



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FRECUENCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS
EN SANGRE PERIFÉRICA Y SU ASOCIACIÓN
CON LOS NIVELES DE VITAMINA D.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA:

MARÍA ADRIANA DAZA OLIVARES

ASESOR: DR. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO.

SUPERVISOR: DR. RODOLFO PASTELIN PALACIOS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Profesor:	ABEL GUTIERREZ RAMOS.
Vocal:	Profesor:	MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO.
Secretario:	Profesor	JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ.
1er Suplente:	Profesor:	RODOLFO PASTELIN PALACIOS.
2do Suplente:	Profesor:	ENRIQUE DE LEÓN LARA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: ANEXO DEL LABORATORIO 1D,
EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Adán Moreno Eutimio.

SUPERVISOR:

Dr. Rodolfo Pastelín Palacios.

SUSTENTANTE:

María Adriana Daza Olivares.

ÍNDICE:

Abreviaturas	4
Resumen	8
1. Introducción.....	9
1.1 Vitamina D (vitD).....	9
1.2 Fuentes de vitD.....	11
1.3 La síntesis de vitD.....	12
1.4 El receptor de vitD (VDR).....	14
1.5 La vitD y su relación con las enfermedades autoinmunes.....	15
1.6 Sistema Inmunológico.....	16
1.7 Respuesta de linfocitos T.....	17
1.8 Activación de los linfocitos T.....	18
1.9 Efecto de la vitD en linfocitos Th1.....	20
1.10 Efecto de la vitD en linfocitos Th2.....	21
1.11 Efecto de la vitD en linfocitos Th17.....	22
2. Justificación.....	26
3. Pregunta de Investigación.....	26
4. Objetivos	27
5. Metodología	28
5.1 Búsqueda de microarreglos de expresión en bases de datos de acceso libre.....	28
5.1 Método de deconvolución para identificar tipos celulares.....	29
6. Resultados y discusión.....	33
7. Conclusión.....	41
8. Perspectivas.....	41
9. Referencias Bibliográficas.....	42
10. Bibliografía.....	52

Abreviaturas:

APC	Células presentadora de antígeno.
AR	Artritis reumatoide.
BCR	Receptor de célula B.
Ca₂⁺	Calcio
CD	Antígenos de diferenciación.
c-Maf	Factor activador de los macrófagos.
CTL	Linfocitos T citotóxicos.
CYP2R1	Citocromo P450, familia 2, subfamilia R, miembro 1
CYP27B1	1-alfa-hidroxilasa (vitD), conocida. como citocromo P450, familia 27, subfamilia B, miembro 1
CYP24A1	Citocromo P450, familia 24, subfamilia A, miembro 1
CYP27A1	Citocromo P450, familia 27, Subfamilia A, miembro 1
DC	Célula dendrítica.
DRIP	Proteína de interacción con el receptor vitD.
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal.
FAS (FasL o Apo1)	Proteína de membrana tipo II de 40 kDa, miembro de la familia del TNF expresado en linfocitos activados.
FGF-23	FGF-Hormona fosfatúrica 23
GATA3	Factor de transcripción codificado en humanos por el gen GATA3.

HAT	Histona de acetiltransferasas.
IFN-γ	Interferón gamma.
IgE	Inmunoglobulina E.
IL	Interleucina.
IRF-1	Factor regulador de interferón 1.
kDa	Kilodalton.
LES	Lupus eritematoso sistémico.
MAMPs	Patrón molecular asociado a Microorganismos.
MHC	Complejo principal de Histocompatibilidad.
MS	Esclerosis múltiple.
NCoR	Corepresor del receptor nuclear.
nm	Nanómetros.
PAMPs	Patrón molecular asociado a Patógenos.
PD-L1	Ligando de muerte celular programada. (Biomarcador predictivo de tumores malignos).
PTH	Hormona paratiroidea.
RAR	Receptor nuclear de la familia de de factores intracelulares de transcripción. (Receptor huérfano relacionado).
ROR	Receptor huérfano relacionado con RAR.
RXR	Receptor retinoide X.

SI	Sistema inmunológico.
SMRT	Hormonas tiroideas.
SRC	Coactivador del receptor de Esteroides.
STAT	Grupo de proteínas que actúan como transductoras de señales y activadoras de la transcripción.
STAT1	Proteína transductora de señales, activadora de la transcripción en el cromosoma 2.
STAT4	Proteína transductora de señales, activadora de la transcripción en el cromosoma 2.
STAT6	Proteína transductora de señales, activadora de la transcripción en el cromosoma 12.
T-bet	Factor de transcripción
TCR	Receptor de células T.
Treg	Células T reguladoras.
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1.
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2.
Th17	Linfocitos T cooperadores tipo 17.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
T1D	Diabetes tipo 1.
UV	Rayos ultravioleta.
VDR	Receptor de vitamina D.
VDRE	Elementos sensibles a la vitamina.

1, 25 (OH)₂ vitD

1,25-hidroxivitamina D3.

25-(OH)-vitD

25-hidroxivitamina D.

VitD

Vitamina D.

VitD2

Vitamina D2 (ergocalciferol).

VitD3

Vitamina D3 (coleciferol).

Resumen:

El sistema inmunológico (SI) es un conjunto de células y moléculas encargadas de los mecanismos de protección principalmente contra microorganismos patógenos, no obstante, la respuesta inmunitaria debe ser regulada para evitar un daño por los propios componentes del SI, dentro de los mecanismos de regulación, se encuentran las células T reguladoras.

Diversos factores influyen sobre la respuesta inmunológica, dentro de estos se encuentra las vitaminas. La vitamina D (vitD) es importante para la formación y mantenimiento del esqueleto óseo, debido a que interviene en la homeostasis del calcio y fósforo. Existe evidencia de que la vitD activa factores de transcripción por medio de la unión con un receptor nuclear, este receptor se encuentra en células de diversos tejidos, incluyendo células del SI como linfocitos T, células dendríticas y macrófagos. Adicionalmente, la vitD se ha sugerido que podría coadyuvar al tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias.

Se ha demostrado en trabajos experimentales con ratones transgénicos, incapaces de producir vitD (por ausencia de la 1α -hidroxilasa) una disminución significativa de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ en sangre periférica. Además, la ingesta de la vitD puede atenuar las manifestaciones de lupus eritematoso sistémico (LES), la encefalomiелitis autoinmune, la enfermedad inflamatoria del intestino, la tiroiditis autoinmune y la artritis en un modelo inducida por colágeno.

Por lo anterior, el presente trabajo realizó un estudio bioinformático con datos transcriptómicos de acceso libre disponibles en ArrayExpress. Se descargaron datos referentes a resultados de microarreglos de expresión en mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos sometidos a un consumo de vitamina D, y mediante el algoritmo de deconvolución de Cibersort se aproximó la frecuencia de diferentes poblaciones inmunológicas. Nuestro trabajo encontró un aumento de la frecuencia de células T reguladoras después de un consumo de vitD.

1. Introducción.

Las vitaminas son compuestos orgánicos que se requieren en pequeñas cantidades en el cuerpo humano como nutrientes [1]. Como nuestro cuerpo no puede sintetizar vitaminas en cantidades suficientes, las vitaminas en gran parte son obtenidas por medio de la dieta o suplementos alimenticios.

En estos últimos años las vitaminas han generado gran interés en el área clínica, ya que promueven actividades fundamentales del sistema inmunológico; como la activación de linfocitos y la diferenciación de las células T. Además, existe una relación en como las vitaminas presentan un efecto benéfico en trastornos inflamatorios incluyendo las alergias y enfermedades autoinmunes [2, 3]. Existen múltiples estudios donde reportan que la vitamina D (vitD) modula el sistema inmunológico, tanto el sistema innato y adaptativo [4, 5].

1.1 Vitamina D (vitD).

La vitD se caracteriza por ser una vitamina liposoluble [6], es una molécula similar a los esteroides que actúa uniéndose al receptor de vitD (VDR) para desempeñar un papel principal en la homeostasis y el metabolismo del calcio. Además, la vitD regula la función de las células inmunitarias y la diferenciación y proliferación de las células hematopoyéticas [7].

La VitD actúa sinérgicamente con la hormona paratiroidea (PTH) para ayudar al organismo a retener la concentración de calcio de los alimentos, para el fortalecimiento y manutención del sistema óseo; de lo contrario podría ocasionar

raquitismo en niños (enfermedad infantil caracterizada por una atrofia del crecimiento y por huesos deformes a causa de una insuficiente mineralización de los mismos) y osteomalacia en adultos (condición caracterizada por huesos debilitados y desmineralizados) [8].

La vitD se encuentra en la naturaleza en dos formas: vitamina D2 o ergocalciferol (vitD2) y vitamina D3 o colecalciferol (vitD3) [9]. La vitD2 difiere de la vitD3 únicamente en un doble enlace de una cadena lateral y en un grupo metilo (Figura 1), la vitD2 se forma por la radiación ultravioleta (UV) sobre el esteroil vegetal llamado ergosterol. La vitD2 se usa en general como suplemento vitamínico, dado que la vitD2 y vitD3 tienen esencialmente actividades biológicas idénticas [4, 10].

