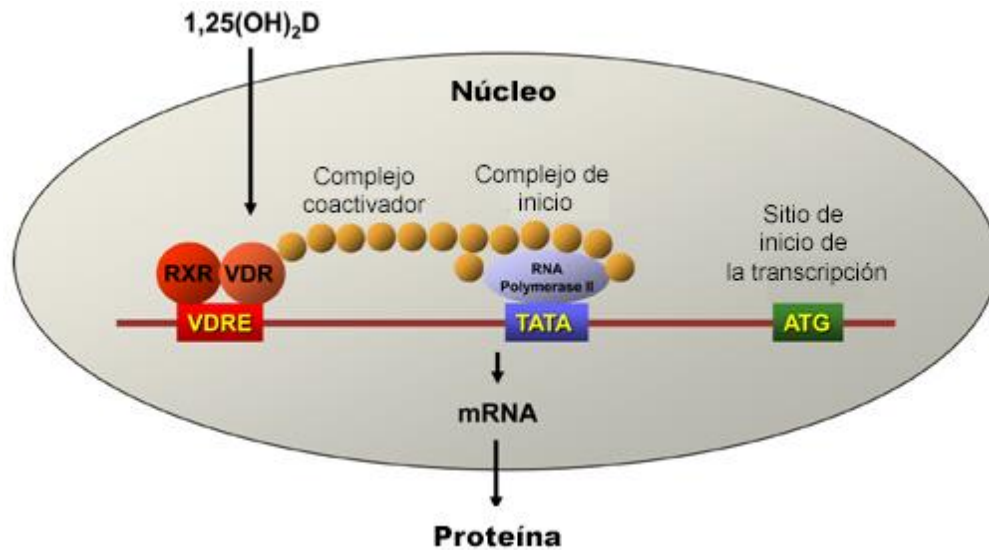
**Figura 2.** Tanto la inducción de la enzima CYP27B1 como el VDR se encuentra altamente regulado por la activación del TLR 1/2. La vitamina D estimula la producción de catelicidinas y defensina B y con ello controla la infección por *M. tuberculosis*. Imagen tomada de (Rosas-Peralta *et al.*, 2017).

Los complejos heterodiméricos que constituyen los subtipos TLR2, TLR6 y TLR1, reconocen proteoglucanos, ácidos lipoteicoicos y factores solubles de *M. tuberculosis* (Güerri Fernández *et al.*, 2009). Una vez que se reconocen los PAMPs por los TLRs, se produce hiperregulación del receptor VDR, este receptor pertenece a una superfamilia de los receptores esteroideos y es un factor de transcripción ligando inducido, formado por 12 hélices  $\alpha$  plegadas sobre sí mismas, el gen del VDR se encuentra en el cromosoma 12. El VDR contiene un dominio de unión al ligando llamado LBD (por sus siglas en inglés) (PDB ID 1DKF y 1DB1), una región de unión para heterodimerización con el receptor del ácido retinoico y otro dominio de unión al DNA (DBD) (PDB ID 1YNW y 2NLL) (figura 3), que se une a regiones en el genoma que responden específicamente a la vitamina D, señalados como elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) (Güerri *et al.*, 2009; Orlov *et al.*, 2012).



**Figura 3. Complejo VD-VDR-RXR.** Representación en 3D del receptor VDR y su heterodimerización con RXR. El DNA se muestra con azul y se especifica con rojo el primer sitio de unión a VDRE y en verde el segundo sitio de unión y se especifica los nucleótidos en los que se lleva la asociación. Los DBD de RXR (cian) y VDR (naranja) se encuentran unidos en la parte posterior del complejo (A). El ligando 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para VDR se muestra en esferas amarillas y el ligando ácido 9-cis retinoico en esferas azules (B). El inciso C muestra la vista superior del complejo. Los modelos se derivan de las estructuras cristalizadas disponibles, de las estructuras cristalizadas para VDR-RXR y su dominio LBD (PDB ID 1DKF y 1DB1) y el modelo VDR-RXR con unión a DNA (PDB ID 1YNW y 2NLL). Imagen modificada de Orlov *et. al* , 2012.

Para que la forma activa de la vitamina D ejerza su acción, primero debe unirse a su receptor VDR ubicado en el citoplasma, el complejo VD-VDR viaja entonces al núcleo donde se asocia con otro receptor, el receptor de ácido retinoico (RXR). Estos heterodímeros se unen a regiones promotoras de los genes que son modulados por la vitamina D (VDRE) (Bikle, 2010) (figura 4). Uno de los genes diana del complejo VD-VDR-RXR es el de la catelicidina o LL-37, que pertenece al gran grupo de péptidos catiónicos con propiedades anfipáticas que se almacenan en los gránulos de los macrófagos (Orlov *et al.*, 2012).



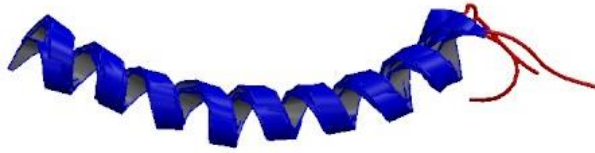
**Figura 4. Mecanismo de Acción de la forma activa de la vitamina D.** Para que la vitamina D ejerza sus funciones relacionadas con la regulación génica, primero debe unirse a su receptor VDR ubicado en el citoplasma, el VDR transporta a la vitamina D al núcleo donde se asocia con otro receptor, el receptor de ácido retinoico (RXR). El complejo VD-VDR-RXR atrae a un complejo de proteínas denominadas coactivadores del complejo VDR-RXR que junto con otros complejos de iniciación permiten la unión de la RNA polimerasa a la caja tata y así dar inicio a la transcripción del mRNA correspondiente. Imagen modificada de Bikle, 2010.

#### 1.1.4 Vitamina D y la inducción de péptidos antimicrobianos

La catelicidina (LL-37) (figura 5) es un péptido antimicrobiano de 37 aminoácidos de largo y un peso de 18kDa codificado por el gen CAMP, hCAP-18 o FALL-39 ubicado en el cromosoma 3. Las catelicidinas están codificadas por genes que consisten en cuatro exones, el primer exón cubre la secuencia que codifica el péptido señal, los exones 2 y 3 codifican el dominio “cathelin” y el cuarto exón codifica el péptido maduro, con el dominio antimicrobiano (Kościuczuk *et al.*, 2012).

La propiedad de la catelicidina de ser catiónica y anfifílica (doble afinidad polar-no polar) le ayuda a permanecer en la membrana de los patógenos. La región hidrofílica causa el correcto alineamiento del péptido sobre la membrana del patógeno (Orlov *et al.*, 2012).





**Figura 5. Modelo en 3D del LL-37.** El LL-37 es un péptido antimicrobiano de 37 aminoácidos de largo (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) con un peso de 18kDa. Posee dos cadenas laterales hidrofóbicas. Su superficie superior es hidrofóbica mientras que la superficie inferior es hidrofílica esto le ayuda a penetrar la membrana de agentes patógenos y crear poros transmembranales (PDB ID 2K6O; Wang, 2008).

El mecanismo de acción de la catelicidina implica la desintegración (daño y cisura) de la membrana del agente patógeno. La interacción del péptido catiónico y la membrana lipídica cargada negativamente permite su adhesión y anclaje paralelo preciso y la neutralización de la carga de la membrana, una vez ocurrido esto el péptido cambia en su estructura secundaria y terciaria pasando a una orientación perpendicular, incrustándose en la bicapa lipídica y creando poros transmembranales (Orlov *et al.*, 2012).

## 1.2 Vitamina D y tuberculosis

Estudios previos han demostrado que la concentración sérica del precursor de la vitamina D, 25(OH)D<sub>3</sub>, de pacientes con tuberculosis (TB) se encuentra disminuida. La deficiencia de la vitamina D se ha considerado como un factor de riesgo para padecer enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes, o infecciosas como la TB (Hong *et al.*, 2014; Nnoaham & Clarke, 2008).

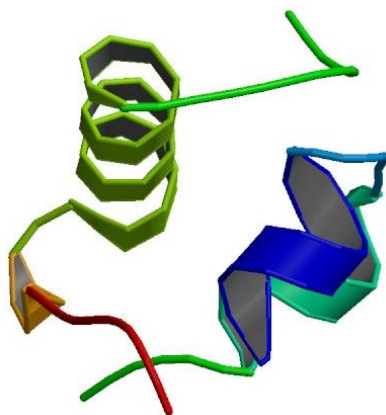
Según la organización mundial de la salud (OMS) la tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo. Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta principalmente a los pulmones y cuya transmisión es por vía aérea. Cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa bacilos tuberculosos al aire. Basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada (OMS, 2017).

*Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo gram-positivo, aerobio obligado, sin movilidad, de crecimiento muy lento. No produce cápsula de polisacáridos. Su envoltura celular, del interior hacia el exterior, presenta una membrana citoplásmica cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular), formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglicolípidos; tal estructura le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes, a un gran número de antibióticos, a las tinciones habituales y le da afinidad por la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl Neelsen y Kinyoun; en el primero se debe calentar la muestra para lograr disociar la capa de lípidos de las micobacterias dejando entrar así el colorante carbol-fucsina, mientras que en el segundo se utiliza un agente tenso activo (alta concentración de fenol) que aumenta la permeabilidad del colorante carbol-fucsina. Los ácidos micólicos de la pared celular de *M. tuberculosis* forman complejos con apariencia acordonada cuando se unen a carbohidratos. Los sulfolípidos presentes inhiben la fusión fago-lisosomal y a menudo se consideran indicadores de cepas virulentas. Por esto último toma relevancia la vitamina D, pues promueve la maduración del fagosoma y la producción de péptidos antimicrobianos (Hong et al., 2014; Mendoza, 2010).

### **1.3 Diabetes y tuberculosis**

La tuberculosis (TB) ha resurgido recientemente en consecuencia a enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La TB y la DM2 se manifiestan con frecuencia de forma conjunta en los adultos. Las personas con DM2 tienen de 2 a 8 veces más de desarrollar TB en comparación con personas sanas (Lopez-Lopez *et al.*, 2014; Tuberculosis *et al.*, 2009).

La Organización Mundial de la Salud define a la diabetes como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina (figura 6) es una hormona polipeptídica de 51 residuos de aminoácidos secretada por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos de Langerhans y es la encargada de regular la concentración de la glucosa en la sangre. Existen dos tipos básicos de diabetes mellitus: diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 (Reyes & Arellano, 2008; Salud, 2017a).



**Figura 6. Modelo en 3D de la insulina humana.** La insulina es una hormona polipéptica de 51 aminoácidos, cuenta con dos cadenas, la primera consta de 21 aminoácidos (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN) y la segunda cadena de 30 aminoácidos (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYYTPKA). Es secretada por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos de Langerhans y es la encargada de regular la concentración de la glucosa en la sangre (PDB ID 3I3Z; Reyes & Arellano, 2008).

### 1.3.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 (DM1) también es conocida como insulino dependiente o infanto-juvenil, que se da en la etapa juvenil o da inicio en la infancia. Se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Los desencadenantes de los fenómenos de la DM1 no se han podido explicar del todo, y no se pueden prevenir con el conocimiento actual (OMS, 2017a). La DM1 representa entre el 5-10% de la DM, de esta se reconocen dos subtipos: la DM autoinmune y la DM idiopática. La primer forma, la DM autoinmune, representa el 95% de la DM1, se manifiesta por consecuencia de una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas y en estos casos aparecen en sangre diferentes tipos de anticuerpos, dirigidos contra las propias células del individuo (anticuerpos anti-islotes o ICA), otros contra la insulina (anticuerpos anti-insulina) o también contra la descarboxilasa del ácido glutámico (anticuerpos anti-GAD<sub>65</sub>) o contra las tirosin-fosfatasa (anticuerpos anti-IA-2 e IA-2 $\beta$ ), pueden llegar a manifestarse uno o más de estos anticuerpos en ayunas (Escobar & Tébar, 2009). Se conoce como DM idiopática al conjunto de manifestaciones de DM1 en los que se desconoce su etiología, en estos casos se presentan anticuerpos no conocidos, no asociados con HLA, la insulinemia (nivel de insulina en sangre) es muy fluctuante en estos pacientes. Se presenta con más frecuencia en poblaciones de África y Asia. (Escobar & Tébar, 2009).

### 1.3.2 Diabetes tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) también es llamada no insulino dependiente, se da mayormente en la edad adulta, pero en la actualidad también se ha manifestado en niños (OMS 2017). Es el tipo de DM más frecuente, el 90-95% del total de los casos. Se caracteriza por la presencia de resistencia a insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. Tiene un origen multifactorial y no se observa la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas (Escobar & Tébar, 2009).

La obesidad abdominal está manifestada en más del 85% de los diabéticos tipo 2. La carga genética es importante, pero el medio ambiente, en especial el sedentarismo determina la manifestación del cuadro clínico (Escobar & Tébar, 2009).

El páncreas mantiene una secreción de insulina en los pacientes con DM2 suficiente para contrarrestar la resistencia a la insulina, el diabético se mantiene en situación funcional de no insulino dependencia, pero lo común es que con el paso de los años, el páncreas falle y la secreción de insulina sea insuficiente para controlar la glucemia, en este momento es cuando el diabético tipo 2 cambia a ser insulino dependiente (Escobar & Tébar, 2009).

La resistencia a la insulina (RI) se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo (Serrano-Ríos, 2002).

Se distinguen varias etapas de esta patología. En la fase inicial se observa fundamentalmente resistencia a la insulina. Para intentar mantener niveles de euglucemia (niveles normales de glucosa en sangre) el páncreas responde secretando más insulina frente a un mismo estímulo de hiperglucemia, compensando así la resistencia a la insulina; posteriormente en la fase intermedia la hiperinsulinemia (niveles altos de insulina en sangre) no es capaz de mantener la euglucemia debido a que los tejidos periféricos se vuelven más resistentes a la insulina y el páncreas no es capaz de compensar la resistencia a la insulina y por tanto se observan picos de hiperglucemia acompañados de hiperinsulinemia; en la fase intermedia-avanzada se observan periodos largos de

hiperglucemia que inhiben la producción de insulina por el páncreas (toxicidad de la glucosa), presentándose así fenómenos de hiperglucemia e hiperinsulinemia seguidos de hiperglucemia e hipoinsulinemia (niveles bajos de insulina en sangre). Por último la fase avanzada en la que la patología no solo se caracteriza por resistencia a la insulina, además se exhibe un cese casi completo en la producción de insulina por el páncreas (deficiencia de insulina) (López J. & López L. 2008).

La resistencia a la insulina está caracterizada por alteraciones de su receptor y los defectos intracelulares posteriores a la estimulación de éste. Estos defectos abarcan la actividad del receptor (tirosincinasa y proteincinasa) y las moléculas transportadoras de glucosa. Hasta ahora, la mayor parte de las evidencias apoyan como los sitios involucrados en la resistencia a la insulina al receptor, a las proteínas substrato del receptor (IRS-1, SHD), al transportador de glucosa (GLUT4) y a las enzimas de la vía de síntesis del glucógeno. La eficiencia reducida de la translocación del GLUT 4 implica la alteración del mecanismo más importante de captación de glucosa postprandial (González & Alexanderson, 1999).

La DM2 es una enfermedad metabólica en la cual el sistema inmune se afecta por las altas concentraciones de glucosa en sangre favoreciendo el desarrollo de enfermedades infecciosas entre las que se encuentra la tuberculosis pulmonar (Álvarez & Placeres, 2016).

#### **1.4 Vitamina D, Diabetes y tuberculosis**

Se ha propuesto a la vitamina D como el posible enlace entre la TB y la DM, debido a que se ha observado una deficiencia de vitamina D en pacientes en los que coexisten estas dos enfermedades. En un estudio midieron el precursor de la vitamina D (25(OH)D<sub>3</sub>) en suero de pacientes con TB, en pacientes con DM2, en pacientes con ambas enfermedades y en sujetos sanos, encontraron que los niveles de vitamina D en los sujetos sanos era mayor que la de los demás grupos y observaron que el 45% de pacientes con DM2 y TB, el 26.6% con solo TB, el 17.39% con solo DM2 y el 7.69% de los controles sanos presentaron una severa deficiencia de vitamina D, con concentraciones menores a 10 ng/dL en suero (Chaudhary *et al.*, 2013).

Una de las vías por lo que los pacientes con DM2 tienen una mayor susceptibilidad a TB es la hiperglucemia o altas concentraciones de glucosa en sangre. Estudios previos han reportado que la expresión de LL-37 se encuentra disminuido en pacientes con DM2, lo que puede sugerir la susceptibilidad de estos pacientes a las infecciones microbianas y específicamente al caso de *M. tuberculosis* (González-Padilla *et al.*, 2011; Lopez-Lopez *et al.*, 2014).

Otro mecanismo de susceptibilidad es la glucosilación del VDR, Hernández y colaboradores encontraron que altas concentraciones de glucosa, en 30mM, glucosilan la proteína VDR en macrófagos derivados de monocitos (MDM) (Hernández-Sánchez *et al.*, 2017).

López-López y colaboradores encontraron que la expresión de VDR y LL-37 se encontraba disminuida en los pacientes con DM2 en comparación con los sujetos sanos. Además observaron que al suplementar a los MDM de pacientes con DM2 con la forma activa de la vitamina D, los MDM eliminaban de manera eficiente a *M. tuberculosis*. (Lopez-Lopez *et al.*, 2014).

Aunque existe una relación entre la DM2, la TB y la vitamina D y los hallazgos sugieren que la actividad microbicida de los macrófagos por una vía dependiente de la vitamina D es el mecanismo de susceptibilidad a la tuberculosis en pacientes con DM2, aún no se conoce si el metabolismo de la vitamina D *per se* está afectado.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La vitamina D es un inmunorregulador que a concentraciones consideradas como deficiencia aumenta la susceptibilidad a enfermedades. Algunos estudios han observado que bajas concentraciones de vitamina D se asocian a la DM2, y se sabe que las altas concentraciones de glucosa causadas por la DM2 glucosilan al VDR, un receptor necesario para las acciones de la vitamina D y que esto afecta a su vez el control intracelular de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, la DM2 y la TB son problemas de salud conectados a través de la vitamina D.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de las altas concentraciones de glucosa en la conversión del precursor de la vitamina D a su forma activa. Asimismo, se evaluaron las concentraciones de las proteínas CYP27B1 y VDR en el citoplasma y el núcleo de los macrófagos y la expresión del péptido antimicrobiano LL-37 como efecto genómico de la vitamina D en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*.

### **3. HIPÓTESIS**

La infección con *M. tuberculosis* en condiciones de hiperglucemia disminuye la conversión del precursor de la vitamina D a su forma activa 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y la síntesis de LL-37 en MDM.

### **4. OBJETIVOS.**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la conversión de la 25(OH)D<sub>3</sub> a su forma activa la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, así como su actividad a través del péptido antimicrobiano LL-37 en MDM infectados con *M. tuberculosis* en condiciones de hiperglucemia in vitro.

#### **4.2 Objetivos particulares**

1. Cuantificar la forma activa de la vitamina D, la enzima CYP27B1 y el receptor VDR en extractos proteicos citoplasmáticos y nucleares de MDM infectados con *M. tuberculosis* bajo concentraciones de glucosa 5.5, 15 y 30mM utilizando el método de ELISA.
2. Cuantificar la expresión del gen que codifica para la enzima CYP27B1, el receptor VDR y péptido antimicrobiano LL-37 en MDM infectados con *M. tuberculosis* en presencia de concentraciones de glucosa de 5.5, 15 y 30mM usando la técnica PCR en tiempo real.

## **5. MÉTODO**

### **5.1 Muestras sanguíneas**

Se obtuvieron concentrados leucocitarios de siete individuos sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER).

### **5.2 Separación de células mononucleares de sangre periférica**

La separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó por el método de separación por densidad. Se colocaron 20 mL de RPMI 1640 (Lonza, BioWhittaker, Maryland, E.U.A.) en tubos para centrífuga (Falcon, Tamaulipas, México) de 50mL, se dejó atemperar y se agregaron en 20mL de sangre por tubo. Posteriormente se añadieron 10mL de solución separadora de linfocitos (Lymphoprep, Oslo Noruega) al fondo del tubo mediante una pipeta Pasteur y se centrifugó a 370 g, 25 °C durante 45 minutos. Transcurrido el tiempo se recuperó el anillo de PBMC y se lavó 3 veces con 50mL de RPMI-1640, centrifugando cada vez a 370 g a 4 °C por 15 minutos. Las PBMC obtenidas se contaron en una cámara de Neubauer (Improved Bright-Line, Harsewinkel, Alemania) y se evaluó su viabilidad con azul de tripano (Gibco, Nueva York, E.U.A.), a una relación de 1:5, 10 µL de suspensión celular y 40 µL de azul de tripano, y ajustando (dilución 1:5), la media de la viabilidad celular fue del 99% (98-100%).

### **5.3 Separación de monocitos CD14+ por perlas metálicas**

Para separar los monocitos, se utilizó un kit comercial con anticuerpos anti la molécula de superficie CD14 MACS (Miltenyi Biotec, California, E.U.A.). Brevemente, los PBMC se resuspendieron en buffer de Miltenyi (80 µL de buffer por cada  $10 \times 10^6$  PBMC), y se agregaron anticuerpos unidos a microperlas anti CD14 MACS® (10 µL de anticuerpos por cada  $10 \times 10^6$  PBMC), estos se dejaron incubar por 15 minutos a 4°C. Tras haber transcurrido el tiempo de incubación se lavó con buffer de Miltenyi para eliminar el exceso de anticuerpos, y se resuspendieron las células hasta en 500 µL de buffer de Miltenyi con 0.5% albúmina sérica bovina (Calbiochem, San Diego, EUA.), 2 mM EDTA (Gibco) en 0.01 mM PBS (Lonza), pH7.2.



Para la separación de los monocitos se colocó una columna LS (Miltenyi Biotec) en su respectivo soporte magnético, se colocó un pre-filtro sobre la columna y ambas se humedecieron con 3 mL de buffer de Miltenyi. Subsiguientemente se agregó la suspensión celular, se lavó la columna cinco veces con 3 mL de buffer de Miltenyi. Para recuperar las células CD14+ se separó la columna del magneto, se colocó un tubo para centrifuga (Falcon) de 15 mL en un gradilla y la columna sobre el tubo, se agregó 5 mL de buffer de Miltenyi y se eluyó con ayuda de un émbolo.

La concentración celular y la viabilidad se calcularon con una cámara de Neubauer y azul de tripano. La suspensión celular se ajustó a  $2.5 \times 10^6$  / mL con RPMI (sin glucosa) (Gibco) + Glutamina (Lonza) + 10% de SFB (Suero fetal bovino) (Hyclone, Logan, E.U.A.) + 5.5 mM de glucosa (Sigma, San Luis, E. U. A.).

Para determinar la pureza de los monocitos separados, se realizó una tinción con CD14/PE para ser analizado en un citómetro (Bectom Dickinson, Nueva Jersey, E.U.A) (anexo 1).

#### **5.4 Cultivos celulares y condiciones de hiperglucemia *in vitro***

$2.5 \times 10^6$  monocitos CD14+ se colocaron en placas de 24 pozos de ultra baja adherencia (Corning, Costar, Nueva York, E.U.A.) para la evaluación de proteínas citoplasmáticas y nucleares. Para los ensayos de expresión de genes, se colocaron  $1 \times 10^6$  monocitos CD14+ en placas de 48 pozos (Corning, Costar) y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante cinco días. Una vez transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio con RPMI (Gibco) (sin glucosa)+G+10% SFB (Hyclone) y concentraciones de glucosa de: 5.5 mM, 15 mM y 30 mM, las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Posteriormente se añadió al medio de cultivo 25(OH)D<sub>3</sub> o 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, y se infectaron con *M. tuberculosis* a un MOI:1, como controles negativos se tomaron a las células en medio de cultivo 5.5 mM de glucosa en ausencia de vitamina D y *M. tuberculosis* durante 24 horas.

## 5.5 Extracción de proteínas de citoplasma y núcleos celulares

Las proteínas de los MDM se extrajeron utilizando 2 buffers de lisis, uno que rompe la membrana celular, para extraer proteínas citoplasmáticas y otro para romper la membrana nuclear y obtener proteínas nucleares, así se obtuvieron de manera separada proteínas de citoplasma y proteínas ubicadas en el núcleo. Brevemente, se eliminó el sobrenadante de cada pozo y se añadió 1mL de PBS (Lonza) frío, se centrifugó a 17000 g por 1 minuto a 4°C, posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500µL de buffer de lisis de membrana celular, [9.65 mM de HEPES (Sigma), 6.65 mM de KCl (Sigma), 0.0965 mM de EDTA (Thermo Fisher), 0.0965 mM de EGTA (Sigma), 0.04825% de NP-40 (Sigma), 24.125 mM de NaF (Sigma), 0.01 mM de PMSF (Sigma), 0.01 mM de DTT (Roche, Basilea, Suiza), 0.1 µg/mL de Leupeptin (Sigma) y 0.05 µg/mL de Aprotinin (Sigma)]; éste se dejó actuar a 4°C durante 30 minutos. Después de este tiempo de centrifugó a 17000 g por 1 minuto a 4°C y el sobrenadante se recuperó (proteínas citoplasmáticas). El pellet celular se le trato con 25 µL de buffer de lisis nuclear [19.3 mM de HEPES (Sigma), 0.386 mM de NaCl (Sigma), 0.965 mM de EDTA (Thermo Fisher), 0.965 mM de EGTA (Sigma), 24.125%, Glicerina (J.K. Baker, New Jersey, E. U. A.), 0.01 mM de PMSF (Sigma), 0.01 mM de DTT (Roche, Basilea, Suiza), 0.1 µg/mL de Leupeptin (Sigma) y 0.05 µg/mL de Aprotinin (Sigma)], se mantuvo en agitación con vórtex durante 20 segundos, posteriormente se mantuvo a 4°C durante 15 minutos, se repitió el procedimiento dos veces. Al haber transcurrido este tiempo, el tubo se centrifugó a 17000 g por 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo (proteínas nucleares).

## 5.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas extraídas de citoplasma y núcleo se realizó por el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración con BSA (0.125 a 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), llegando a un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  con agua. Para la cuantificación de las muestras se colocaron 2 $\mu\text{L}$  de cada muestra en 198  $\mu\text{L}$  de agua, posteriormente se añadió 800 $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (BioRad, Hercules, E.U.A.), se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se cuantificaron las muestras con un espectrofotómetro (Thermo Fisher) a 595 nm usando una celda de cuarzo.

## 5.7 Evaluación de la pureza de los núcleos por FACS

La citometría de flujo es un proceso en el que células u otras partículas en suspensión son alineadas en un flujo frente a un haz luminoso. Cuando la luz difractada incide en el mismo eje de la luz emitida, se evalúa el tamaño celular a través del forward scatter (FSC); mientras que la luz difractada y reflejada es detectada a 90° de la dirección del láser, se evalúa la complejidad interna celular a través del side scatter (SC). Además es posible marcar las células con fluorocromos los cuales pueden ser excitados por un haz de luz con una longitud de onda determinada y permite obtener información de varios parámetros celulares, a este método en particular se le conoce como clasificación de células excitadas por fluorescencia (FACS) (Barrera *et al.*, 2004; Salgado, 2002; Suárez *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se analizaron las proteínas citoplasmáticas y núcleos celulares que no fueron procesados con el buffer de lisis nuclear, por el método de FACS. Bajo el supuesto de que las proteínas fueron extraídas adecuadamente, las muestras de proteínas citoplasmáticas no deben presentar núcleos. Para el análisis de pureza de las muestras se utilizó el anticuerpo anti-CD14/PE (anexo 2), para analizar la existencia de células sin lisar, adicionalmente se empleó el anticuerpo anti-H2A.X/Alexa Fluor-647 (Biolegend) que reconoce a la histona 2A presente en el núcleo y la sonda 7-aminoactinomycin D (7AAD) (Biolegend) que tiñe los ácidos nucleicos, como el DNA dentro del núcleo (anexo 3).

Para poder analizar las proteínas primero fueron incubadas con anticuerpo anti-CD14/PE durante 5 minutos, con el fin de evaluar si permanecían células íntegras tras el proceso de extracción de proteínas; después del tiempo de incubación se lavaron las muestras con 1mL de solución de lavado de FACS, se centrifugaron las muestras a 200g por 5 minutos. Posteriormente fueron lavadas las proteínas citoplasmáticas y los núcleos celulares con 1mL de PBS, se centrifugaron a 250 g por 5 minutos, enseguida se desechó el sobrenadante y se agitó con ayuda de vórtex al *pellet*, posteriormente se añadió gota a gota 500µL de etanol al 70% mientras se mantenía la muestras en agitación con el vórtex. Se incubó las muestras durante 30 minutos a -20 °C. Después de este tiempo se lavaron las muestras con 150µL de solución de lavado de FACS (1% de SFB libre de exosomas y 0.1% de azida de sodio y PBS) 3 veces, centrifugando entre cada lavado a 250g por 5 minutos. Posteriormente se incubaron las muestras con 5 µL de anticuerpo anti-H2A.X y/o 1 µL de 7-AAD según correspondiera durante 5 minutos, después de este tiempo se lavaron las muestras con 1 mL de solución de lavado de FACS, se centrifugaron las muestras a 200g por 5 minutos y por último se añadían 200 µL de paraformaldehído y se almacenaron las muestras a 4 °C. El análisis de las muestras se realizó en un equipo de citometría FACS Aria Fusion (BD, San José, CA, E.U.A.).