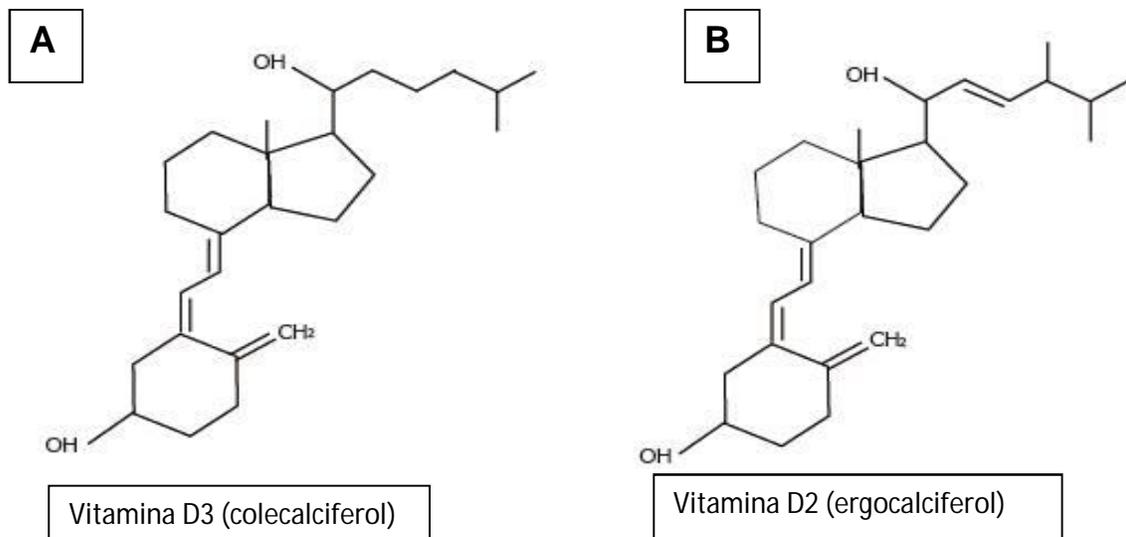


Figura 1. Estructura de la vitD. La estructura química de la vitD3 (A) y la vitD2 (B) se indican mediante diagramas lineales. Tomada y modificada de Ritobrata Goswami. Et al. (2016) [1].

1.2 Fuentes de vitD.

La vitD puede provenir de tres fuentes potenciales: síntesis cutánea, alimentos naturales y suplementos alimenticios. En los humanos, la vitD se sintetiza principalmente en la piel después de la exposición a la luz solar, es decir a los rayos UV, mientras que solo una pequeña parte se deriva de la ingesta de alimentos [9].

Muy pocos productos naturales, como el pescado (salmón, caballa, sardinas, aceite de hígado de bacalao) o algunos tipos de hongos (seta china) especialmente si estos están secos, contienen cantidades relevantes de vitD2 y vitD3 [10-12]. Algunos países como Estados Unidos y Canadá enriquecen los productos básicos como los productos lácteos con vitD2. Por lo tanto, la ingesta dietética individual de vitD depende en gran medida de los hábitos nutricionales y de la estrategia de fortificación del país. Sin embargo, una revisión con una perspectiva global encontró que del 6 al 47% de la ingesta de vitD puede provenir de suplementos dietéticos [13, 14].

Sin la utilización de suplementos alimenticios, la fuente de vitD depende en gran medida de la producción endógena, que también está influenciada por los determinantes genéticos, la latitud, la estación, la pigmentación de la piel y el estilo de vida, como el uso de protector solar y ropa [10, 15].

En los últimos años, la vitD ha recibido una mayor atención debido al resurgimiento de la deficiencia de vitamina D y el raquitismo como un problema de salud global, junto con evidencia que indica que la vitD, genera una serie de

respuestas biológicas extraesqueléticas que incluyen la participación en la inhibición de la progresión de las células tumorales en cáncer de mama, colon y próstata; además efectos sobre el sistema cardiovascular; y protección contra una serie de enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias [10].

1.3 La síntesis de vitD.

En la piel humana, la vitD₃ se sintetiza a partir del 7-dihidrocolesterol cuando se expone a los rayos UV. La vitD₃ es biológicamente inactivo e inmediatamente se une a las proteínas de unión a la vitD. Luego ingresa a la circulación y se hidroxila en el hígado, catalizada por las enzimas citocromo P450 2R1 (CYP2R1) y citocromo P450 27A1 (CYP27A1), lo que da como resultado la producción de la forma inactiva 25-hidroxivitamina D (25-OH vitD), que representa el principal metabolito circulante de la vitD y es el parámetro más confiable para definir los niveles de vitD [16].

En el riñón, 25-OH vitD se convierte en el compuesto circulante biológicamente activo calcitriol (1,25 (OH)₂ vitD) por la enzima 1- α -hidroxilasa (CYP27B1) que está bajo estricto control de la PTH y el factor de crecimiento de fibroblastos de la hormona fosfatúrica 23 (FGF-23) [5].

Los niveles de calcitriol están estrechamente regulados en un circuito de retroalimentación negativa renal, incluida la inhibición de CYP27B1 por niveles altos de calcitriol y el FGF-23. Además, la estimulación de la enzima del citocromo

P450 familia 24 (CYP24A1) metaboliza el calcitriol en la forma inactiva, soluble en agua (ácido calcitrico), que luego se excreta en la bilis [17].

Los niveles circulantes de calcitriol están determinados principalmente por la actividad renal de CYP27B1. Sin embargo, otros tipos de células, incluidas las células inmunológicas, también expresan CYP27B1 y pueden convertir la forma circulante inactiva (25-OH vitD) en la forma activa de manera autocrina o paracrina [7], como los macrófagos y las células dendríticas (Figura 2) [18].

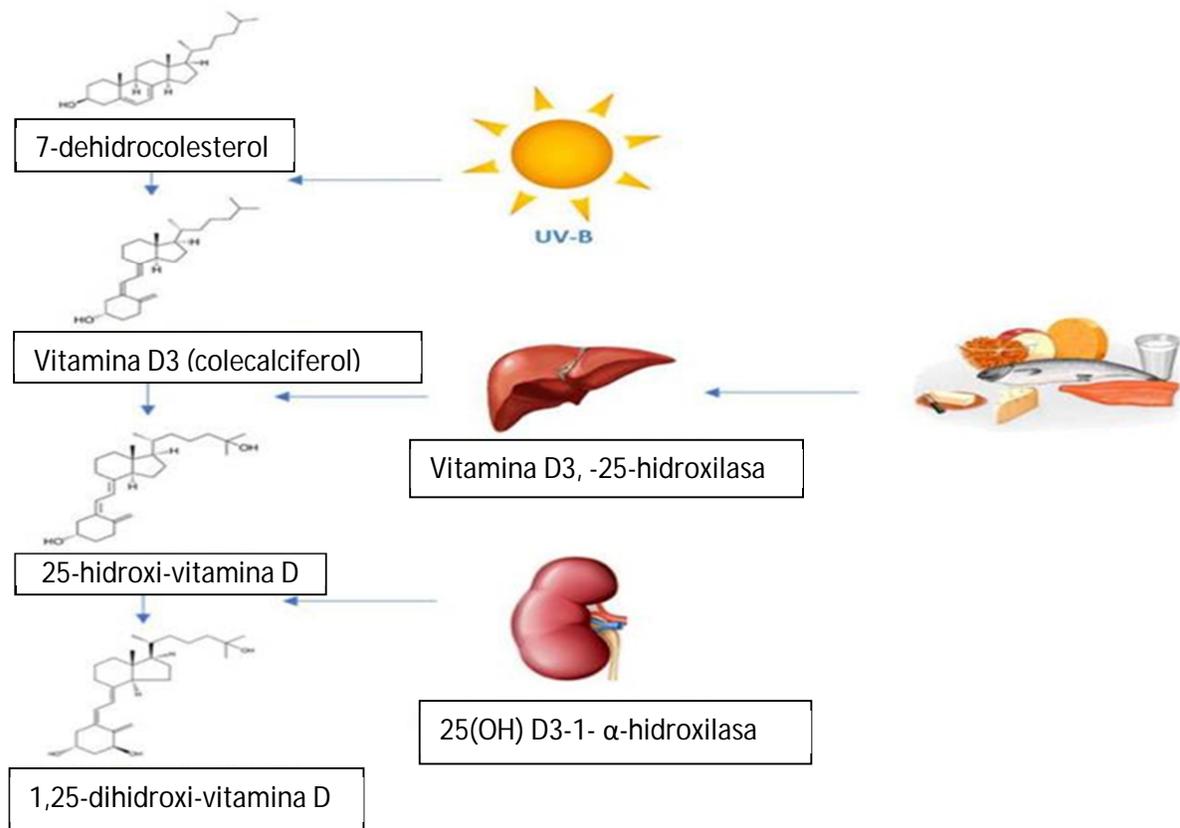


Figura 2: Representación de la síntesis de vitD. La vitD ésta inactiva por lo cual se hidroxila dos veces, una en el hígado y otra en el riñón, para obtener la forma activa 1,25 (OH)₂ vitD. Tomada y modificada de Mayte Medrano, et al. (2018) [7].

1.4 El receptor de vitD (VDR).

La vitD funciona mediante el receptor nuclear de vitD (VDR). El complejo vitD-VDR heterodimeriza con el receptor retinoide X (RXR) dentro del núcleo celular donde se une a los elementos sensibles a la vitD (VDRE) para que sirvan como factor de transcripción para numerosos genes [6]. Los complejos VDR/RXR pueden atraer coactivadores o correpresores para inducir o reprimir la transcripción génica, dependiendo del gen objetivo.

El coactivador del receptor de esteroides (SRC) y el complejo de proteína de interacción con el receptor de vitD (DRIP) se ha identificado como coactivadores [19]. Los coactivadores SRC reclutan histona acetil transferasas (HAT) que promueven la transcripción. Además de la acetilación, también se produce metilación de histonas. Estudios recientes han demostrado que las metiltransferasas también pueden desempeñar un papel en la transcripción mediada por VDR [20].

Los correpresores de la función VDR actúan en ausencia de ligando o en presencia de antagonistas. Los corepresores más estudiados para VDR son el corepresor del receptor nuclear (NCoR) y el mediador silenciador para los receptores de retinoides o de hormonas tiroideas (SMRT) [21, 22].