### **5.8 Extracción de mRNA de MDM**

Para la extracción de mRNA se utilizó el RNeasy Mini Kit de Qiagen. Brevemente, se eliminaron los sobrenadantes del cultivo y se lisaron las células con 350 µL de buffer RLT, este lisado se trasladó a un tubo para microcentrífuga de 1.5mL, posteriormente se adicionaron 350 µL de etanol al 70%, esta mezcla se traspasó a un tubo de procesado con una columna de membrana de sílica y se centrifugó 30 segundos a 11,304 g a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante en el tubo de procesado y posteriormente se lavó la columna con 350 µL de solución RW1 y se centrifugó con las mismas especificaciones. Se agregó 30 unidades Kunitz de DNasa I (Qiagen) para eliminar el DNA genómico de la columna. Posteriormente se lavó la columna con la misma solución y las mismas condiciones. Posteriormente se realizaron dos lavados con 500 µL de buffer RPE con 11304 g, a temperatura ambiente, el primer lavado con una duración de 30 segundos y el segundo lavado con un tiempo de centrifugación de 2 minutos.

Posteriormente la columna se trasladó a un tubo de 1.5 mL y se agregó 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas (Ambion, Thermo Fisher), se centrifugó durante 1 minuto a 9230 g éste paso se repitió una vez más. El RNA purificado se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.9 Síntesis de DNA complementario por transcripción reversa

Previo a la síntesis de cDNA se debe disponer la mezcla de RNA/primer en un tubo de 0.2 mL estéril agregando los componentes en el siguiente orden (tabla 1).

Componente	Muestra ( $\mu\text{L}$ )	-RT control ( $\mu\text{L}$ )
RNA total	8	8 de agua
Hexámeros aleatorios (50ng/ $\mu\text{L}$ )	1	1
Mezcla 10mM dNTP	1	1
Agua-DEPC	12	12
Total de mezcla	22	22

**Tabla 1. Componentes de la mezcla de RNA/primer** previo a la síntesis de cDNA

Las muestras se incubaron a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min, posteriormente a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 min. Para la reacción de la reversa transcriptasa (RT) se utilizó el kit SuperScript II de Invitrogen en la que se deben de mezclar los siguientes componentes (tabla 2).

Componente	Por reacción ( $\mu\text{L}$ )
10X RT buffer	2
50mM $\text{MgCl}_2$	2
0.1M DTT	2
RNase OUT recombinante	1
Total	7

**Tabla 2. Reactivos para la síntesis de cDNA** a partir del mRNA purificado por columna con membrana de sílica.

Posteriormente se añadió 7  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción RT a cada una de las muestras y se procedió a una incubación a temperatura ambiente durante 2 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 50 unidades de la enzima SuperScript II RT de Invitrogen a cada una de las muestras.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, Foster City CA E.U.A.) con las siguientes especificaciones: 25 °C/ 10 min.; 42 °C/ 50 min. y 70 °C/ 15min. Finalizada la síntesis se agregó 1 µL de RNase H Invitrogen® a cada una de las muestras y se procedió a una incubación de 20 min. a 37 °C. El cDNA se guardó a -20 °C hasta ser utilizado para amplificación por PCR en tiempo real.

### **5.10 Expresión de genes por PCR en tiempo real**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o cuantitativo (qPCR) es una técnica que permite monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre; Cada ciclo de la reacción consta de tres etapas principales. La primera etapa es la desnaturalización, en esta etapa la muestra se eleva a una temperatura de 95 °C para ser separadas las cadenas de DNA. La segunda etapa conocida como hibridación tiene como objetivo alinear los primers al extremo 3' del templado, la temperatura en la que se lleva este proceso oscila entre los 50-60 °C. La última etapa llamada extensión, la polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y cataliza la reacción de síntesis de DNA, agregando dNTP's complementarios a la cadena templete; la temperatura óptima para llevar a cabo esta reacción es de 72 °C. (Cortazar & Silva, 2004; Tamay *et al.*, 2013).

En el PCR en tiempo real se emplean sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un “quencher”, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco; cuando híbrida la sonda ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher y le permite a la polimerasa romper la unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo (Cortazar & Silva, 2004; Tamay *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR cuantitativo por transcripción reversa (RT-qPCR) debido a que se usó cDNA como templete para la reacción. Previo al procedimiento de análisis por PCR en tiempo real se cuantificó y diluyó el cDNA de cada una de las muestras en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, E.U.A.), obteniendo como concentración final 100ng/µL.

Para el análisis por PCR en tiempo real se incorporó la mezcla de TaqMan Universal Master MixII con UNG (Applied Biosystems) con las sondas CYP27B1 (Hs00168017\_m1), VDR (Hs01045840\_m1) y LL-37 (HS00189038\_m1 CAMP), (Applied Biosystems) como se muestra en la tabla 3.

Componente	1x (μL)
2x Universal Master Mix	10
Taq man® 18S-Vic	1
Taq man® (LL37, VDR, CYP27B1)- FAM	1
Total	12

**Tabla 3. Reactivos empleados para el análisis de mRNA por PCR en tiempo real**

Posteriormente se colocó 8 μL de una muestra por pozo en una placa de reacción óptica (Applied Biosystems), enseguida se añadió la mezcla de reacción 12 μL/ pozo y se procedió a amplificar en el equipo Step One Plus, Real Time PCR System (Applied Biosystems), iniciando con la incubación de las muestras a 50 °C durante 2 minutos requeridos para la actividad de la enzima UNG, encargada de la reparación y 95 °C durante 10 minutos. Posteriormente se dio inicio a 40 ciclos, cada ciclo constó de 95 °C por 5 segundos para la desnaturalización de cDNA y DNA, 60°C por 1 minuto para la fase de hibridación. La fase de extensión se llevó a cabo durante el cambio de temperatura de 60 °C a 95 °C.

### **5.11 Análisis de los datos por el método $\Delta\Delta CT$**

Le método de análisis cuantitativo tiene como principio el uso de los datos que se traducen en la evaluación de las curvas de amplificación, en las que se representa la fluorescencia detectada versus el número de ciclos de PCR. La sensibilidad del equipo está determinada por el ciclo en el que la fluorescencia emitida se incrementa por encima del ruido de fondo (umbral). El número de ciclos necesarios para interceptar el valor umbral se llama “ciclo umbral” o “*threshold cycle*” (Ct). El Ct es inversamente proporcional al número de copias iniciales del ADN muestra (Cortazar & Silva, 2004).

Para el método de análisis  $\Delta\Delta CT$  primero se debe realizar una normalización de la cantidad relativa de cada muestra respecto a un gen normalizador de expresión constitutiva en la célula (control endógeno), por lo que la primera diferencia es  $\Delta Ct = Ct (\text{muestra}) - Ct (\text{normalizador})$ , posteriormente se procede al cálculo del  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{calibrador o control})$  (Cortazar & Silva, 2004).

Se utilizó el método de cuantificación relativa (RQ), que permite determinar el número de incrementos o decrementos del mRNA que expresa el calibrador (muestra control o de referencia), que siempre tiene un valor RQ de 1. Todas las muestras se comparan con este calibrador (Cortazar & Silva, 2004; IRIC, n.d.). Para este trabajo se empleó el gen 18S como control endógeno y como condición control la concentración de glucosa 5.5 mM.

## 5.12 ELISA

El método de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) tipo sándwich es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se recubre un pocillo con el primer anticuerpo contra el antígeno que se desea cuantificar. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentre el antígeno, que será retenido en el pocillo por el anticuerpo. Después se realiza un segundo lavado para eliminar el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado, (conjugado con una enzima), la cual reacciona con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Este segundo anticuerpo debe tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte. Posteriormente se adiciona un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora, se detiene la reacción y el color del producto final se puede analizar (Calderón, 2007; Cultek, 2006).

En este trabajo empleamos el método de ELISA para cuantificar la cantidad presente de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ ,  $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  y VDR en los extractos proteicos provenientes del citoplasma y núcleo de cada una de las muestras. Se usaron los kits con anticuerpos policlonales que reconocen epítopos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (E01H0005),  $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  (E01D10269) y del VDR (E0V0028) (BlueGene , Atlanta GA E.U.A.).



### **5.12.2 Cuantificación del 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**

Se evaluaron 100 µL de proteínas de citoplasma o 3 µL de proteínas de núcleos más 97 µL de buffer de lisis de núcleos, esto debido al volumen especificado por el manual proporcionado por BlueGene para la realización del ensayo. Como control negativo se incluyó PBS (proporcionado por el kit) y el buffer de lisis empleado para la extracción de las proteínas citoplasmáticas o nucleares, la curva estándar fue de 0, 50, 100, 250, 500 y 1000 pg/mL (anexo 4). A las muestras problema se añadió 10 µL de solución de balance (para compensar pH), y a todos los pozos, exceptuando los blancos, se añadió 50µL de anticuerpo conjugado (Anticuerpo policlonal ligado a HRP, peroxidasa de rábano) y se incubó la placa por 1 hora a 37°C.

Transcurrido el tiempo se lavó la placa, primero removiendo la mezcla de incubación por aspiración, posteriormente se llenó cada pozo con solución de lavado 1X (PBS proporcionado por el kit), enseguida se retiró el contenido por aspiración. Esta técnica se realizó 5 veces en total.

Para revelar la reacción, se añadió 50 µL de sustrato A (sustrato de la enzima HRP) y 50 µL de sustrato B (sustrato que al reaccionar con la enzima HRP cambia de color). La reacción se dejó en incubación de 10-15 minutos a 37 °C. Después de este tiempo se añadió ácido sulfúrico (proporcionado por el kit) para detener la reacción. Posteriormente se determinó la densidad óptica (O.D.) a 450 nm usando un lector de microplacas (Thermo).

### **5.12.1 Cuantificación del receptor de vitamina D (VDR).**

Se evaluaron 50 µL de proteínas de citoplasma o 3 µL de proteínas de núcleos más 47 µL de buffer de lisis de núcleos, esto debido al volumen especificado por el manual proporcionado por BlueGene para la realización del ensayo. Como control negativo se incluyó PBS (proporcionado por el kit) y el buffer de lisis empleado para la extracción de las proteínas citoplasmáticas o nucleares, la curva estándar fue de 0, 2.5, 5.0, 10, 25 y 50 ng/mL (anexo 5 y 6). A las muestras problema se añadió 5 µL de solución de balance (para compensar pH), y a todos los pozos, exceptuando los blancos, se añadió 100 µL de

anticuerpo conjugado (Anticuerpo policlonal ligado a HRP, peroxidasa de rábano) y se incubó la placa por 1 hora a 37 °C.

Transcurrido el tiempo se lavó la placa, primero removiendo la mezcla de incubación por aspiración, posteriormente se llenó cada pozo con solución de lavado 1X (PBS proporcionado por el kit), enseguida se retiró el contenido por aspiración, esta técnica se realizó 5 veces en total. Los lavados se usan para remover aquellos anticuerpos que no se enlazaron con su antígeno.

Para revelar la reacción, se añadió 50 µL de sustrato A (sustrato de la enzima HRP) y 50 µL de sustrato B (sustrato que al reaccionar con la enzima HRP cambia de color). La reacción se dejó en incubación de 10-15 minutos a 37 °C. Después de este tiempo se añadió ácido sulfúrico (proporcionado por el kit) para detener la reacción. Posteriormente se determinó la densidad óptica (O.D.) a 450 nm usando un lector de microplacas (Thermo).

### **5.13 Análisis de datos**

Para la comparación entre grupos, se empleó la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un  $\alpha$  de 0.05. Se empleó la prueba de Friedman debido a que los datos no se distribuían de manera normal según el test de Shapiro-Wilk. El test de Shapiro-Wilk es una de las más potentes y sencillas pruebas de normalidad, su única condición es que el tamaño de la muestra sea igual o menor a 50. La prueba de normalidad es necesaria debido a que algunos análisis estadísticos exigen como condición que la población tenga una distribución normal (Segnini, 2005).

La prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, compara las muestras para detectar diferencias significativas entre las poblaciones muestreadas. Su modelo de aleatorización consiste en asignar aleatoriamente los “N” individuos (filas) utilizados en el experimento a los “K” tratamientos (columnas) (Corzo, 2005).

El nivel de significación o  $\alpha$ , es la probabilidad de rechazar una hipótesis nula (contraria a la hipótesis de trabajo) cuando es cierta. Para evitar este tipo de error se establece el límite de la región de rechazo para la hipótesis nula. El valor p, es la medida de probabilidad o significancia de los resultados, o también definido como la probabilidad de que las diferencias entre grupos de un experimento hayan sucedido por casualidad. El rechazar una hipótesis nula, indica que existe una probabilidad menor de  $\alpha$ , es decir, el resultado obtenido no se deba al azar sino al efecto del tratamiento (cuando  $p < \alpha$  0.05 entonces existe una diferencia significativa) (Mueses, 2008).

Los datos de los CT obtenidos de la expresión de mRNA de VDR, LL-37 y CYP27B1 por la técnica de PCR en tiempo real o los datos de la cuantificación de proteínas nucleares y citoplasmáticas obtenidas por el método de ELISA, se compararon con la prueba de Friedman con un  $\alpha$  0.05 y una  $p < 0.05$ . Las concentraciones de glucosa a 15 y 30 mM en las diferentes condiciones de estimulación (con 25(OH)D<sub>3</sub> y/o con *M. tuberculosis*) vs la condición de glucosa a 5.5mM (calibrador) con el paquete estadístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

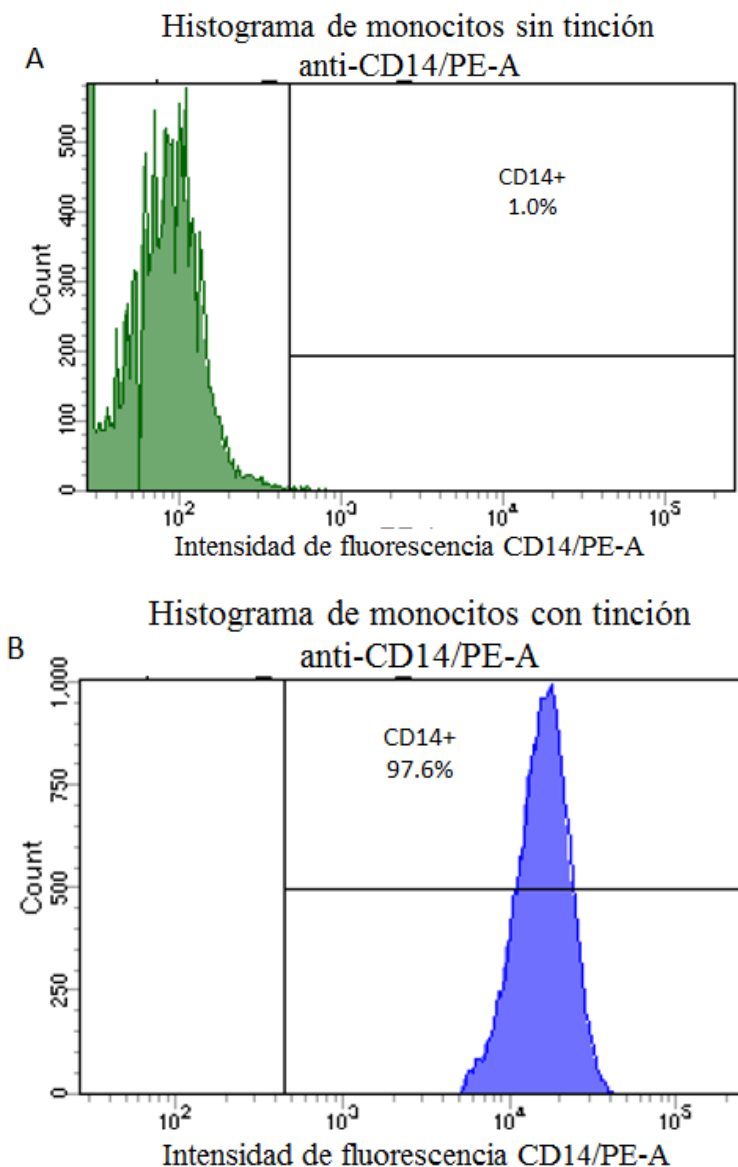
## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Características de las muestras biológicas**

Las muestras biológicas fueron obtenidas a partir de concentrados leucocitarios proporcionados por el Banco de Sangre y Hematología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), de la Secretaría de Salud Pública (SALUD). Los concentrados leucocitarios se obtienen solo de aquellas personas sanas que tengan una edad entre 18 y 65 años y un peso mínimo de 50Kg.

## 6.2 Los monocitos se obtuvieron con una pureza promedio del 99%

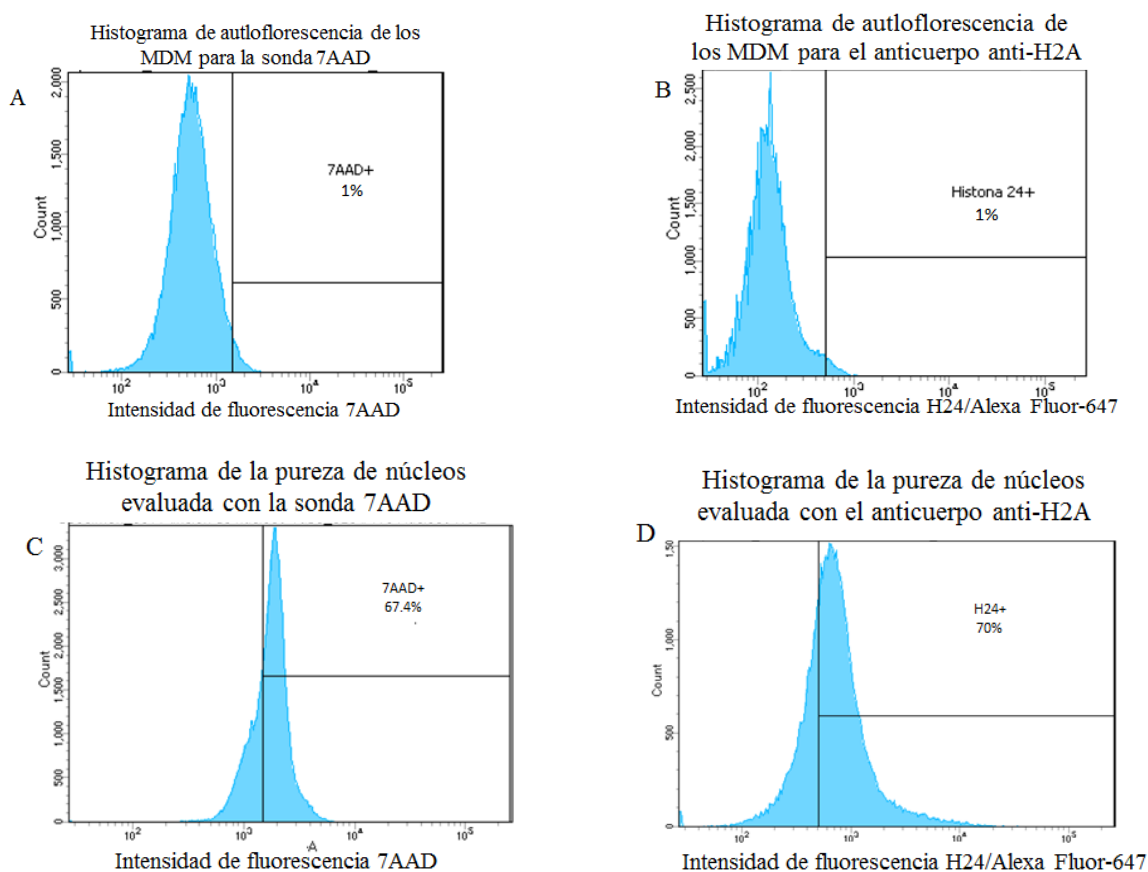
Los monocitos obtenidos con la técnica de Miltenyi utilizando anticuerpos contra la molécula de superficie CD14 tuvieron una pureza promedio del 99% (DS = 0.99), se muestran en la figura 7 (n = 7)



**Figura 7. Pureza de monocitos.** El histograma superior (A) muestra las células sin anticuerpo, y que se empleó para definir la intensidad de fluorescencia para las células CD14+. (B) Porcentaje de células positivas a CD14-PE (97.6%).

### 6.3 Los núcleos se obtuvieron con una pureza promedio del 70%

Los núcleos obtenidos después de la lisis de membrana de los MDM tuvieron una pureza del 70% (DS = 22.33) con el anticuerpo anti-H2A.X y 55% (DS = 31.51) con la sonda 7-AAD de núcleos (figura 8) (n = 6).

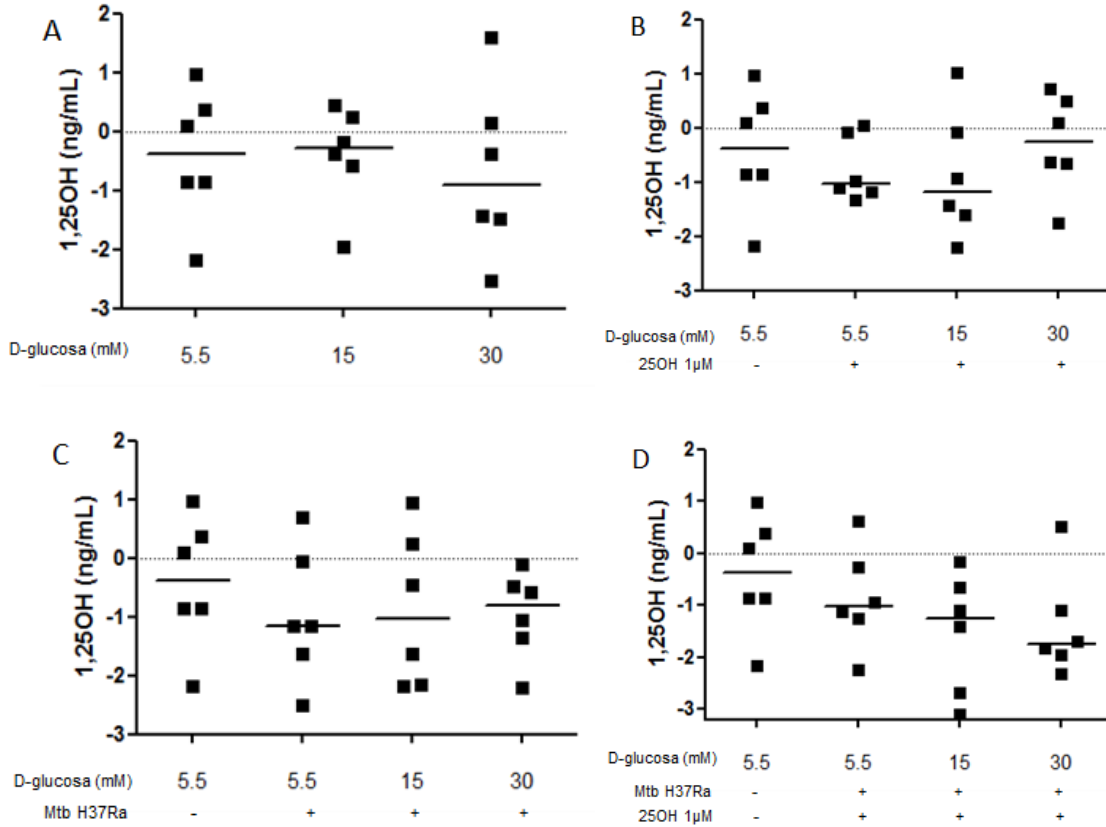


**Figura 8. Pureza de núcleos.** Los histogramas superiores muestran las células sin anticuerpo, este histograma ayuda a definir los eventos positivos a la sonda 7AAD (A) y al anticuerpo anti-H2A.X (B). Los histogramas inferiores exhiben el porcentaje de células positivas a 7AAD (C) y el anticuerpo anti-H2A.X (D), que corresponden a los núcleos.

#### **6.4 La forma activa de la vitamina D se produce en bajas concentraciones y no se afecta su concentración por la hiperglucemia, la infección con *M. tuberculosis* o la estimulación con 25(OH)D<sub>3</sub>**

Para que el precursor de la vitamina D sea transformado a la forma activa requiere de la enzima CYP27B1, esta enzima tiene una mayor expresión después del reconocimiento de *M. tuberculosis* y aumenta la producción (al estar disponible el precursor) de la forma activa de la vitamina D (Rode *et al.*, 2017).

En este trabajo experimental se usó el método de ELISA para el análisis de la concentración de la forma activa de la vitamina D en extractos citoplasmáticos. No se observaron incrementos o decrementos en la producción de la forma activa de la vitamina D por parte de los MDM en las concentraciones de 15 y 30 mM comparadas con 5.5 mM de glucosa (figura 9A). Tampoco se observó un cambio en la concentración de la forma activa tras ser estimuladas las células con el precursor de la vitamina D (figura 9B), infectadas con *M. tuberculosis* (figura 9C) o al recibir ambos estímulos a la vez (figura 9D).



**Figura 9. Concentración de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en extractos de proteínas citoplasmáticas.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa (A); a las 24 horas, un grupo de células fueron estimuladas con 25(OH)D<sub>3</sub> 1 μM (B), otro grupo de células fueron infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra y un tercer grupo fue estimulado con 25(OH)D<sub>3</sub> 1 μM e infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra. Tras haber transcurrido un total de 48 horas con las diferentes concentraciones de glucosa se evaluó la concentración de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por el método de ELISA de los extractos proteínicos nucleares. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.2522$  (B)  $p = 0.4307$ , (C)  $p = 0.7887$  y (D)  $p = 0.4307$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

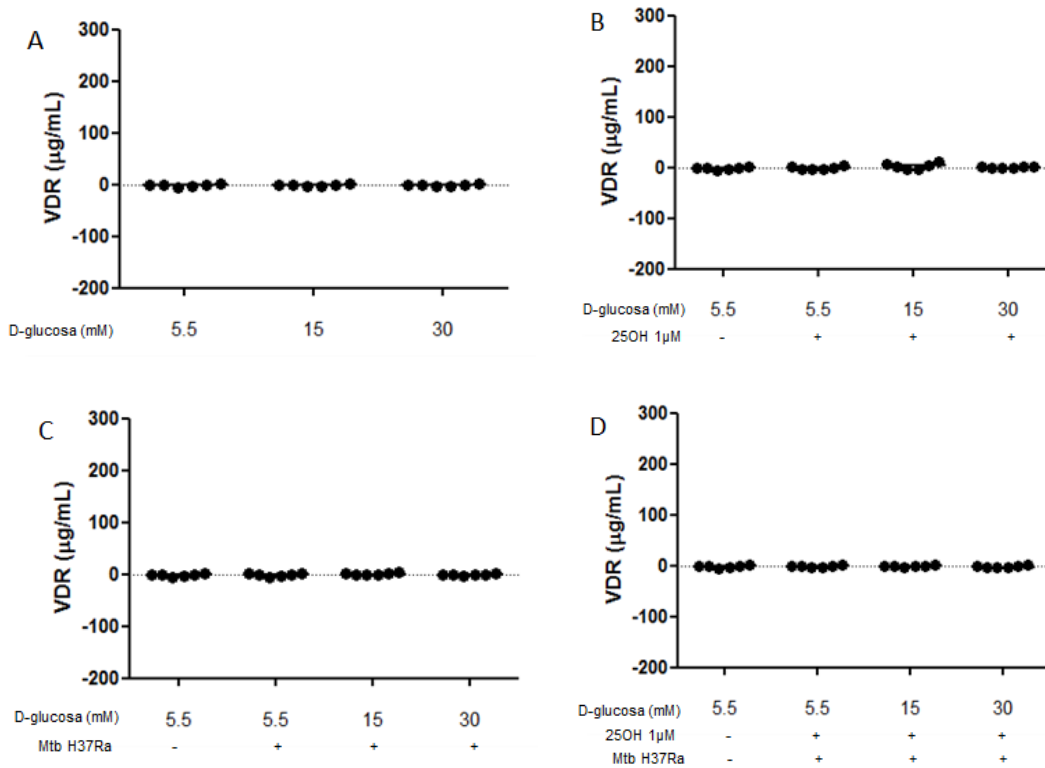
### **6.5 Las concentraciones del VDR en núcleo no se modifican con la hiperglucemia, la infección con *M. tuberculosis* o la estimulación con 25(OH)D<sub>3</sub>**

La inducción del VDR se lleva a cabo tras la activación de los TLR2/1 por el reconocimiento de patógenos entre los que se encuentra *M. tuberculosis* y es importante debido a que es la proteína encargada del transporte de la vitamina D del citoplasma al núcleo, y de esta manera la vitamina D puede ejercer sus efectos nucleares. (Güerri Fernández *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016).