La 1, 25 (OH)₂ vitD también puede inhibir la transcripción génica a través de VDR o inhibir directamente otros factores de transcripción [23]. El VDR tiene un dominio N-terminal muy corto en comparación con otros receptores nucleares. El dominio de unión al DNA está compuesto por dos dedos de zinc. El dedo de zinc proximal

(N-terminal) es un sitio específico para unirse a los VDRE, mientras que el segundo dedo de zinc sirve para la heterodimerización del receptor retinoide X (RXR). La segunda mitad de la molécula es el dominio de unión al ligando, donde se une al $1, 25 \text{ (OH)}_2 \text{ vitD}$, que también contiene regiones requeridas para la heterodimerización a RXR [19].

1.5 La vitD y su relación con las enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes son caracterizadas por la pérdida de la tolerancia del SI con una combinación de predisposición genética [24], factores de riesgo epidemiológicos y contribuyentes ambientales [25].

Un factor importante puede ser la disponibilidad de niveles suficientes de vitD [26, 27], ya que varios estudios epidemiológicos sugieren asociaciones entre la deficiencia de vitD y una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes, como diabetes tipo 1 (T1D) [28], MS [29], lupus eritematoso sistémico (LES) [30], artritis reumatoide (AR) y EII [31].

En modelos animales para T1D, MS, SLE; la administración de calcitriol prevenía o mejoraba la autoinmunidad. Los estudios en animales con deficiencia de vitD o que tengan el VDR bloqueado, muestran un aumento de la inflamación y susceptibilidad a la enfermedad de Crohn y T1D, alteración de la localización de células T y falta de protección del hospedero contra la invasión bacteriana [32].

En los últimos 40 años, varios estudios clínicos abordaron las preguntas sobre si los niveles de vitD en humanos están asociados con el riesgo de desarrollar autoinmunidad, y el desarrollo y la progresión de enfermedades autoinmunes. Una

revisión sistemática reciente analizó los resultados de 219 estudios publicados y concluyó que la vitD parece desempeñar un papel beneficioso en la prevención de la autoinmunidad, pero que aún faltan ensayos clínicos controlados aleatorios en esta área [33].

1.6 Sistema Inmunológico.

Los mecanismos de defensa del hospedero consisten en dos estrategias del sistema inmunitario: la inmunidad innata, que media la protección inicial frente a las infecciones, y la inmunidad adaptativa, que se desarrolla de forma más lenta y proporciona una defensa más especializada [34].

La inmunidad innata, siempre está presente, preparada para bloquear y eliminar la entrada de los microorganismos principalmente. La inmunidad adaptativa, llamada también inmunidad adquirida, debe expandir y diferenciar los linfocitos antes de poder proporcionar una defensa eficaz, es decir, se adapta a la presencia de invasores microbianos [35].

La primera línea de defensa en la inmunidad innata la proporcionan las barreras físicas (uniones estrechas entre las células epiteliales, movimiento ciliar, entre otras), químicas (péptidos antimicrobianos, lisozima, pH extremo, entre otras) y microbiológicas (microbiota), las cuales tratan de bloquear la entrada de microorganismos. Si estos llegan a entrar en los tejidos o en la circulación, son atacados por fagocitos y células linfoides innatas, y varias proteínas plasmáticas, incluidas las del sistema del complemento. Todos estos mecanismos reconocen patrones altamente conservados en familias de microorganismos y patógenos

(MAMPS/ PAMPs) ocasionando un respuesta inflamatoria y/o estado antiviral, que buscará la eliminación del agente agresor, y si esta no es posible permitirá la activación de la inmunidad adaptativa, mediante el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T y acarreado el antígeno a los linfocitos B [35, 36].

El sistema inmunitario adaptativo está integrado por los linfocitos T y B, y sus productos, entre ellos los anticuerpos. Los linfocitos B y T son las únicas células que tienen receptores clonales específicos frente a antígenos diversos (Receptor de células B [BCR] y receptor de célula T [TCR]) y son los mediadores clave de la inmunidad adaptativa. Aunque todos los linfocitos tienen un aspecto similar, son heterogéneos en su linaje, función y fenotipo, capaces de producir respuestas y actividades biológicas complejas [37].

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos, por lo tanto, son las que median la inmunidad humoral. Los linfocitos B expresan su BCR, que es un anticuerpo de membrana que sirven de receptor para reconocer antígenos e iniciar el proceso de activación. Los linfocitos B produce la secreción de anticuerpos con la misma especificidad antigénica que el BCR [38].

1.7 Respuesta de linfocitos T.

Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad celular. Los receptores para el antígeno de la mayoría de los linfocitos T, solo reconocen fragmentos peptídicos de antígenos proteínicos que están unidos a moléculas especializadas conocidas como moléculas del MHC [39, 40].

Entre los linfocitos T, los $CD4^+$ se denominan linfocitos T cooperadores (Th), producen proteínas llamadas citocinas que ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos y a los fagocitos a destruir los microbios ingeridos. Los linfocitos T $CD8^+$ se conocen como linfocitos T citotóxicos (CTL), por que matan las células que albergan microbios intracelulares mediante mecanismos dependientes de granzimas, perforinas y FAS ligando. Algunos linfocitos T $CD4^+$ pertenecen a un subgrupo especial que impide o limita las respuestas inmunitarias; estos se llaman linfocitos T reguladores [40].

1.8 Activación de los linfocitos T.

La respuesta efectora de los linfocitos T se inicia por el reconocimiento de antígenos específicos por los linfocitos y por señales adicionales procedentes de las APC en los órganos linfoides secundarios. Cuando entran en un individuo antígenos proteicos, éstos son transportados a los órganos linfoides periféricos, en particular los ganglios linfáticos. Los antígenos son procesados por las APC y son presentados en forma de péptidos asociados a moléculas del MHC. Los linfocitos T naive migran a los mismos órganos linfoides periféricos y se encuentran con los antígenos procesados [40].

La respuesta inicial o primaria de las células T empieza por efecto del reconocimiento de los complejos péptido-molécula del MHC presentados por las APC, la interacción de los coreceptores ($CD4$ y $CD8$, reconocen moléculas de clase II y clase I del MHC, respectivamente) y la interacción de las moléculas accesorias de las células T con sus ligandos en las APC (coestimulación,

coinhibición, moléculas de adhesión, entre otras), todo esto tiene lugar en los ganglios linfáticos [41].

Las principales consecuencias de la activación de las células T naive son la proliferación de la clona específica para el antígeno presentado, proceso que se conoce como expansión clonal, y la diferenciación de su progenie en células efectoras y de memoria [41].

Las células T efectoras acceden a la circulación, localizan al antígeno específico en los tejidos periféricos y se activa de nuevo por el reconocimiento del antígeno, para realizar sus funciones efectoras [41].

Las células T de memoria y efectoras tienen un umbral de activación reducido en comparación con las células T naive y son capaces de responder a los antígenos presentados por APC distintas de las células dendríticas maduras. Las células T de memoria y efectoras pueden activarse en tejidos periféricos fuera de los órganos linfoides, lo que permite que las respuestas efectoras se pongan en marcha de manera más rápida y eficiente (Figura 3).

Etapas de la activación

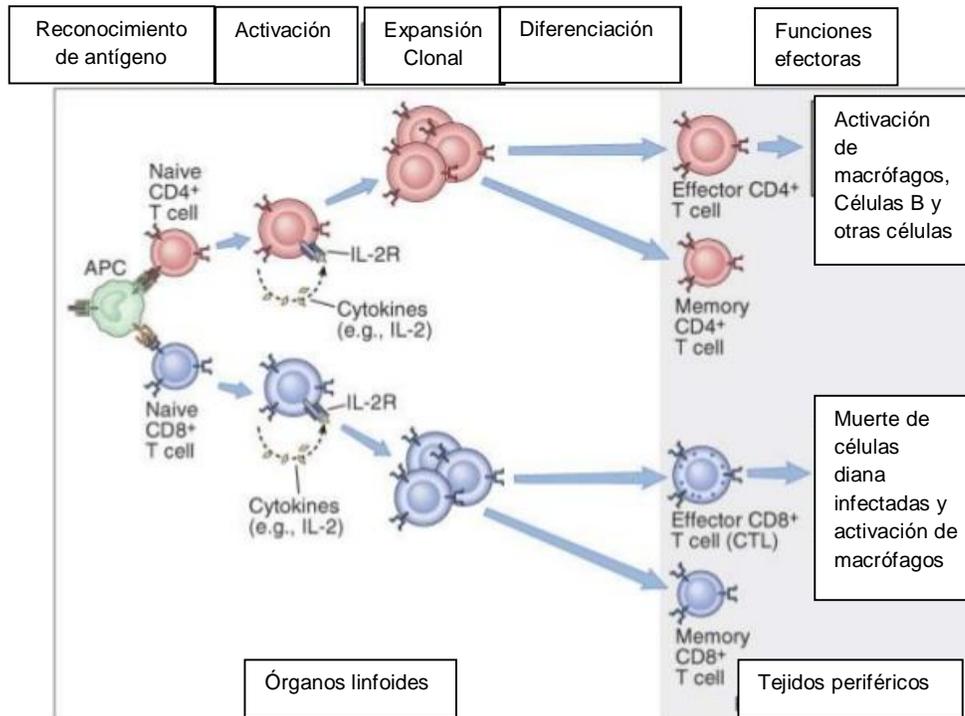


Figura 3. Fases de reconocimiento y activación de células T. El reconocimiento del antígeno por una célula T (naive) induce a la secreción de IL-2, la expansión clonal es una consecuencia de la proliferación celular autocrina inducida por IL-2 y la diferenciación de las células T a efectora o de memoria. En la fase efectora de la respuesta, las células efectoras responden al antígeno produciendo citoquinas, que tiene diversas funciones, como la activación de macrófagos, los linfocitos B y las células TCD8+ y la inducción de la inflamación. Tomada y modificada de Abul K. Abbas. Et al. (2002) [35].