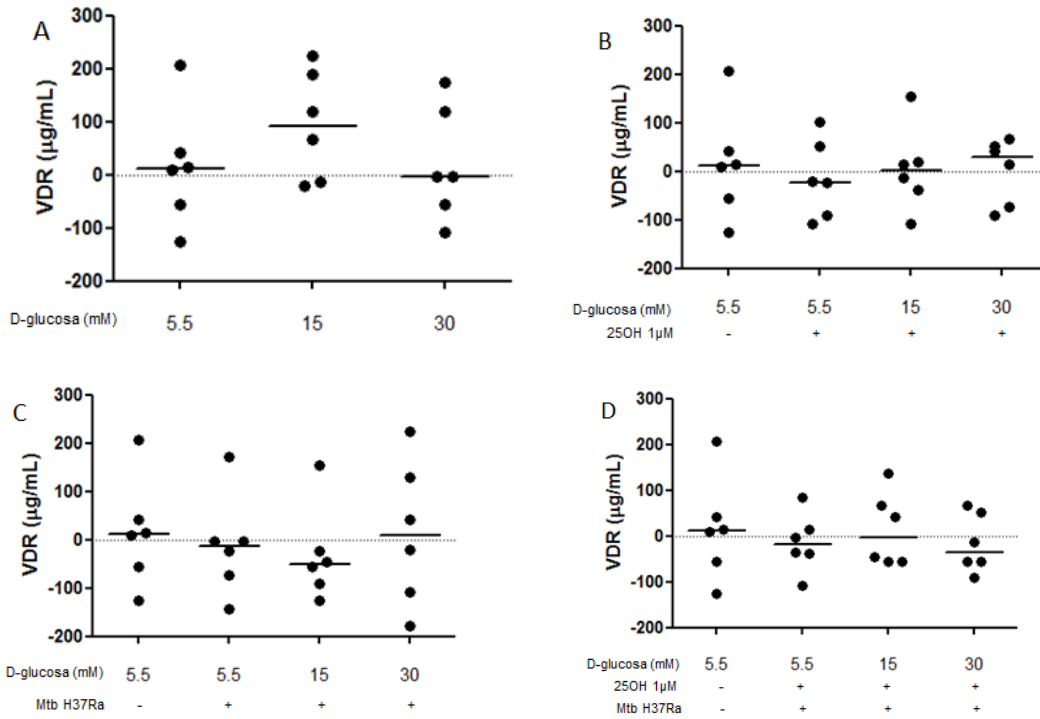
En el presente estudio se evaluó las concentraciones de VDR de los extractos citoplasmáticos por el método de ELISA. Sin embargo, las concentraciones evaluadas fueron mínimas o nulas por lo que no fue posible determinar los efectos de la hiperglucemia (figura 10A), la estimulación con el precursor de la vitamina D (figura 10B), la infección con *M. tuberculosis* (figura 10C) o con el precursor más la infección con *M. tuberculosis* (figura 10D) en las concentraciones de VDR a nivel citoplasmático.

De la misma manera se evaluó la concentración de VDR en el núcleo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas bajo las condiciones antes mencionadas (figura 11 A-D).





**Figura 10. Concentración de VDR en extractos de proteínas citoplasmáticas.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30mM de glucosa (A); a las 24 horas, un grupo de células fueron estimuladas con 25(OH) $D_3$  1µM (B), otro grupo de células fueron infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra y un tercer grupo fue estimulado con 25(OH) $D_3$  1µM e infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra. Después de un total de 48 horas con las diferentes concentraciones de glucosa se evaluó la concentración VDR y por el método de ELISA de los extractos proteínicos citoplasmáticos. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Friedman (A)  $p = 0.7402$  (B)  $p = 0.1633$ , (C)  $p = 0.1081$  y (D)  $p = 0.6679$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

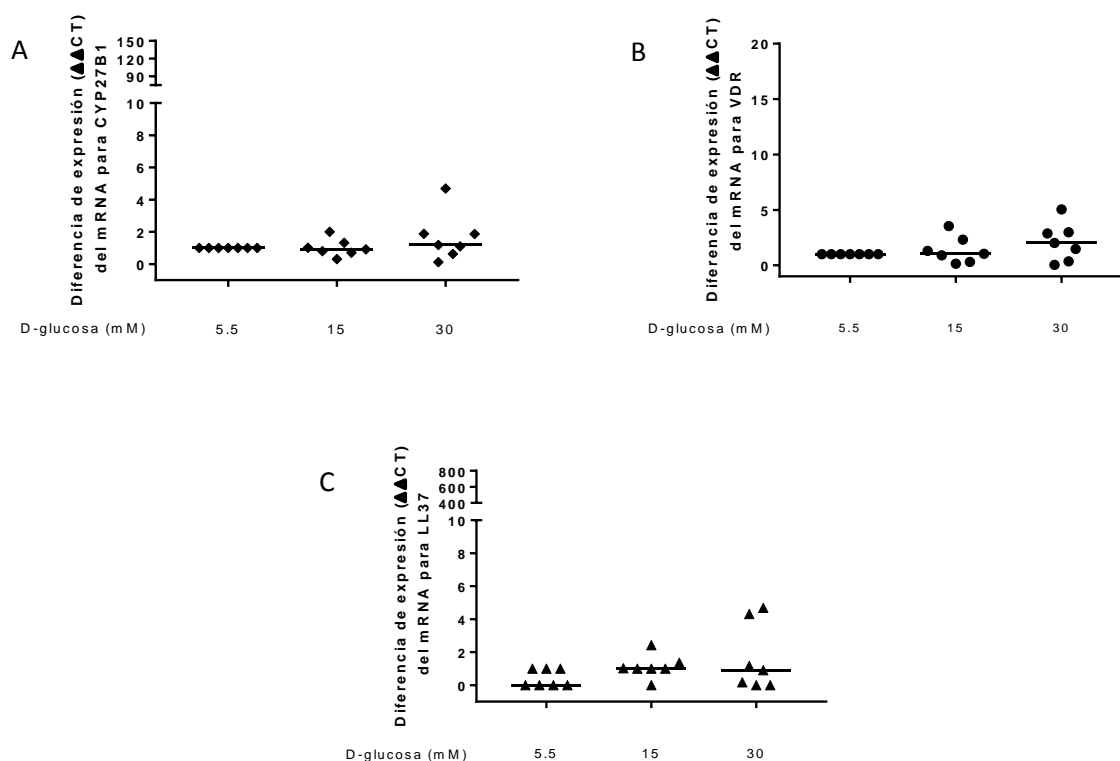


**Figura 11. Concentración de VDR en extractos de proteínas nucleares.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa (A); a las 24 horas, un grupo de células fueron estimuladas con 25(OH)D<sub>3</sub> 1 µM (B), otro grupo de células fueron infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra y un tercer grupo fue estimulado con 25(OH)D<sub>3</sub> 1 µM e infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra. Tras haber transcurrido un total de 48 horas con las diferentes concentraciones de glucosa se evaluó la concentración VDR por el método de ELISA de los extractos proteínicos nucleares. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.9563$  (B)  $p = 0.1633$ , (C)  $p = 0.8438$  y (D)  $p = 0.4307$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

## 6.6 La hiperglucemia in vitro no modifica la expresión de CYP27B1, VDR y LL37 en MDM

Debido a que no se logró detectar la conversión del precursor a la forma activa de la vitamina D, se evaluaron genes requeridos para la conversión como el VDR y la CYP27B1 y el gen de respuesta inducido por la forma activa de la vitamina D, el péptido LL-37, por la técnica de PCR en tiempo real.

Se observó que concentraciones de glucosa de 15 y 30 mM no modifica la expresión de la enzima CYP27B1 (figura 12A), del VDR (figura 12B) o del péptido LL-37 (figura 12C).

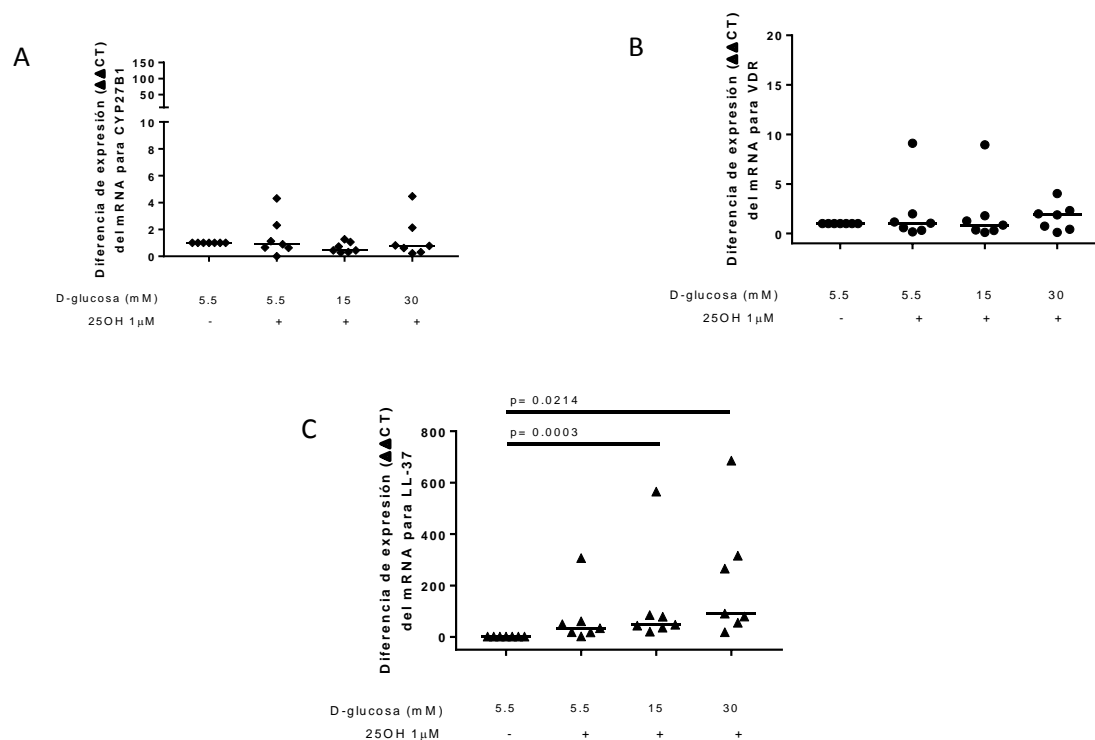


**Figura 12. Efecto de las altas concentraciones de glucosa en la expresión del mRNA del LL-37, CYP27B1 y VDR en MDM.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa, se evaluó la expresión de los genes de LL-37 (A), VDR (B) y CYP27B1 (C); después de 48 horas de incubación. Para evaluar la diferencia de expresión (eje y) se utilizó el método de RT-qPCR y el análisis  $\Delta\Delta CT$  tomando como gen de referencia 18S-rRNA y como calibrador la condición 5.5mM de glucosa. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.2014$ , (B)  $p = 0.7682$  y (C)  $p = 0.6197$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

## 6.7 La estimulación con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> aumenta la expresión de LL-37

Aunque existe un reporte de que el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> no tiene un efecto en la expresión del gen CYP27B1, del VDR o de LL-37 (Liu P. *et al.* 2006), evaluamos si en altas concentraciones de glucosa se modificaba la expresión de esos genes.

Los resultados del PCR en tiempo real muestran que el precursor de la vitamina D no modifica la expresión de la enzima CYP27B1 (figura 13A) o del VDR (figura 13B). Por otra parte, dicho precursor de la vitamina D induce la expresión del LL-37 (figura 13C) en células cultivadas en presencia de 15 mM ( $p = 0.0003$ ) y en 30 mM ( $p = 0.0214$ ) de glucosa, en comparación con las células sin estímulo y cultivadas con 5.5 mM de glucosa.

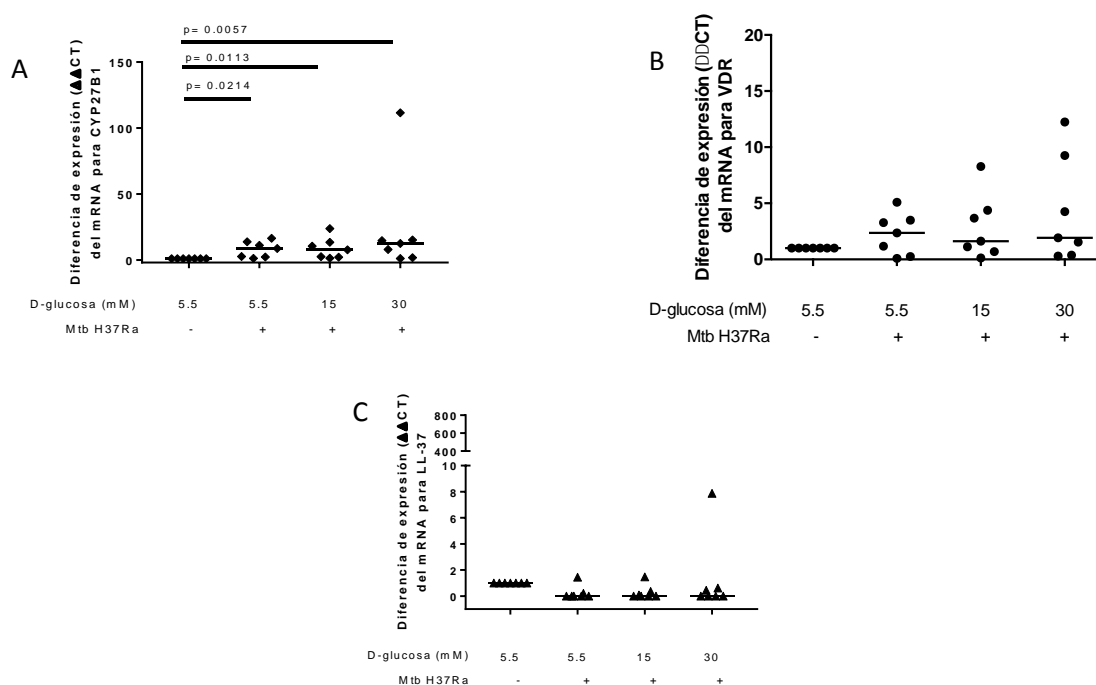


**Figura 13. Efecto de la estimulación con 25(OH)D<sub>3</sub> 1 μM en la expresión del mRNA del LL-37, CYP27B1 y VDR y altas concentraciones de glucosa en MDM.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa; después de 24 horas se adicionó 25(OH)D<sub>3</sub> 1 μM tras haber transcurrido 24 horas más se evaluó la expresión de los genes de CYP27B1 (A), VDR (B) y LL-37 (C). Para evaluar la diferencia de expresión (eje y) se utilizó el método de RT-qPCR y el análisis  $\Delta\Delta\text{CT}$  tomando como gen de referencia 18S-rRNA y como calibrador la condición 5.5 mM de glucosa sin 25(OH)D<sub>3</sub>. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.6529$ , (B)  $p = 0.4779$  y (C)  $p = 0.0010$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

## 6.8 *Mycobacterium tuberculosis* induce la expresión de la enzima CYP27B1

Se reportó un aumento significativo en la expresión del VDR de pacientes con tuberculosis en comparación con donadores sanos, mientras que se observó una disminución del VDR en pacientes con DM2 con respecto a los individuos sanos. (Lopez-Lopez *et al.*, 2014).