1.9 Efecto de la vitD en linfocitos Th1.

Las células Th1 se caracterizan por la producción de interferón- γ (IFN- γ) después de la diferenciación estimulada por interleucina (IL) 12. El IFN- γ activa y mejora la actividad microbicida de los macrófagos, y como tal las células Th1 proporcionan inmunidad contra bacterias intracelulares, hongos y protozoos [42, 43]. El factor de transcripción T-bet es un regulador maestro del desarrollo de células Th1 [44].

Además, STAT4 y STAT1, son los factores de señalización y transcripción que actúan bajo de IL-12 e IFN- γ , respectivamente, y promueven la diferenciación de células Th1 [45, 46]. La señalización de IL-12 también induce el factor de transcripción, llamado factor regulador de interferón 1 (IRF-1), requerido para la diferenciación de células Th1[47].

Varios estudios han demostrado el efecto de la vitD en las respuestas de células Th1 periféricas [48]. La proliferación celular se inhibe y la expresión de IL-2, se atenúa en presencia de 1, 25 (OH) $_2$ vitD [49, 50]. La vitD suprime el desarrollo de células Th1 mientras promueve la diferenciación de células Th2 [51].

Las células T de memoria que tienen abundante expresión de VDR muestran un profundo efecto inhibitorio con 1, 25 (OH) $_2$ vitD [52]. La 1, 25 (OH) $_2$ vitD inhibe directamente la producción de IFN- γ *in vitro* [53, 54]. Aunque los animales deficientes en VDR tienen células CD4 $^+$ y CD8 $^+$ normales. La producción de IFN- γ por las células T CD4 $^+$ aumenta significativamente[55]. La VitD atenúa la producción de IL-12 e IFN- γ a partir de leucocitos humanos infectados con micobacterias [56].

En resumen, la vitD disminuye la producción de IFN- γ y la IL-12 por las células dendríticas (DC) atenuando así las respuestas Th1.

1.10 Efecto de la vitD en linfocitos Th2.

Las células T vírgenes activadas por antígeno en presencia de IL-4 se diferencian en células Th2 que secretan IL-4, IL-5 e IL-13. Las células Th2 proporcionan inmunidad contra parásitos extracelulares [57]. La IL-4 actúa como un circuito de

retroalimentación positiva para la diferenciación de Th2, mientras que IL-5 es la citocina de reclutamiento y desarrollo de eosinófilos [58], y la IL-13 juega un papel clave contra las infecciones parasitarias [59].

El factor de transcripción codificado en humanos por el gen GATA3 actúa como el regulador maestro de las células Th2, mientras que el factor activador de los macrófagos (c-Maf) expresado en células Th2 es un potente transactivador de IL-4 [60, 61]. La proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 6 (STAT6) es también inducida por IL-4 y se requiere para el desarrollo de células Th2 [62, 63].

La 1, 25 (OH)₂ vitD aumenta la producción de IL-4 [54]. Cuando se inyecta por vía subcutánea en ratones en un modelo de asma alérgica, la vitD aumenta la proliferación de células T inducida por alérgenos, IL-4 e IL-13 y la producción de IgE [64]. Sorprendentemente, la eosinofilia de las vías aéreas se atenúa después de la administración de vitD [64]. La 1, 25 (OH)₂ vitD polariza las células T humanas y las células T murinas a un fenotipo Th2 [65].

Cuando las ratas preñadas se complementan con altas dosis de vitD, las crías desarrollan respuestas alérgicas debido a las relaciones alteradas Th1/Th2. En general, la vitD aumenta la diferenciación de Th2 al aumentar la secreción de factores de transcripción específicos de IL-4, IL-5, IL-10 y Th2 [66].

1.11 Efecto de la vitD en linfocitos Th17.

Las células Th17 generalmente se consideran reguladoras positivas de las respuestas inmunitarias porque producen citocinas proinflamatorias, incluidas IL-

17A, IL-17F e IL-22 [67]. La producción de citocinas no solo promueve la acumulación de células inmunológicas, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos, en sitios inflamatorios, sino que también puede causar patologías de los tejidos. Por el contrario, ciertas células Th17 también pueden regular negativamente las respuestas inmunes mediante la secreción de factores inmunosupresores, como la IL-10, estas células se denominan células Th17 no patógenas [67].

En presencia de Factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IL-6 e IL-21, las células T CD4⁺ se diferencian en células Th17 que producen IL-17, IL-21 e IL-22 [68, 69]. Las células Th17 proporcionan inmunidad a varios patógenos extracelulares, incluida la defensa contra las infecciones por *Candida*, *Citrobacter* y *Klebsiella* [70, 71]. El factor de transcripción gamma relacionado con RAR (ROR γ t) se requiere para la diferenciación Th17 [72]. El factor IRF4, un inductor de GATA3 en células Th2 también se requiere para el desarrollo de las células Th17 [73].

In vitro la 1, 25 (OH)₂ vitD inhibe la producción de citocinas Th17 a través de VDR pero no suprime la transcripción del gen *Th1* [74]. La 1, 25 (OH)₂ vitD también inhibe la diferenciación de Th17 tanto en pacientes asmáticos jóvenes como en controles sanos a través de un mecanismo dependiente de células dendríticas, inhibiendo la expresión de IL-17, receptor de IL-23 (IL-23R), receptor nuclear RORC y receptor de quimiocina CCR6 [75]. En general, los estudios sugieren que la polarización de las células Th17 es atenuada por la vitD.

1.12 T reguladora.

Las células T reguladoras (Tregs) controlan las respuestas proinflamatorias de las células Th efectoras y promueven la autotolerancia [76]. Las células T CD4⁺ naive expuestas a TGF- β se convierten en Tregs inducibles en la periferia, y estas células tienen propiedades similares a las Tregs naturales, derivadas del timo, que incluyen funciones supresoras [77, 78]. El factor de transcripción Foxp3 ha sido identificado como un marcador confiable para las células Treg tanto en humanos como en ratones [79, 80]. La señalización de IL-10 en Tregs mantiene la expresión de Foxp3 para la regulación inmunitaria [81].

La 1, 25 (OH)₂ vitD induce la diferenciación y expansión de las células Foxp3⁺ Treg a través de varios mecanismos [82, 83]. Cuando se aplica tópicamente en ratones, la vitD aumenta la capacidad supresora de las células CD4⁺, CD25⁺ y las células T CD4⁺ de los ganglios linfáticos que drenan y la piel tienen una capacidad reducida para proliferar *in vitro* [83].

Con la ayuda de IL-2 y vitD se aumenta la frecuencia de las células T Foxp3⁺ humanas [84]. Hay un mayor número de células Treg CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺, cuando las células T CD4⁺ y CD25⁻ se cultivan en presencia de vitD *in vitro* [84, 85].

La suplementación con vitD se asocia con un mayor porcentaje de células Treg CD4⁺ circulantes en individuos sanos [86]. Cuando se administra por vía oral, el calcitriol induce Tregs y DC inmaduras a través de exposición intestinal al tiempo que disminuye la aterosclerosis en ratones [87]. Existe una correlación *in vivo*

entre el estado de la vitD y la función supresora de Treg en pacientes con esclerosis múltiple recurrente [88].

La vitD también induce el desarrollo de células Treg productoras de IL-10; aunque, la vitD no afecta la expresión de IL-10R [89-91]. Las DC derivadas de monocitos pretratadas con 1, 25 (OH)₂ vitD regulan la expresión de PD-L1 y cuando se cultivan conjuntamente estas DC convierten las células T CD4⁺ en células Treg secretoras de IL-10 [92]. La 1, 25 (OH)₂ vitD en presencia de dexametasona induce a la población de células Treg secretoras de IL-10 en células T CD4⁺ murinas y humanas. En general, el desarrollo de las células Treg aumenta en presencia de vitD [93].

2. Justificación

Las células Treg son fundamentales en el control de la respuesta inmunitaria participando en los procesos de activación, proliferación y producción de citocinas por parte de las células Th, CTL, linfocitos B y APC. La ausencia, bajos niveles o función defectuosa de las células Treg han sido correlacionadas con autoinmunidad, mientras que su presencia ha sido asociada con tolerancia autoinmune. Datos generados en modelos animales indican que la transferencia adoptiva de células Treg pueden prevenir o eliminar enfermedades mediadas por dichas células, incluyendo enfermedades autoinmunes.

Por otro lado, en los últimos años la vitD ha jugado un papel importante en el área clínica por influir en diversas funciones en el sistema inmunológico. Estudios en modelos de ratón han visto que las células Tregs aumentan en presencia de la vitD; sin embargo, sigue siendo una incógnita que poblaciones inmunológicas se alteran con la suplementación de vitD en humanos.

3. Pregunta de Investigación

¿Cuál es la frecuencia de las diferentes poblaciones inmunológicas en sangre periférica antes y después de la suplementación de vitD en individuos sanos?

4. Objetivos

General

Evaluar la frecuencia de las poblaciones inmunológicas presentes en mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos sanos sometidos a la ingesta de vitD a través de un estudio bioinformático utilizando datos transcriptómicos de acceso libre.

Particulares

- Buscar datos de transcriptomas de PBMC de individuos sanos sometidos a una ingesta de vitD en bases de datos de acceso libre.
- Analizar la frecuencia de células inmunológicas mediante un método de deconvolución para identificar tipos celulares utilizando datos de microarreglos de expresión generados en estudios clínicos de suplementación de vitD mediante bioinformática.