En nuestro trabajo encontramos que *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra no induce la expresión del VDR (figura 14B) o del péptido LL-37 (figura 14C) en MDMs de individuos sanos. Pero, la infección con *M. tuberculosis* incrementa significativamente la expresión de CYP27B1 (figura 14A) en MDM cultivados en presencia de 5.5 mM ( $p = 0.0214$ ), 15mM ( $p = 0.0113$ ) o 30mM de glucosa ( $p = 0.0057$ ) con respecto a aquellos cultivados en presencia de 5.5 mM de glucosa sin infección.



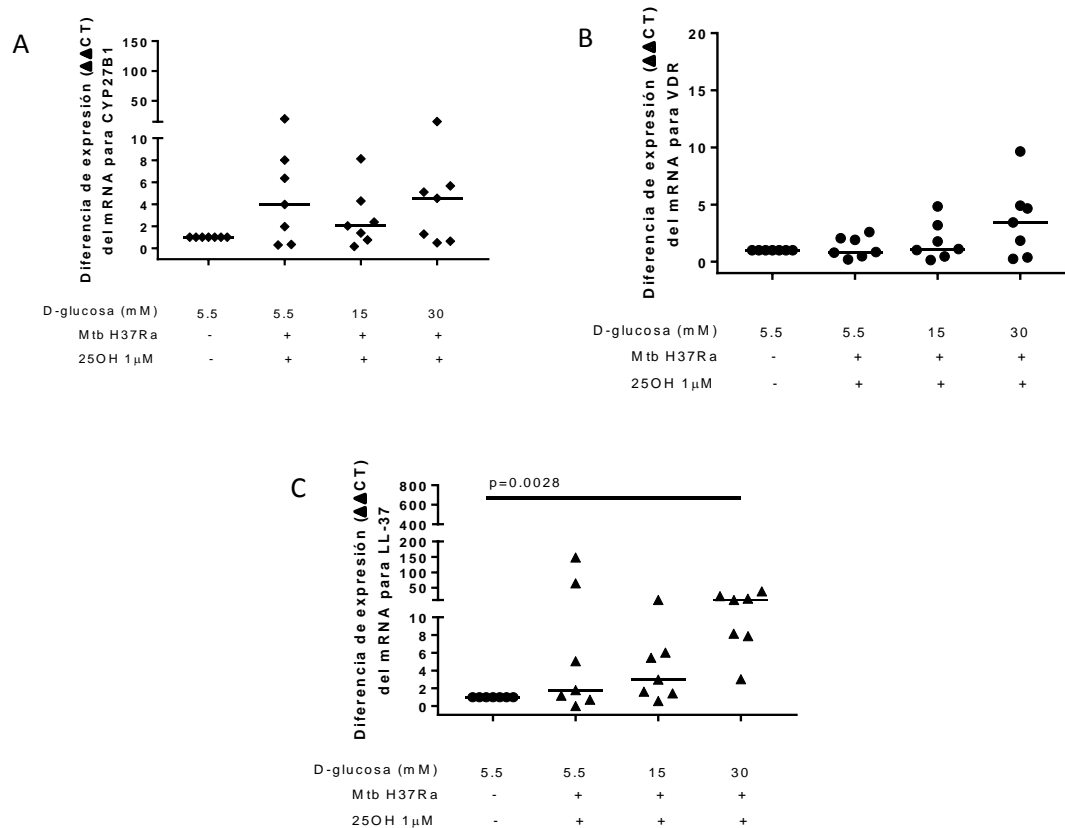
**Figura 14. Efecto de la infección con *M. tuberculosis* a una MOI en la expresión del mRNA de CYP27B1, VDR y LL-37, y altas concentraciones de glucosa en MDM.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa; después de 24 horas se infectaron las células con *Mycobacterium tuberculosis* a una MOI de 1, tras haber transcurrido 24 horas más se evaluó la expresión de los genes de CYP27B1 (A), VDR (B) y LL37 (C). Para evaluar la diferencia de expresión (eje y) se utilizó el método de RT-qPCR y el análisis  $\Delta\Delta CT$  tomando como gen de referencia 18S-rRNA y como calibrador la condición 5.5 mM de glucosa sin infección. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.0052$ , (B)  $p = 0.2085$  y (C)  $p = 0.0409$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

### **6.9 El precursor de la vitamina D (25OH) y la infección con *Mycobacterium tuberculosis* induce la expresión de LL-37 en 30mM de glucosa**

La vitamina D participa en la defensa del huésped mediante una vía autocrina en monocitos y MDM humanos después de la estimulación vía TLR2, como sucede con *Mycobacterium tuberculosis*. Estos receptores inician una cascada de señalización que induce la expresión de la enzima CYP27B1, lo que resulta en la conversión de 25(OH)D<sub>3</sub> a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Posteriormente, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> desencadena la activación VDR y la posterior inducción de péptidos antimicrobianos tales como catelicidina (LL-37) que resulta en la destrucción intracelular de los patógenos como *M. tuberculosis* (Resino, 2017).

En este proyecto no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes de CYP27B1 (figura 15A) o del VDR (figura 15B) cuando los MDM se estimulan con 25(OH)D<sub>3</sub> 1μM y se infectan con la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra en concentraciones de glucosa, 5.5, 15 y 30 mM.

Sin embargo, se encontró un incremento significativo en la expresión de LL-37 (figura 15C) en los MDM infectados con *M. tuberculosis* H37Ra en presencia del precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> y 30 mM glucosa (p = 0.0028).



**Figura 15. Efecto de la infección con *M. tuberculosis* y la estimulación con 25(OH)D<sub>3</sub> 1 $\mu$ M en la expresión del mRNA de CYP27B1, VDR y LL-37 y altas concentraciones de glucosa en MDM.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa; después de 24 horas se adicionó 25(OH)D<sub>3</sub> 1 $\mu$ M e infectaron las células con *Mycobacterium tuberculosis* a una MOI de 1, tras haber transcurrido 24 horas más se evaluó la expresión de los genes de LL-37 (A), VDR (B) y CYP27B1 (C). Para evaluar la diferencia de expresión (eje y) se utilizó el método de RT-qPCR y el análisis  $\Delta\Delta\text{CT}$  tomando como gen de referencia 18S-rRNA y como calibrador la condición 5.5mM de glucosa sin infección. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos y fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.3189$ , (B)  $p = 0.3189$  y (C)  $p = 0.0106$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.

## 7. DISCUSIÓN

El descubrimiento del receptor de vitamina D (VDR) en células del sistema inmune sugirió la participación de la vitamina D en la función inmunitaria. El gen del péptido LL-37 tiene sitios de unión específicos para VDR; por lo tanto, la vitamina D induce la expresión de LL-37 (Liu *et al.*, 2016). Sin embargo, la suplementación de manera exógena se da con el precursor de la vitamina D y no con la forma activa de la vitamina D ya que ésta es poco estable. Aunque existen ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la administración de la vitamina D, aún se desconoce su utilidad en pacientes que presentan comorbilidades como la diabetes mellitus tipo 2 y tuberculosis (Quirós, Sanz, & Adrados, 2009).

Se ha reportado que los pacientes con DM2 son hasta 8 veces más susceptibles a una infección de *M. tuberculosis* que las personas sanas (Kumar Nathella & Babu, 2017). Debido a que observamos que la estimulación con *M. tuberculosis* H37Ra induce la expresión del mRNA de la enzima CYP27B1 en los MDM con altas concentraciones de glucosa 15 y 30 mM (figura 14A), sugiere que la inhibición a través de la CYP27B1 no es una vía que afecte el metabolismo de la vitamina D en los pacientes con DM2. Esos datos concuerdan con estudios previos en los que se ha reportado que los pacientes con TB tiene una mayor expresión del mRNA de la enzima CYP27B1 en MDM (Lopez-Lopez *et al.*, 2014). Por otro lado, el grupo de Rode, demostró que *M. tuberculosis* atenuadas por calor (HKMT) induce la expresión del mRNA de la enzima CYP27B1 en células dendríticas (Rode *et al.*, 2017).

Posteriormente, evaluamos si el receptor de la vitamina D se encontraba afectado por efecto de las altas concentraciones de glucosa, observando que las concentraciones de VDR en proteínas extraídas del citoplasma o núcleos de MDM (figura 8A y 9A) fueron mínimas o nulas por lo que no se pudo determinar el efecto de las distintas condiciones. Aunque no evaluamos la funcionalidad del receptor se observa una mayor expresión del mRNA del VDR en una concentración de glucosa 30 mM, aunque sin diferencias significativas (figura 12B). De acuerdo con lo reportado por Hernández Sánchez *et al.*, a altas concentraciones de glucosa el receptor se encuentra glucosilado. Es posible, por tanto, que en nuestro



estudio el VDR se encuentre glucosilado (Hernández-Sánchez *et al.*, 2017; Orlov *et al.*, 2012).

Por último, evaluamos la conversión del precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> *in vivo* en MDM e infectados con *M. tuberculosis* en altas concentraciones de glucosa (figura 9). Debido a la baja conversión del precursor de la vitamina D observada en los extractos de proteínas del citoplasma y del núcleo de los MDM utilizamos como molécula de lectura al gen blanco de la forma activa de la vitamina D activa, el péptido antimicrobiano catelicidina o LL-37.

Encontramos que la glucosa *per se* no induce el mRNA de LL-37 (figura 12C), pero la estimulación con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> en concentraciones de glucosa a 15 y 30 mM induce su expresión (figura 13C). Este es un dato relevante ya que sugiere que la enzima CYP27B1 está presente en el citoplasma celular. En una población diferente como son las células dendríticas ya se había reportado que el precursor de la vitamina D (25(OH)D<sub>3</sub>) a 100 nM induce la expresión de LL-37 (Rode *et al.*, 2017), nosotros solo detectamos la inducción del péptido cuando se cultivó a los MDM en concentraciones altas de glucosa (15 y 30 mM). Sin embargo, los cultivos de las células dendríticas los realizaron en medio comercial RPMI 1640 el cual contiene 2 g/L de glucosa equivalente a 11 mM, siendo condiciones de glucosa alta, por lo que si concuerdan con nuestros datos.

Por otro lado, observamos que la infección con *M. tuberculosis* no induce la expresión de LL-37 (figura 14C), contrario a lo reportado por Montoya, en donde encontraron que en líneas celulares U937 (ATCC) diferenciados a macrófagos e infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* se induce la expresión del péptido LL-37 (Montoya-Rosals *et al.*, 2016). No obstante, observamos que si se estimulan los MDM con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> y la infección con alta glucosa (30 mM) se induce significativamente la expresión de LL-37 (figura 15C), lo que sugiere el papel de la hiperglucemia en la activación e inducción de genes de la respuesta inmune que pueden estar asociados a la ruta de señalización de la vitamina D (Shanmugam *et al.*, 2003). Aunque los datos son contrarios a la hipótesis que planteamos, de que las altas concentraciones de glucosa afectan el

metabolismo de la vitamina D y en consecuencia la producción de péptidos antimicrobianos para el control intracelular de *M. tuberculosis*. Nosotros sugerimos que, tal vez otros genes se estén activando y que inducen al péptido LL-37 por una ruta diferente a la de la vitamina D, aunque también se debe considerar que estamos utilizando concentraciones muy altas del precursor de la vitamina D (1 $\mu$ M) por lo que, más estudios se requieren para demostrar que el control intracelular de *M. tuberculosis* se ve afectado.

La limitación más importante en este trabajo fue que no pudimos detectar en todos los sujetos la conversión del precursor de la vitamina D a su forma activa, posiblemente por la cinética de conversión. Puesto que observamos el efecto de la forma activa, es posible que ya se hubiese trasladado al núcleo el precursor de la vitamina D para ejercer sus efectos genómicos. No obstante, los datos encontrados sirven como base para futuras investigaciones en donde se puedan dilucidar los efectos de la hiperglucemia en el control intracelular de *M. tuberculosis*.

## **8. CONCLUSIONES**

Contrariamente a lo que se esperaba, la estimulación con el precursor de la vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> en altas concentraciones de glucosa (30 mM) inducen la expresión del mRNA LL-37 en MDM infectados con *M. tuberculosis*. Los datos obtenidos no demuestran que la inducción de LL-37 por la vía de la vitamina D es un mecanismo de susceptibilidad a la TB y aporta información que sugiere el potencial de uso del precursor de la vitamina D en el tratamiento de pacientes con DM2 y TB.

## 8. REFERENCIAS

- Álvarez Herrera, T., & Placeres Hernández, J. F. (2016). Tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus . Presentación de dos casos Pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus . Presentation of two cases. *Rev Méd Electrón*, 38(3), 417–423.
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., Del Rosario Sainz Espuñes, T., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42–55.
- Bikle, D. (2010). Reconsideration, VITAMIN D: Newly Discovered Actions Require Requirements, of Physiologic. *Trends Endocrinology Metabolism*, 21(6), 375–384. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2880203/>
- Calderón, R. V. (2007). B08 - Inmunoquímica. *Instituto de Biotecnología UNAM*, 54.
- Chaudhary, S., Thukral, A., Tiwari, S., Pratyush, D. D., & Singh, S. K. (2013). Vitamin D status of patients with type 2 diabetes and sputum positive pulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 17(Suppl 3), S670-3. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.123564>
- Chun, R. F., Peercy, B. E., Orwoll, E. S., Nielson, C. M., Adams, J. S., & Hewison, M. (2014). Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144(PART A), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.012>
- Cortazar, A., & Silva, E. P. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología: PCR. *PCR En Tiempo Real*, 40. <https://doi.org/10.1021/ac00212a004>
- Corzo, J. (2005). Arreglos de dos vías y prueba de Friedman. In *Notas de clase. Estadística no paramétrica (Métodos basados en rangos)* (1era ed., pp. 74–77). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Cultek. (2006). Fundamentos y Tipos de ELISAs., 1.
- Devlin, T. (2004). *Texto, Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (4a ed.). Buenos Aires: Reverté. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA3&hl=es&source=gb\\_s\\_toc\\_r&cad=3#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA3&hl=es&source=gb_s_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false)
- Serrano-Ríos, M & Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes. (2002). Resistencia a la insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes tipo 2. *Med Clín*, 119(12), 458–463. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)73455-6](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(02)73455-6)
- Enith, K., Blanco, J., & Maya, G. C. (2011). Vitamina D: nuevos paradigmas. *Medicina & Laboratorio*, 17(5–6), 211–246.
- Escobar, F., & Tébar, F. (2009). *La diabetes mellitus en la práctica clínica*. Madrid:

Editorial médica panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=m8dcQYBF3UQC&pg=PA73&dq=diabetes+tipo+1&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiO3OSg6ZLYAhWa3oMKHfjnD9UQ6AEIQjAF#v=onepage&q=diabetes+tipo+1&f=false>

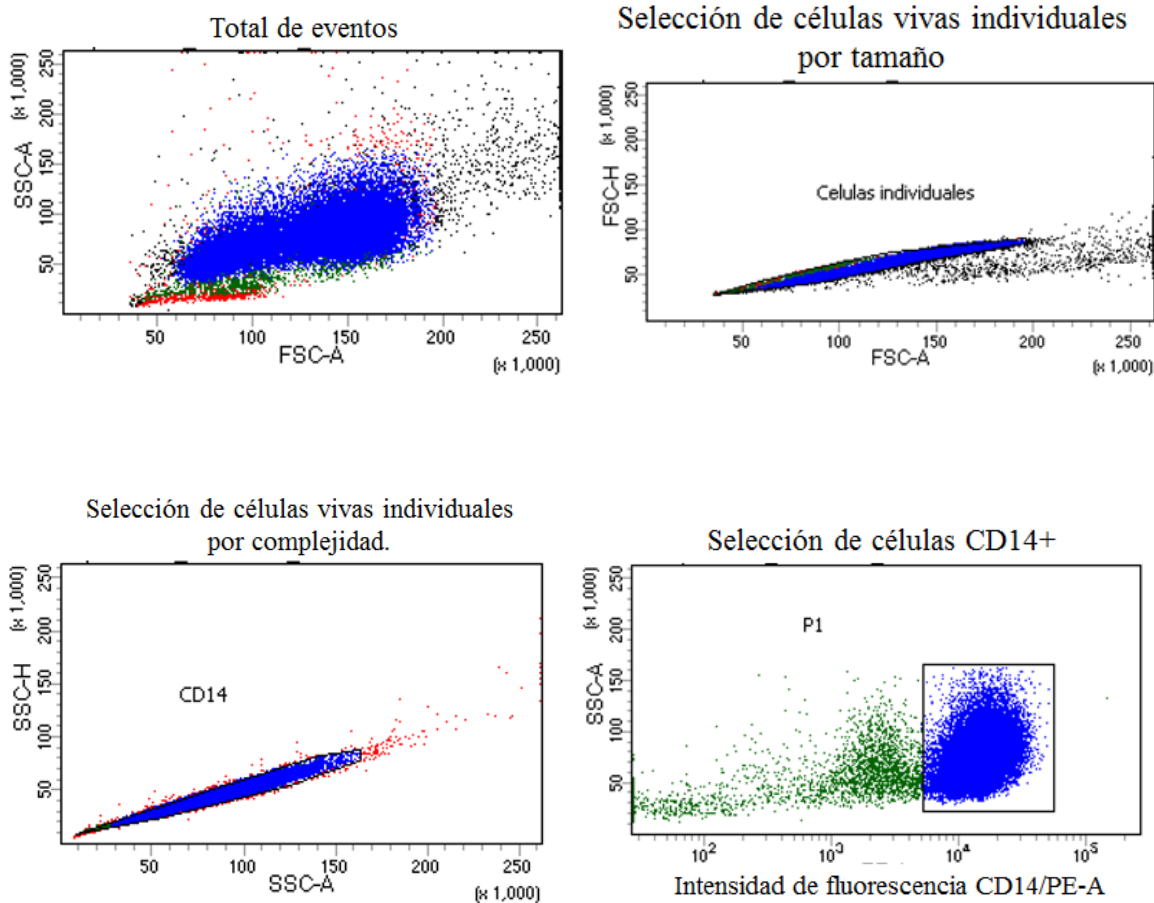
- Flores, M., & Lozada, A. (2011). Concentraciones séricas de vitamina D en niños , adolescentes y adultos mexicanos. Resultados de la ENSANUT 2006. *Instituto Nacional de Salud Pública*, (1), 1–29.
- González-Padilla, E., Soria López, A., González-Rodríguez, E., García-Santana, S., Mirallave-Pescador, A., Groba Marco, M. del V., ... Sosa Henríquez, M. (2011). Elevada prevalencia de hipovitaminosis D en los estudiantes de medicina de Gran Canaria, Islas Canarias (España). *Endocrinología Y Nutrición*, 58(6), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.03.002>
- González, A., & Alexanderson, E. (1999). Consenso mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol*, 10(1), 18. Retrieved from <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=10363>
- Güerri Fernández, R. C., Díez Pérez, A., Mellibovsky Saidler, L., & Quesada Gómez, J. M. (2009). La vitamina D como elemento inmunitario en las infecciones. *Medicina Clínica*, 133(9), 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2008.10.044>
- Heaney, R., & Holick, M. (2011). Why the IOM Recommendations for Vitamin D Are Deficient. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(3), 455–457. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.328/epdf>
- Hernández-Sánchez, F., Guzmán-Beltrán, S., Herrera, M. T., Gonzalez, Y., Salgado, M., Fabian, G., & Torres, M. (2017). High glucose induces O-GlcNAc glycosylation of the vitamin D receptor (VDR) in THP1 cells and in human macrophages derived from monocytes. *Cell Biology International*, 41(9), 1065–1074. <https://doi.org/10.1002/cbin.10827>
- Hong, J. Y., Kim, S. Y., Chung, K. S., Kim, E. Y., Jung, J. Y., Park, M. S., ... Kang, Y. A. (2014). Association between vitamin D deficiency and tuberculosis in a Korean population. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 18(1), 73–78. <https://doi.org/10.5588/ijtld.13.0536>
- Institute of research in immunology and cancer. University of Montreal. (n.d.). Information on qPCR results, 1–3.
- Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Józwick, A., Horbańczuk, J., ... Bagnicka, E. (2012). Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular Biology Reports*, 39(12), 10957–10970. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1997-x>
- Kumar Nathella, P., & Babu, S. (2017). Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis. *Immunology*, 152(1), 13–24. <https://doi.org/10.1111/imm.12762>

- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., ... Modlin, R. L. (2016). Toll-like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response Linked references are available on JSTOR for this article: Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response, (May), 22–26.
- Lopez-Lopez, N., Gonzalez-Curiel, I., Castañeda-Delgado, J., Montoya-Rosales, A., Gandara-Jasso, B., Enciso-Moreno, J. A., & Rivas-Santiago, B. (2014). Vitamin D supplementation promotes macrophages' anti-mycobacterial activity in type 2 diabetes mellitus patients with low vitamin D receptor expression. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 16(9), 755–61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.010>
- Marazuela, M. (2005). Déficit de vitamina D en el adulto: clínica, diagnóstico y tratamiento. *Endocrinología Y Nutrición*, 52(5), 215–223. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(05\)71018-4](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(05)71018-4)
- Maskin, M. (2009). La vitamina D, el sistema inmune y las enfermedades de la piel. *Educación Médica Continua*, 401–409.
- Mendoza, W. E. (2010). Universidad Autónoma De Chihuahua Facultad De Ciencias Químicas. *Avanzada, Bioquímica Biotecnología, Maestría*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.002>
- Montoya-Rosales, A., Castro-García, P., Torres-Juarez, F., Enciso-Moreno, J. A., & Rivas-Santiago, B. (2016). Glucose levels affect LL-37 expression in monocyte-derived macrophages altering the Mycobacterium tuberculosis intracellular growth control. *Microbial Pathogenesis*, 97, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.002>
- Mueses, H. F. (2008). Diferencias entre el Nivel de Significancia alfa y el Valor P Differences between alfa significance level and P value. *Revista Estomatología*, 16(1), 30–32.
- Nnoaham, K. E., & Clarke, A. (2008). Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 37(1), 113–119. <https://doi.org/10.1093/ije/dym247>
- Olmos-Ortiz, A., Avila, E., Durand-Carbajal, M., & Díaz, L. (2015). *Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: Focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. Nutrients* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3390/nu7010443>
- Orlov, I., Rochel, N., Moras, D., & Klaholz, B. P. (2012). Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO Journal*, 31(2), 291–300. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.445>
- Quirós, A. B., Sanz, E. A., & Agrados, J. A. G. (2009). Luz solar , vitamina D y tuberculosis. *Bol Pediatr*, 49(209), 220–226.
- Resino, S. (2017). Vitamina D e inmunidad : influencia sobre la infección VIH, (4), 1–8.
- Reyes Olivares, J. A., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones

- de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 9–18. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb081c.pdf>
- Rode, A. K. O., Kongsbak, M., Hansen, M. M., Lopez, D. V., Levring, T. B., Woetmann, A., ... Geisler, C. (2017). Vitamin D counteracts Mycobacterium tuberculosis-induced cathelicidin downregulation in dendritic cells and allows Th1 differentiation and IFN $\gamma$  secretion. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00656>
- Rosas-Peralta, M., Holick, M. F., Borrayo-Sánchez, G., Madrid-Miller, A., Ramírez-Árias, E., & Arizmendi-Urbe, E. (2017). Efectos inmunometabólicos disfuncionales de la deficiencia de vitamina D y aumento de riesgo cardiometabólico. ¿Potencial alerta epidemiológica en América? *Endocrinología, Diabetes Y Nutrición*, 64(3), 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2016.11.009>
- Salgado, M. (2002). Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). *Ibt.Unam.Mx*. Retrieved from <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf>
- Salud, O. M. de la. (2017a). Diabetes. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- Salud, O. M. de la. (2017b). Tuberculosis. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- Segnini, S. (2005). Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. *Fundamentos de Bioestadística*, 1–8.
- Shanmugam, N., Reddy, M. A., Guha, M., & Natarajan, R. (2003). High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes*, 52(5), 1256–1264. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.5.1256>
- Suárez, V. M., Delvallepérez, L. O., Domínguez, G. D., & Abraham, C. M. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 31(3), 242–253.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Tuberculosis, M. C. D. E., Mellitus, D., Piloto, P., La, P., Del, P., Oms, M., ... Care, D. (2009). Young F , Critchley JA , Johnstone LK , Unwin NC . A review of comorbidity between infectious and chronic disease in Sub Saharan Africa : TB and Diabetes Mellitus , HIV and Metabolic Syndrome , and impact of globalization . *Globalization and Health* 2009 , (Dm), 1–4.
- Valero Zanuy, M. Á., & Hawkins Carranza, F. (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 16(4), 63–70. [https://doi.org/10.1016/S1132-8460\(07\)73506-7](https://doi.org/10.1016/S1132-8460(07)73506-7)

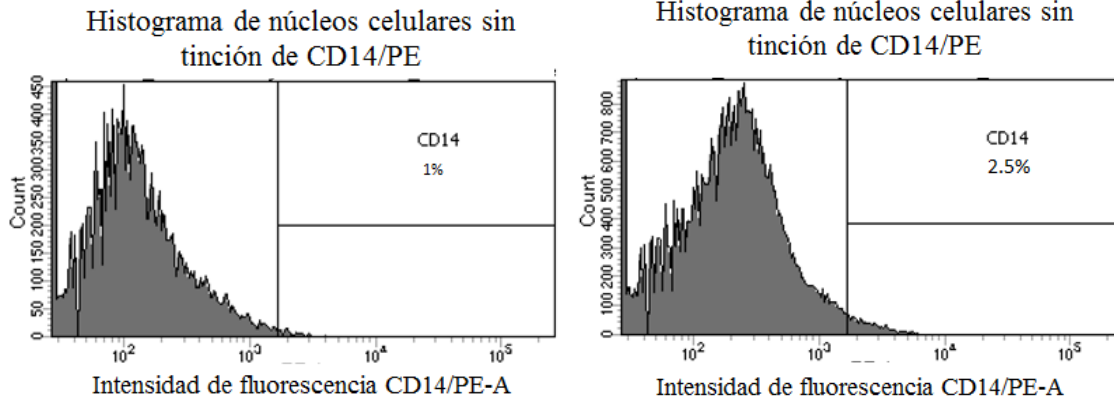
- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2009). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular* (2a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=FXDiqLK6GmAC&pg=PR3&dq=Fundamentos+de+bioquímica:+la+vida+a+nivel+molecular&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiPi\\_DG9ZHYAhWYyIMKHRLpAnMQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Fundamentos de bioquímica%3A la vida a nivel molecular&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=FXDiqLK6GmAC&pg=PR3&dq=Fundamentos+de+bioquímica:+la+vida+a+nivel+molecular&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiPi_DG9ZHYAhWYyIMKHRLpAnMQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Fundamentos+de+bioquímica%3A+la+vida+a+nivel+molecular&f=false)
- Wang, G. (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32637–32643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805533200>
- White, P., & Cooke, N. (2000). The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(8), 320–327. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00317-9](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00317-9)

## 9. ANEXOS

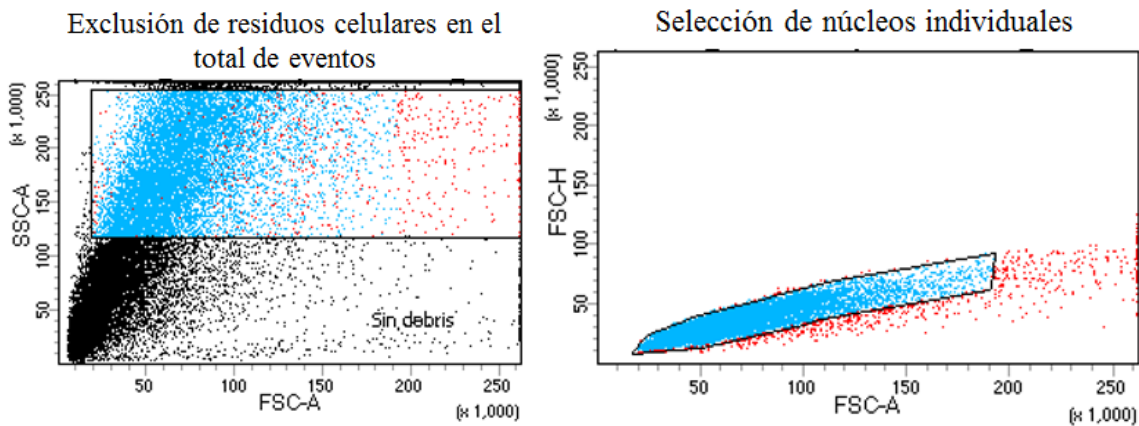


**Anexo 1. Procedimiento para el análisis de pureza de monocitos CD14+.** En el Scatter plot A se muestra el total de eventos procesados por el equipo de citometría de flujo. El Scatter plot B se representa la población seleccionada como células individuales, excluyendo dobletes, por su tamaño; posteriormente se analizó la complejidad de las células para excluir los dobletes remanentes (C). Por último, a partir de la población de células individuales seleccionadas por su tamaño y complejidad, se eligió aquella población de células a CD14+.