5. Metodología

El tratamiento de los datos y la aplicación del método de CIBERSORT se llevó a cabo con el software estadístico R-versión 4.1.3 (<https://www.r-project.org>), este programa permite la instalación de los paquetes creados por Newman A M, et al., del métodos de deconvolución CIBERSORT [94], así como el cálculo de medidas estadísticas para evaluar su precisión. Los graficos que se muestran en los resultados se realizaron a través del software GraphPad Prisma 7.

5.1 Búsqueda de microarreglos de expresión en bases de datos de acceso libre.

Se realizó la búsqueda en la base ArrayExpress que contiene datos de genómica funcional, esta almacena datos de experimentos de genómica funcional de alto rendimiento y proporciona estos datos para su reutilización a la comunidad de investigación, cuenta con 75,393 experimentos que corresponde a 2,589,705 de ensayos en 61.87 TB en archivos (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>). Para la búsqueda se utilizó el criterio de “vitamine D”, que arrojó 973 experimentos de los cuales 343 correspondieron e ensayos de expresión de genes, despues de la revisión de las característics de cada estudio se decidio utilizar el estudio con número de acceso E-MTAB-6246, titulado “Biochemical Efficacy and Safety Trial of Vitamin D: dose-finding, placebo-controlled, randomised clinical trial assessing effects of high dose vitamin D transcription profiling by array Homo sapiens”, que contiene 574 datos de microarreglos de expreisión de sujetos sanos que participaron en un estudio clínico de suplementación de dos dosis de vitamina D.

5.1 Método de deconvolución para identificar tipos celulares.

Se utilizó el método de CIBERSORT que es un método de deconvolución parcial desarrollado por Newman et al., [94] a fin de cuantificar la proporción relativa de cada tipo celular inmunológico en una muestra. Este método está disponible en una aplicación web y un guion en el programa estadístico R, en los que se pueden introducir tanto datos procedentes de microarrays como de RNA-seq. Además, CIBERSORT facilita una matriz de la firma transcriptómica de diferentes células inmunológicas denominada “LM22” con la que se puede realizar todo el proceso. Ésta consta de 22 tipos celulares incluidos células de origen linfóide y mielóide. De esta forma, se obtuvo las proporciones de los tipos celulares inmunológicos para cada muestra, en función de la expresión de los genes. Newman et al., 2015, compara este método computacional con la citometría de flujo, y obtiene una correlación significativa entre ambos, al inferir la proporción de los tipos celulares.

La deconvolución se define como una operación consistente en descomponer una mezcla de señales (salida) en sus componentes individuales (entradas). Habitualmente, se le denomina “el problema inverso a la convolución”, en el que, de manera generalizada, se sirve de la transformación o combinación de dos funciones para dar lugar a una tercera, es decir, las entradas son conocidas y el elemento a hallar es la salida.

La formulación del método de deconvolución, se puede entender como una ecuación entre matrices, en lugar de funciones, ajustándose a la siguiente notación:

Sea T la matriz ($n \times m$) que contiene los valores medidos de las n características o variables en cada una de las m muestras (en Bioinformática es usual colocar las variables en filas y los individuos en columnas). Ésta sería la matriz de “salida” que queremos descomponer o deconvolucionar. Dentro de cada muestra, se distinguen k grupos que, al estar mezclados, se encuentran representados en proporciones diferentes en cada una de ellas. Así, la matriz T se descompone en el producto de otras dos de la manera siguiente:

$$T = C \times P$$

La matriz C ($n \times k$) contiene los valores que tomarían las características o variables en cada grupo k y la matriz P ($m \times k$) contendría las frecuencias relativas o proporciones de los k grupos en las m muestras.

En este estudio, la matriz T recoge la expresión de n genes en un número m de muestras. El objetivo es descomponerla en el producto de dos matrices, una matriz C llamada matriz de huellas o firmas de poblaciones inmunológicas purificadas que contiene los valores de expresión de los n genes en los k tipos celulares, otra matriz P llamada matriz de proporciones, que contenga la abundancia (en porcentaje) de cada tipo celular k en cada muestra m .

El objetivo de CIBERSORT es resolver el sistema de ecuaciones lineales, para lograrlo emplea el algoritmo de ν -SVR (ν -Support vector regression) perteneciente a las técnicas de aprendizaje supervisado de las máquinas de soporte vectorial (SVM). El motivo de escoger esta particularización de SVR se encuentra en la necesidad de imponer un límite inferior en el número ν de vectores de soporte (genes marcadores) y de uno superior para los errores de entrenamiento. Se parte de tres valores para ν (0.25, 0.5 y 0.75) y se elige aquél con el que se obtenga un menor error al comparar el resultado observado y el predicho. Las proporciones relativas a cada tipo celular están representadas por los coeficientes no negativos de la regresión normalizados a sumar la unidad.

La función empleada para llevar a cabo la deconvolución en R es:

```
res -> CIBERSORT (sig_matrix, mixture_matrix, perm = 100)
```

Siendo `sig_matrix` la matriz de firmas C (LM22) y `mixture_matrix`, la matriz de mezclas T con los símbolos de los genes en la primera columna y, como cabecera, los nombres de las muestras. El último argumento corresponde al número de permutaciones que se desee incluir en el análisis, en referencia al cálculo de la distribución empírica de la correlación de los coeficientes para realizar el análisis estadístico correspondiente a la obtención del p-valor. Para este último parámetro, se utilizó un número mayor o igual que 100 porque la operación que se lleva a cabo consiste en generar tantas muestras aleatorias de la matriz T como permutaciones indicadas para calcular en cada una el proceso de deconvolución. Al final, se obtiene como resultado una matriz compuesta por:

Las contribuciones de cada tipo celular en las muestras de las que se obtiene la P estimada:

`P_EST <- res`

El p-valor correspondiente a la aplicación del método de remuestreo de Montecarlo en cada muestra y que supone como hipótesis nula:

$H_0 =$ La matriz T no contiene ningún tipo celular presente en C

La correlación y la raíz del error cuadrático medio (RMSE) entre el valor observado y el predicho por muestra.

6. Resultados y discusión

Se realizó una búsqueda en la plataforma Array Express para localizar estudios donde evaluaran el efecto de la suplementación de vitD mediante la obtención del transcriptoma en PBMC de sujetos sanos. Se encontró el estudio E-MTAB-6246 [95], el cual permitió el acceso a 496 microarreglos de expresión realizados con la plataforma de Array Illumina-Human HT-12-V4.0.

El estudio clínico de A.J. Berlanga-Taylor et al. [95], tuvo el objetivo de investigar los efectos de la suplementación de vitD en voluntarios clínicamente sanos en dosis bajas (2000UI) y altas (4000UI) diariamente y comparar con un grupo que recibió placebo durante un periodo de 12 meses.

El estudio de A.J. Berlanga-Taylor et al. [95], analizó una población de 248 sujetos distribuidos de la siguiente forma: 86 voluntarios se les administró la mayor concentración de vitD (4000UI), 80 voluntarios se les administró la dosis más baja (2000UI) y 82 voluntarios recibieron placebo. En el estudio se contempló la toma de una muestra de sangre periférica antes y después de 12 meses de la ingesta diaria de vitD, se obtuvieron PBMC y se realizaron 496 microarreglos de expresión que corresponden al total de voluntarios sanos.

Los datos de los microarreglos de expresión de cada individuo fueron depurados y normalizados, agrupados en dos columnas una con el nombre del gen y otra con el valor de expresión de cada gen, para su análisis en el programa R con el método de CIBERSORT.

A continuación se muestran las gráficas del análisis de deconvolución con Cibersort para aproximar las frecuencias relativas de diferentes poblaciones celulares.

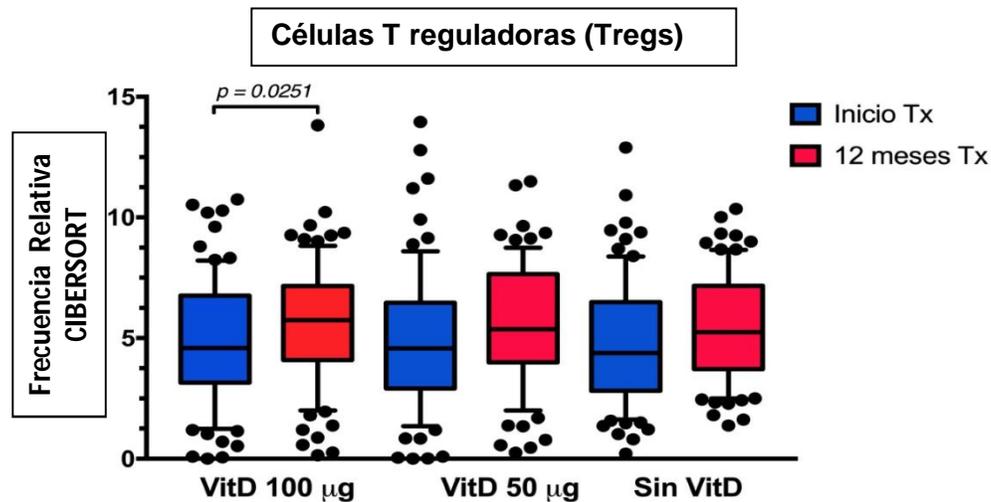


Figura 4. Frecuencia relativa de células T reguladoras en voluntarios clínicamente sanos mediante CIBERSORT. Se determinó la frecuencia de células Tregs antes y después de la administración de vitD en PBMC de voluntarios clínicamente sanos (nT=248) a los cuales se les administro diferentes concentraciones, 100 µg de vitD (n=86), 50µg de vitD (n=80) y placebos (n=82); mediante un análisis bioinformático utilizando los datos transcriptómicos a través de un método de convolución con el algoritmo CIBERSORT se determinó las frecuencias relativas.

En relación a las células T reguladoras, se observó que los tres grupos evaluados tienen niveles de Treg semejantes al inicio del estudio, no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), sin embargo, los niveles de Treg después de 12 meses de ingesta diaria de 100 ug de vitD mostró diferencia significativa con respecto a la frecuencia basal ($p=0.0251$). Por lo tanto, nuestro estudio bioinformático sugiere que

la suplementación de 100 um de vitD diariamente tiene la capacidad de aumentar la cantidad de células T al paso del tiempo.

En cuanto a la administración de 50 ug vitD no muestra una diferencia significativa ($p>0.05$) después de la ingesta diaria por 12 meses. Tampoco se encontró algún cambio con respecto a la administración de placebo durante el estudio.

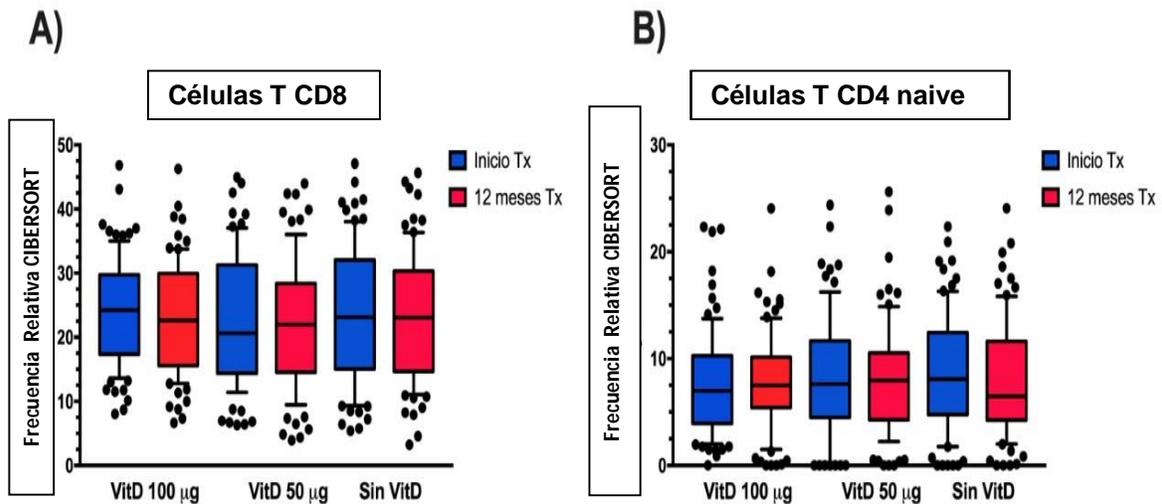


Figura 5. Frecuencia relativa de linfocitos T en voluntarios clínicamente sanos antes y después de la ingesta diaria de vitD mediante CIBERSORT. Se determinó la frecuencia de células T CD8⁺ y T CD4⁺ antes y después de la ingesta de vitD en PBMC de sujetos sanos (n=248). Los grupos de estudio se conformaron con una ingesta diaria de 100 µg (n=86) de vitD, 50µg (n=80) de vitD y placebo (n=82); mediante un análisis bioinformático utilizando los datos transcriptómicos a través de un método de convolución con el algoritmo CIBERSORT se determinó las frecuencias relativas.

Las células T cooperadoras CD4⁺ combaten infecciones y desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario y las células T citotóxicas CD8⁺ reconocen y destruyen células infectadas por microorganismos como bacterias y virus.

Con respecto a los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, se observó que los tres grupos evaluados tienen niveles de T CD4⁺ y T CD8⁺ semejantes al inicio del estudio, no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), y estos niveles de linfocitos T se mantienen después de los 12 meses de suplementación con vitD, por lo que este resultado bioinformático sugiere que los niveles de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no se ven alterados por la suplementación.

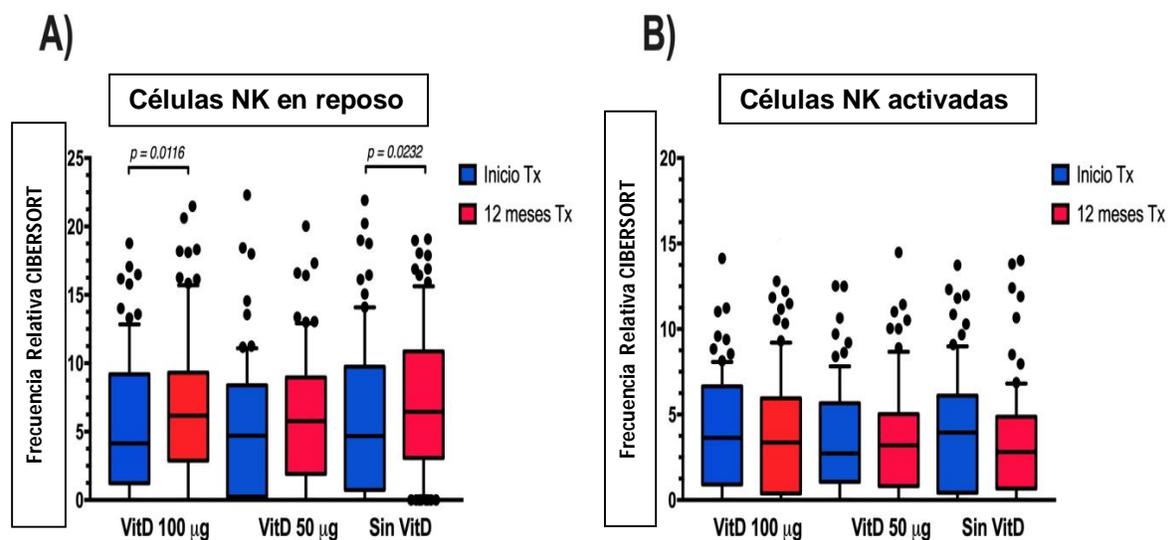


Figura 6. Frecuencia relativa de células NK en reposo y activadas, en voluntarios clínicamente sanos antes y después de la ingesta diaria de vitD mediante CIBERSORT. Se determinó la frecuencia de células NK en reposo (A) y NK activadas (B) en PBMC de sujetos sanos ($n=248$) antes y después de la ingesta de vitD. Los grupos de estudio se conformaron con una ingesta diaria de 100 µg ($n=86$) de vitD, 50µg ($n=80$) de vitD y placebo ($n=82$); mediante un análisis bioinformático utilizando los datos transcriptómicos a través de un método de convolución con el algoritmo CIBERSORT se determinó las frecuencias relativas.

Las células NK destruyen las células tumorales y las células infectadas por virus, la función de las células NK es reconocer y destruir por medio de inducir la apoptosis, para lo cual la célula NK realiza un reconocimiento a través de

receptores activadores de células NK (KAR) y receptores inhibidores de células NK (KIR), cuando las señales a través de receptores activadores es mayor que las señales recibidas por los receptores inhibidores, la célula NK activa sus funciones efectoras de muerte celular.

En nuestro estudio bioinformático encontramos que la frecuencia relativa de células NK en reposo (Figura 6A) y células NK activadas (Figura 6B) en individuos sanos, no presentan diferencia significativa entre los grupos evaluados antes y después de la suplementación de vitD ($p > 0.05$).