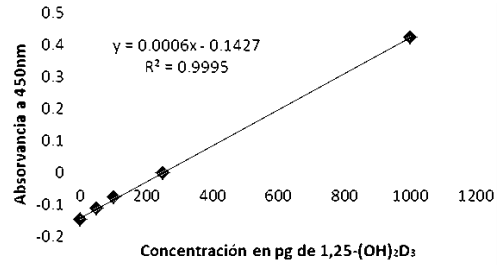
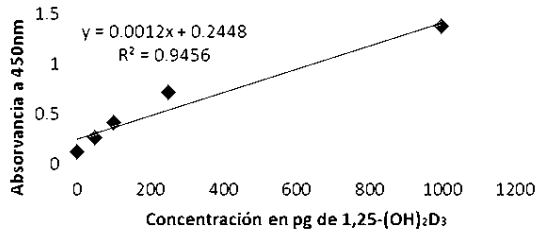




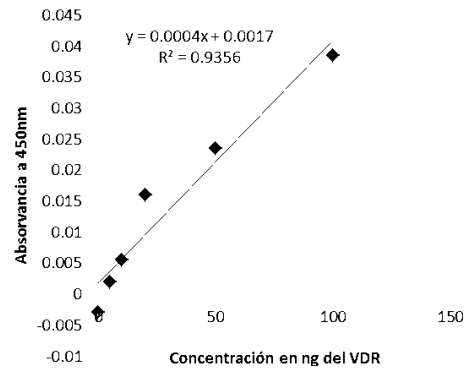
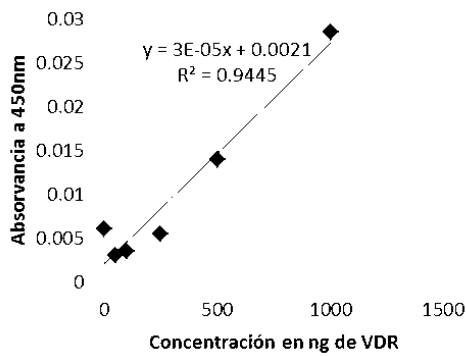
**Anexo 2. Análisis de células íntegras en las muestras de núcleos celulares.** El histograma izquierdo (A) muestra las células sin anticuerpo CD14/PE-A, y que se empleó para definir la intensidad de fluorescencia en los núcleos celulares con tinción (B). Porcentaje de células positivas a CD14-PE (2.5%). En promedio se tuvo una población CD14+ del 0.98% (DE = 1.0) (n = 6).



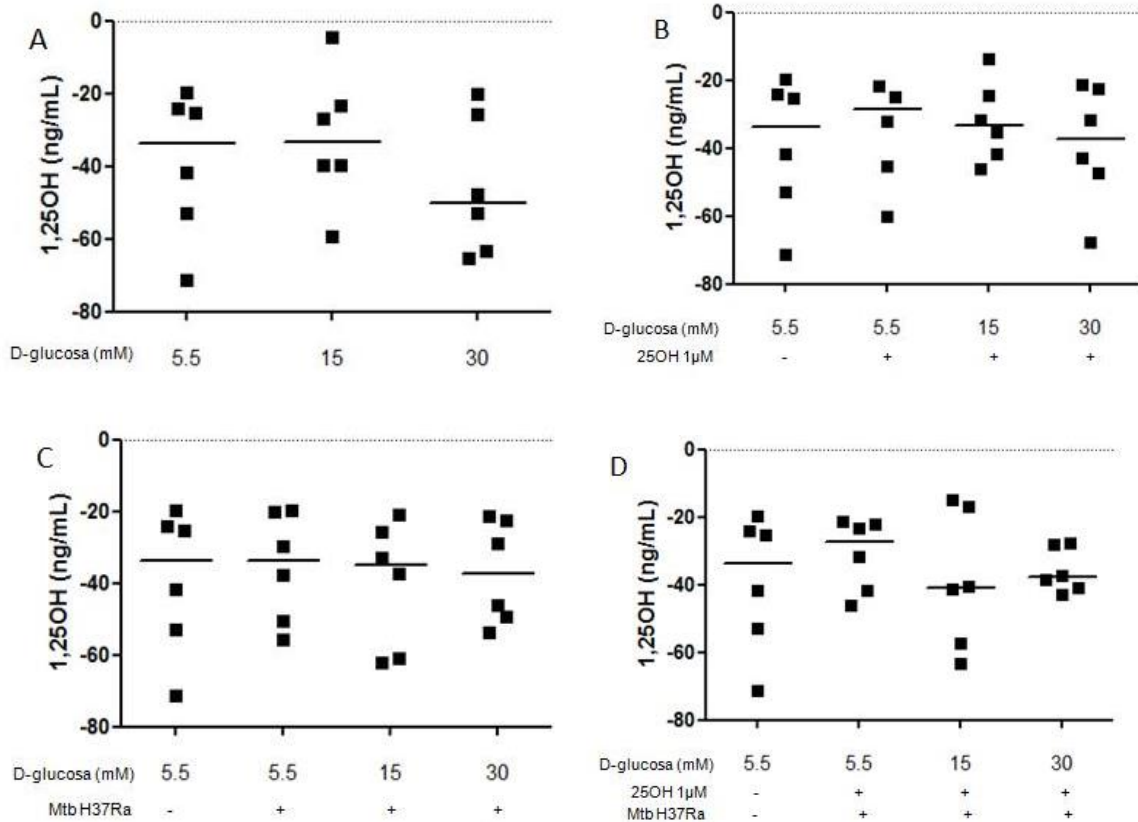
**Anexo 3. Procedimiento para el análisis de núcleos celulares.** En el Scatter plot izquierdo (A) se muestra la exclusión de los residuos celulares y partículas ajenas al experimento. Posteriormente a partir de la población seleccionada anteriormente, se definió la población de núcleos individuales, excluyendo así los dobletes.



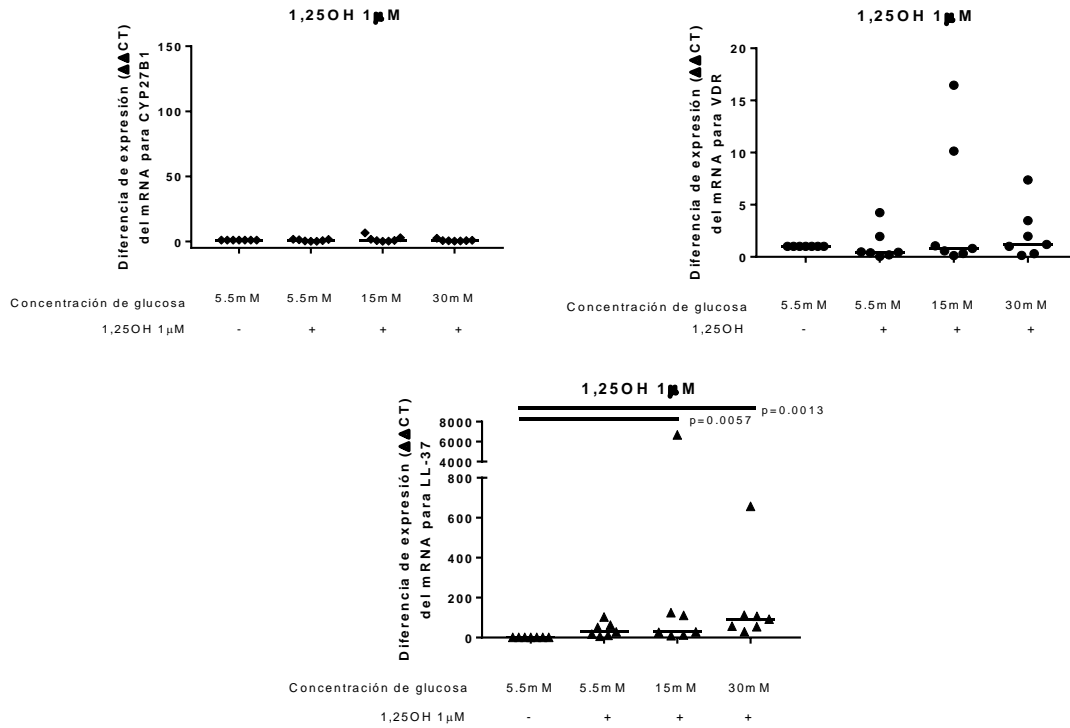
**Anexo 4. Curvas de calibración para la técnica de ELISA para el antígeno 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.** En la gráfica izquierda (A) se muestra la curva de calibración para la cuantificación de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en proteínas extraídas de citoplasmas mientras que la gráfica ubicada a la derecha (B) la curva de calibración para el antígeno 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de proteínas provenientes de núcleos.



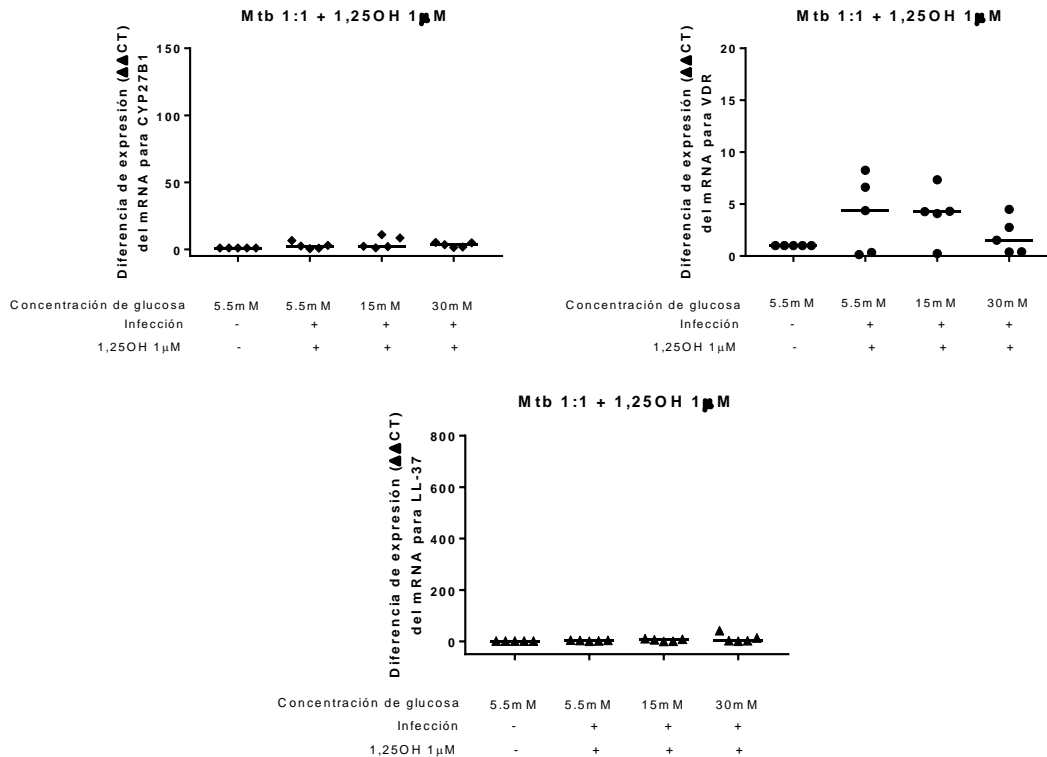
**Anexo 5. Curvas de calibración para la técnica de ELISA para el antígeno VDR.** En la gráfica izquierda (A) se muestra la curva de calibración para la cuantificación de VDR en proteínas extraídas de citoplasmas mientras que la gráfica ubicada a la derecha (B) la curva de calibración para el antígeno VDR en proteínas provenientes de núcleos.



**Anexo 4. Concentración de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en proteínas nucleares.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa (A), a las 24 horas, un grupo de células fueron estimuladas con 25(OH)D<sub>3</sub> 1µM (B), otro grupo de células fueron infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra y un tercer grupo fue estimulado con 25(OH)D<sub>3</sub> 1µM e infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Ra. Tras haber transcurrido un total de 48 horas con las diferentes concentraciones de glucosa se evaluó la concentración de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por el método de ELISA de los extractos proteínicos nucleares. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.2522$  (B)  $p = 0.7715$ , (C)  $p=0.9964$  y (D)  $p = 0.8740$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.



**Anexo 5. Efecto de la estimulación con 25(OH)D<sub>3</sub> 1  $\mu$ M en la expresión del mRNA del LL-37, CYP27B1 y VDR a diferentes concentraciones de glucosa en MDM.** Se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa, después de 24 horas se adicionó 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1  $\mu$ M, tras haber transcurrido 24 horas más se evaluó la expresión de los genes para la expresión de LL-37 (A), VDR (B) y CYP27B1 (C). Para evaluar la diferencia de expresión (eje y) se utilizó el método de RT-qPCR y el análisis  $\Delta\Delta CT$  tomando como gen de referencia 18S-rRNA y como calibrador la condición 5.5 mM de glucosa sin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. (A)  $p = 0.0020$ , (B)  $p = 0.3659$  y (C)  $p = 0.4188$ . Se considera que si  $p \leq 0.05$  es significativa la diferencia.



**Anexo 6. Efecto de la infección con *M. tuberculosis* y la estimulación con 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1 μM en la expresión del mRNA del LL-37, CYP27B1 y VDR y altas concentraciones de glucosa en MDM.** Se incubaron 1x10<sup>6</sup> MDM en 5.5, 15 y 30 mM de glucosa; después de 24 horas se adicionó 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1 μM e infectaron las células con *Mycobacterium tuberculosis* a una MOI de 1, tras haber transcurrido 24 horas más se evaluó la expresión de los genes para la expresión de LL-37 (A), VDR (B) y CYP27B1 (C). Para evaluar la diferencia de expresión (eje y) se utilizó el método de RT-qPCR y el análisis ΔΔCT tomando como gen de referencia 18S-rRNA y como calibrador la condición 5.5 mM de glucosa sin infección. Cada punto representa un individuo y la línea horizontal muestra la mediana, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman, con un nivel de significancia (α) de 0.05. (A) p = 0.6522, (B) p = 0.0755 y (C) p = 0.7709. Se considera que si p ≤ 0.05 es significativa la diferencia.