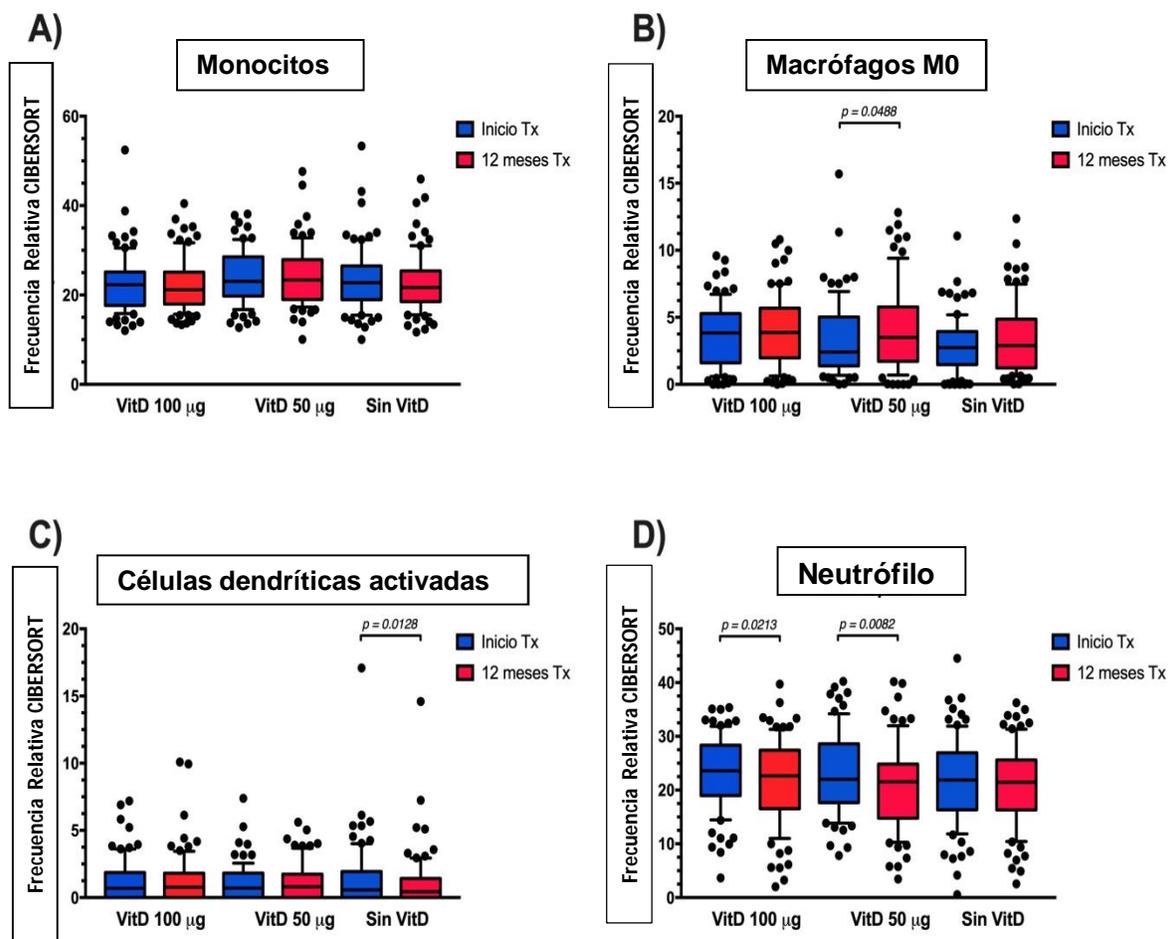


Figura 7. Frecuencia de células fagocíticas en voluntarios clínicamente sanos antes y después de la ingesta diaria de vitD mediante CIBERSORT. Monocitos (A), Macrófagos M0 (B), Células dendríticas activadas (C) y neutrófilos (D), en PBMC de sujetos sanos (n=248) antes y después de la ingesta de vitD. Los grupos de estudio se conformaron con una ingesta diaria de 100 µg (n=86) de vitD, 50µg (n=80) de vitD y placebo (n=82); mediante un análisis bioinformático utilizando los datos transcriptómicos a través de un método de convolución con el algoritmo CIBERSORT se determinó las frecuencias relativas.

La frecuencia de monocitos no mostró ninguna diferencia significativa entre los grupos estudiados ($p < 0.05$), ni al inicio y término de la ingesta de vitD durante los 12 meses de estudio ($p < 0.05$).

Los macrófagos participan en la fagocitosis de microorganismos y algunas células, eliminan cuerpos extraños, tienen actividad antitumoral, regulan la hematopoyesis, y se involucran en la presentación de antígenos para generar una respuesta inmunológica. Los macrófagos derivan de monocitos de sangre periférica, los cuales una vez que llegan a tejidos se diferencian en dos tipos: el grupo de macrófagos activados por la vía clásica (M1) que promueven la inflamación y el grupo de macrófagos activados por la vía alternativa (M2), que suprimen la inflamación y promueven la reparación de tejidos. Por lo tanto en PBMC no es posible encontrar macrófagos M1 o M2; sin embargo, se pudo detectar mediante CIBERSORT un fenotipo de macrófagos M0, que representa un estadio previo a convertirse en macrófagos M1 o M2. Nuestro análisis no mostró ningún cambio en la frecuencia de macrófagos M0 antes y después de 12 meses en el grupo placebo ni en el grupo que recibió la suplementación de niveles altos de vitD ($p > 0.05$). No obstante, se observó un incremento en la frecuencia de macrófagos M0 en el grupo que recibió una suplementación de 50µm de vitD ($p = 0.0488$).

Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno por su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de forma óptima a los linfocitos T, juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica. Nuestro estudio no mostró ningún cambio significativo después de la suplementación diaria de vitamina D en ambas dosis probadas, pero curiosamente se encontró que el grupo que recibió placebo se encontró una disminución de células dendríticas ($p = 0.0128$) después de 12 meses, fenómeno que no se observó cuando recibieron suplementación de vitD.

La función primordial de los neutrófilos es la defensa del huésped, a través de la fagocitosis, la generación de especies reactivas del oxígeno y la generación de trampas extracelulares del neutrófilo. En nuestro análisis encontramos que la frecuencia de neutrófilos en pacientes suplementados con vitD [100 μg y 50 μg] por un año, se observó diferencias significativas en ambas concentraciones de vitD ($p > 0.05$), mostrando una disminución de la frecuencia de neutrófilos después de los 12 meses de ingesta diaria de vitD en ambas dosis, estos hallazgos pudieran considerarse como una disminución en el estrés oxidativo por la disminución de los neutrófilos y el aumento de las células T reguladoras.

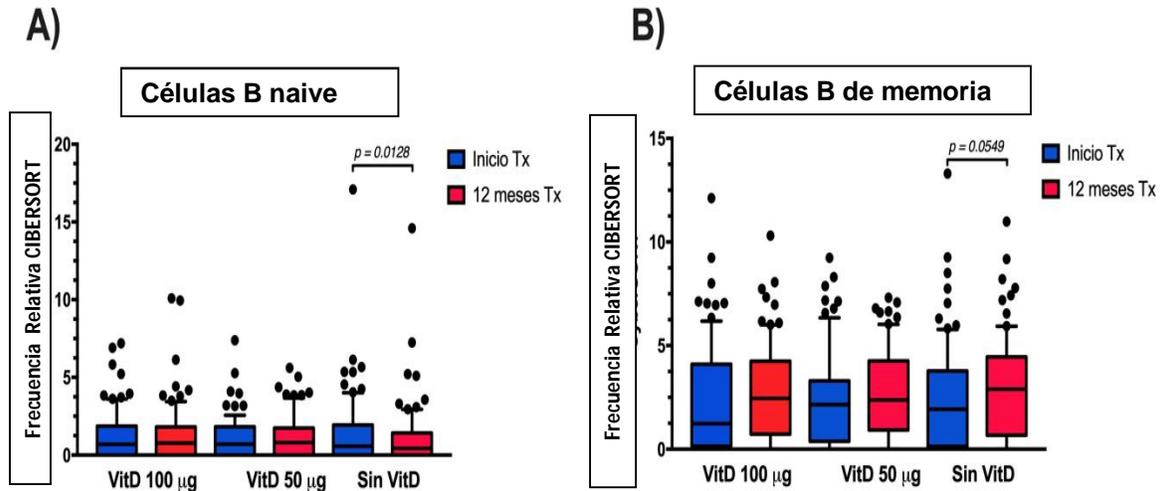


Figura 8. Frecuencia relativa de células B naive y B de memoria en voluntarios clínicamente sanos antes y después de la ingesta diaria de vitD mediante CIBERSORT. Se determinó la frecuencia de células B naive (A) y células B de memoria(B) en PBMC de sujetos sanos (n=248) antes y después de la ingesta de vitD. Los grupos de estudio se conformaron con una ingesta diaria de 100 µg (n=86) de vitD, 50µg (n=80) de vitD y placebo (n=82); mediante un análisis bioinformático utilizando los datos transcriptómicos a través de un método de convolución con el algoritmo CIBERSORT se determinó las frecuencias relativas.

Las células B se generan e inician su maduración en la médula ósea y terminan de madurar en el bazo, posteriormente migrar a los órganos linfoides secundarios por medio del torrente sanguíneo, donde si encuentran a su antígeno específico estas se activan y se diferencian a células productoras de anticuerpos o células plasmáticas. Algunos linfocitos B se convierten en una célula B de memoria. Las células plasmáticas no duran mucho en la circulación sanguínea a comparación de las células de memoria que si duran mucho tiempo. Las células B de memoria no secretan anticuerpos hasta que son activadas por un antígeno específico.

Nuestro estudio bioinformático no mostró ningún cambio significativo después de la suplementación diaria de vitamina D en ambas dosis probadas, pero interesantemente se encontró que el grupo que recibió placebo se encontró una disminución de células B naive ($p = 0.0128$) y un aumento de linfocitos B activados ($p = 0.0549$) después de 12 meses, fenómeno que no se observó cuando recibieron suplementación de vitD.

7. Conclusión.

Este trabajo bioinformático mostró que la ingesta diaria de vitD en una dosis de $100\mu\text{g}$ durante 12 meses aumenta la producción de células Treg, por lo que podría representar una respuesta inmunitaria contra patógenos más eficiente y prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes al mantener un estado de autotolerancia.

8. Perspectivas.

Los hallazgos encontrados utilizando los datos de acceso libre referentes a los microarreglos de expresión del estudio clínico de A.J. Berlanga-Taylor et al. [95] deberían ser validados de manera experimental, midiendo los niveles de vitD en suero y la frecuencia de células T reguladoras en sangre periférica en una cohorte de voluntarios clínicamente sanos.

9. Referencias Bibliográficas:

1. Goswami R, K.M., *Essential vitamins for an effective T cell response.* . World J Immuno, 2016: p. 6(1): 39-59
2. Baum, M.K., et al., *Association of vitamin B6 status with parameters of immune function in early HIV-1 infection.* J Acquir Immune Defic Syndr (1988), 1991. **4**(11): p. 1122-32.
3. Ha, C., L.T. Miller, and N.I. Kerkvliet, *The effect of vitamin B6 deficiency on cytotoxic immune responses of T cells, antibodies, and natural killer cells, and phagocytosis by macrophages.* Cell Immunol, 1984. **85**(2): p. 318-29.
4. Suaini, N.H., et al., *Immune Modulation by Vitamin D and Its Relevance to Food Allergy.* Nutrients, 2015. **7**(8): p. 6088-108.
5. Gil, A., J. Plaza-Diaz, and M.D. Mesa, *Vitamin D: Classic and Novel Actions.* Ann Nutr Metab, 2018. **72**(2): p. 87-95.
6. Pike, J.W. and M.B. Meyer, *Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt A**: p. 5-11.
7. Medrano, M., et al., *Vitamin D: Effect on Haematopoiesis and Immune System and Clinical Applications.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
8. Donald Voet, J.G.V., Charlotte W. Pratt., *Fundamentos de bioquímica.* 2a. Edición ed. 2007.
9. Valero Zanuya, F.H.C., *Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. Unidad de nutrición clínica. Unidad de metabolismo oseo. Servicio de endocrinología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid España.* . Elsevier 2007: p. 16(4):63-70.
10. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency.* N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 266-81.

11. Lamberg-Allardt, C., *Vitamin D in foods and as supplements*. Prog Biophys Mol Biol, 2006. **92**(1): p. 33-8.
12. Wacker, M. and M.F. Holick, *Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation*. Nutrients, 2013. **5**(1): p. 111-48.
13. Calvo, M.S. and S.J. Whiting, *Overview of the proceedings from Experimental Biology 2004 symposium: vitamin D insufficiency: a significant risk factor in chronic diseases and potential disease-specific biomarkers of vitamin D sufficiency*. J Nutr, 2005. **135**(2): p. 301-3.
14. Tripkovic, L., et al., *Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(6): p. 1357-64.
15. Wang, T.J., et al., *Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study*. Lancet, 2010. **376**(9736): p. 180-8.
16. Heaney, R.P., *Vitamin D--baseline status and effective dose*. N Engl J Med, 2012. **367**(1): p. 77-8.
17. Aranow, C., *Vitamin D and the immune system*. J Investig Med, 2011. **59**(6): p. 881-6.
18. Baeke, F., et al., *Vitamin D: modulator of the immune system*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(4): p. 482-96.
19. Rachez, C., et al., *The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2718-26.
20. Seth-Vollenweider, T., et al., *Novel mechanism of negative regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (Cyp24a1) Transcription: epigenetic modification involving cross-talk*

between protein-arginine methyltransferase 5 and the SWI/SNF complex. J Biol Chem, 2014. **289**(49): p. 33958-70.

21. Perissi, V., et al., *Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action.* Nat Rev Genet, 2010. **11**(2): p. 109-23.
22. Horlein, A.J., et al., *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.* Nature, 1995. **377**(6548): p. 397-404.
23. Haussler, M.R., et al., *Molecular mechanisms of vitamin D action.* Calcif Tissue Int, 2013. **92**(2): p. 77-98.
24. Becker, K.G., *The common genetic hypothesis of autoimmune/inflammatory disease.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001. **1**(5): p. 399-405.
25. Moroni, L., I. Bianchi, and A. Lleo, *Geoepidemiology, gender and autoimmune disease.* Autoimmun Rev, 2012. **11**(6-7): p. A386-92.
26. Zittermann, A., *Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?* Br J Nutr, 2003. **89**(5): p. 552-72.
27. Cantorna, M.T., et al., *Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system.* Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1717S-20S.
28. Penckofer, S., et al., *Vitamin D Supplementation Improves Mood in Women with Type 2 Diabetes.* J Diabetes Res, 2017. **2017**: p. 8232863.
29. Jagannath, V.A., et al., *Vitamin D for the management of multiple sclerosis.* Cochrane Database Syst Rev, 2018. **9**: p. CD008422.
30. Skare, T.L., et al., *Infections and systemic lupus erythematosus.* Einstein (Sao Paulo), 2016. **14**(1): p. 47-51.
31. Burge, K., et al., *Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).

32. Bock, G., et al., *The effect of vitamin D supplementation on peripheral regulatory T cells and beta cell function in healthy humans: a randomized controlled trial*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011. **27**(8): p. 942-5.
33. Antico, A., et al., *Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature*. *Autoimmun Rev*, 2012. **12**(2): p. 127-36.
34. Paludan, S.R., et al., *Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation*. *Nat Rev Immunol*, 2021. **21**(3): p. 137-150.
35. MBBS., A.K.A., *Inmunología básica. Funciones y trastornos del sistema inmunitario*. . 5ª Edición. ed. 2002.
36. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
37. Marshall, J.S., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2018. **14**(Suppl 2): p. 49.
38. Cyster, J.G. and C.D.C. Allen, *B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions*. *Cell*, 2019. **177**(3): p. 524-540.
39. Santana, M.A. and F. Esquivel-Guadarrama, *Cell biology of T cell activation and differentiation*. *Int Rev Cytol*, 2006. **250**: p. 217-74.
40. Alcover, A., B. Alarcon, and V. Di Bartolo, *Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation*. *Annu Rev Immunol*, 2018. **36**: p. 103-125.
41. Malissen, B., et al., *Integrative biology of T cell activation*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(9): p. 790-7.
42. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. *Science*, 1993. **260**(5107): p. 547-9.

43. Suzuki, Y., et al., *Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii*. Science, 1988. **240**(4851): p. 516-8.
44. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
45. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
46. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
47. Galon, J., et al., *IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7256-62.
48. Heikkinen, S., et al., *Nuclear hormone 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(21): p. 9181-93.
49. Rigby, W.F., T. Stacy, and M.W. Fanger, *Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol)*. J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1451-5.
50. Lemire, J.M., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro*. J Immunol, 1985. **134**(5): p. 3032-5.
51. van Etten, E. and C. Mathieu, *Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **97**(1-2): p. 93-101.
52. Muller, K. and K. Bendtzen, *Inhibition of human T lymphocyte proliferation and cytokine production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Differential effects on CD45RA+ and CD45R0+ cells*. Autoimmunity, 1992. **14**(1): p. 37-43.

53. Staeva-Vieira, T.P. and L.P. Freedman, *1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1181-9.
54. Mahon, B.D., et al., *The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells*. J Cell Biochem, 2003. **89**(5): p. 922-32.
55. Froicu, M., et al., *A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(12): p. 2386-92.
56. Cantorna, M.T., S. Yu, and D. Bruce, *The paradoxical effects of vitamin D on type 1 mediated immunity*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(6): p. 369-75.
57. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
58. Coffman, R.L., et al., *Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice*. Science, 1989. **245**(4915): p. 308-10.
59. Wynn, T.A., *IL-13 effector functions*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 425-56.
60. Zheng, W.P. and R.A. Flavell, *Pillars Article: The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells*. Cell. 1997. **89**: 587-596. J Immunol, 2016. **196**(11): p. 4426-35.
61. Ho, I.C., D. Lo, and L.H. Glimcher, *c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1859-66.
62. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.

63. Shimoda, K., et al., *Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 630-3.
64. Matheu, V., et al., *Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(3): p. 585-92.
65. Sloka, S., et al., *Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6-dependent mechanism*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 56.
66. Li, W., et al., *Identification of quantitative trait loci controlling high Calcium response in Arabidopsis thaliana*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112511.
67. Wu, X., J. Tian, and S. Wang, *Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1112.
68. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
69. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
70. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
71. Happel, K.I., et al., *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 761-9.
72. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.

73. Brustle, A., et al., *The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 958-66.
74. Chang, S.H., Y. Chung, and C. Dong, *Vitamin D suppresses Th17 cytokine production by inducing C/EBP homologous protein (CHOP) expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 38751-5.
75. Hamzaoui, A., et al., *Vitamin D reduces the differentiation and expansion of Th17 cells in young asthmatic children*. Immunobiology, 2014. **219**(11): p. 873-9.
76. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
77. DiPaolo, R.J., et al., *Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4685-93.
78. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler, *Inhibition of human CD4(+)/CD25(+high) regulatory T cell function*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6210-7.
79. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
80. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
81. Murai, M., et al., *Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1178-84.

82. Penna, G., et al., *Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. *Blood*, 2005. **106**(10): p. 3490-7.
83. Gorman, S., et al., *Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes*. *J Immunol*, 2007. **179**(9): p. 6273-83.
84. Jeffery, L.E., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3*. *J Immunol*, 2009. **183**(9): p. 5458-67.
85. Correale, J., M.C. Ysraelit, and M.I. Gaitan, *Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 5): p. 1146-60.
86. Prietl, B., et al., *Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases?* *Isr Med Assoc J*, 2010. **12**(3): p. 136-9.
87. Takeda, M., et al., *Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2495-503.
88. Smolders, J., et al., *Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6635.
89. Stohlman, S.A., et al., *Activation of regulatory cells suppresses experimental allergic encephalomyelitis via secretion of IL-10*. *J Immunol*, 1999. **163**(11): p. 6338-44.

90. Spach, K.M., et al., *IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6030-7.
91. Urry, Z., et al., *Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function*. J Clin Invest, 2009. **119**(2): p. 387-98.
92. Unger, W.W., et al., *Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1*. Eur J Immunol, 2009. **39**(11): p. 3147-59.
93. Barrat, F.J., et al., *In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 603-16.
94. Newman, A.M., et al., *Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles*. Nat Methods, 2015. **12**(5): p. 453-7.
95. Berlanga-Taylor, A.J., et al., *Genomic Response to Vitamin D Supplementation in the Setting of a Randomized, Placebo-Controlled Trial*. EBioMedicine, 2018. **31**: p. 133-142.

10. Bibliografía:

1. Roitt, I.-Brostoff, J. Male, D. *Immunology*, Mosby España, 6ª ed, 2001.
p.5-11, 44-60.
2. Rosen, F.- Geha, R., *Estudio de casos clínicos en inmunología*, Editorial Mason,
2000. p. 1-27
3. Altman, L. *Autoimmune Diseases, Immunology and allergy clinics of North
America* 1993. p 2-13 .
4. Colombie, F. *Respuesta inmune y patogenia, Microbiología Biomédica*, 1997. p
627-632.
5. Margni, R. A. *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos, Buenos Aires*, Ed.
Médica Panamericana 5ª Ed., 1996. p187-257
6. Regueiro-López, *Inmunología biológica y patológica*, Editorial Panamericana 2ª,
Ed. 1996. p30-50
7. A. Sanpedro, JR de los Toyos, A. Martínez-Nistal. *Técnicas de fluorescencia en
microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo 1995 : p.10- 29.
8. María Teresa Rugales López *"Inmunología ,una ciencia activa"*, 2a edición,
Editorial Universidad de Antioquia, 2019. p. 1-11, 26-54,238-260.