



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA  
CAPACIDAD BACTERICIDA DE LOS MONOCITOS  
DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G A**

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

**CLAUDIA IVETTE RIVAS ORTIZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA TERESA HERRERA BARRIOS  
2011**



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.

### Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Teléfono:</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Facultad:</p> <p>Carrera:</p> <p>Número de cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno</p> <p>Rivas</p> <p>Ortiz</p> <p>Claudia Ivette</p> <p>55 73 32 46</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Facultad de Ciencias</p> <p>Biología</p> <p>303263616</p>
<p>2. Datos del tutor</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>2. Datos del Tutor</p> <p>Dra.</p> <p>María Teresa</p> <p>Herrera</p> <p>Barrios</p>
<p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>3. Datos Sinodal 1</p> <p>Dr.</p> <p>Adolfo</p> <p>Andrade</p> <p>Cetto</p>
<p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>4. Datos Sinodal 2</p> <p>Dra.</p> <p>Martha</p> <p>Torres</p> <p>Rojas</p>
<p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>5. Datos Sinodal 3</p> <p>Dr. Joaquín Alejandro</p> <p>Zúñiga</p> <p>Ramos</p>
<p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>6. Datos Sinodal 4</p> <p>M. en C.</p> <p>Yolanda</p> <p>González</p> <p>Hernández</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito.</p> <p>Título:</p>  <p>Número de páginas:</p> <p>Año:</p>	<p>“EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE LOS MONOCITOS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”</p> <p>58 p</p> <p>2011</p>

## **AGRADECIMIENTOS:**

Mi primer agradecimiento es a Dios por haberme heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo “sus padres y hermanos”, la sabiduría y entendimiento para poder llegar al final de mi carrera, por llenar mi vida de personas maravillosas y por acompañarme siempre y guiar mis pasos.

A mis Padres, los señores Gerardo Rivas Morales y Alicia Ortiz de Rivas, gracias por sacrificar gran parte de su vida para educarnos, por el apoyo moral, cariño y comprensión que desde niña me han brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles para que yo lograra terminar mi carrera profesional siendo para mí la mejor herencia.

Gracias a mis hermanos: Jorge Alejandro, Gloria Alicia por su cariño y apoyo; Adriana por ser el ejemplo de una hermana mayor, por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr mis objetivos, sé que cuento con ella siempre y que juntas podemos alcanzar nuestras metas.

A ti Mamá María gracias por todo tu amor, por hacerme tu cómplice, por estar siempre conmigo; con todo mi cariño te dedico este logro, espero que desde el cielo lo disfrutes conmigo y te sientas orgullosa de mí. Siempre estarás en mi corazón.

A Papá Julio porque me sabe escuchar y me brinda sus conocimientos cuando los necesito, porque se ha ganado el cariño, la admiración y el respeto de todos los que tenemos la fortuna de conocerlo.

A la Sra. Rosa López porque gracias a su cariño, guía, confianza y el apoyo que depositó en mi, he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida.

A mis amigos que saben que fueron fundamentales para conseguir mi meta, puesto que sin su ayuda y apoyo no hubiera obtenido estos resultados; a ustedes mil gracias.

En especial quiero agradecer a mi tutora la Dra. María Teresa Herrera Barrios, por su paciencia, el apoyo que me brindó y su excelente guía para concluir este trabajo, por su tiempo y dedicación, muchas gracias.

A mis sinodales, quienes se tomaron el tiempo de revisar y corregir mi trabajo, brindándome sus comentarios, aportaciones y sugerencias.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron en la realización de esta investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Ciencias quien me permitió formar parte de su historia, a todas y cada una de las personas que forman parte de esta gran universidad muchas gracias.

Este proyecto se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” bajo la dirección de la Dra. María Teresa Herrera Barrios y con el financiamiento de SEP-CONACYT-101948

# ÍNDICE

	Página
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
1.1. Diabetes mellitus tipo 2 .....	3
1.2. Complicaciones de la diabetes .....	4
1.3. La diabetes mellitus en México .....	4
1.4. Diabetes mellitus tipo 2 y la inmunidad innata.....	5
1.5. Diabetes mellitus tipo 2 e infecciones .....	6
1.5.1. Mecanismos bactericidas de los monocitos-macrófagos .....	7
1.6. La vitamina D .....	8
1.6.1. Funciones y deficiencias de la vitamina D .....	8
1.6.2. Biosíntesis de la vitamina D en monocitos .....	9
1.6.3. La vitamina D y la inmunidad innata .....	12
1.7. Catelicidina LL-37 .....	13
1.7.1. Función antimicrobiana de la catelicidina LL-37 .....	14
<b>2. Justificación.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Materiales y métodos.....</b>	<b>19</b>
5.1. Grupos de estudio .....	19
5.2. Criterios de Inclusión.....	19
5.3. Toma de muestra de sangre periférica .....	20

5.4. Purificación de Monocitos .....	21
5.5. Preparación de la suspensión de la cepa H37Ra de <i>M. tuberculosis</i> .....	21
5.6. Efecto bactericida de los MN determinada por unidades formadoras de colonia (UFC).....	22
5.7. Efecto de la Vitamina D (1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ) sobre la capacidad de los MN determinada por unidades formadoras de colonia (UFC).....	22
5.8. Determinación de Oxido Nítrico en sobrenadantes de cultivo .....	23
5.9. Expresión del gen LL-37 por PCR en células mononucleares de sangre periférica .....	23
5.10. Purificación del RNA total por columna .....	24
5.11. Síntesis de DNA complementario por transcripción reversa .....	24
5.12. Amplificación de LL-37 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	25
5.13. Cinética de expresión de LL-37 inducida por la vitamina D por PCR-Tiempo Real .....	25
5.14. Análisis de la expresión de genes por PCR en Tiempo Real (Cuantificación relativa).....	26
5.15. Análisis estadístico .....	26
<b>6. Resultados .....</b>	<b>27</b>
<b>7. Discusión.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>43</b>
<b>10. Apéndice .....</b>	<b>47</b>

## ABREVIATURAS

DM2=Diabetes mellitus tipo 2

ADA=Asociación Americana de Diabetes

OMS=Organización Mundial de la Salud

GPA=Glicemia plasmática en ayunas

HbA1c=Hemoglobina glicosilada

MN=Monocitos

VIH=Virus de Inmunodeficiencia Humana

UFC=Unidades formadoras de colonia

*M. tuberculosis*=*Mycobacterium tuberculosis*

LL-37=Catelicidina LL-37

PCR=Reacción en Cadena de la Polimerasa

pb=Pares de bases

MPM=Marcador de peso molecular

DNA=Ácido Desoxiribonucleico

RNA=Ácido Ribonucleico

dNTP's=Desoxinucleótidos trifosfatados

MDM=Macrófagos derivados de monocitos

NOS2=Oxido nítrico sintetasa 2

NaNO<sub>2</sub>=Nitrito de sodio

CMSP=Células mononucleares de sangre periférica.

## RESUMEN.

**Introducción.** La diabetes mellitus es un desorden metabólico multifactorial caracterizado por hiperglucemia crónica. En México esta enfermedad afecta al 11% de la población adulta y ocupa el primer lugar en número de defunciones anuales.

Se ha demostrado que la deficiencia en vitamina D predispone a los individuos a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2), haciéndolos más susceptibles a la tuberculosis. Existen evidencias de que la forma activa de la vitamina D tiene efectos sobre la inmunidad innata al reducir el crecimiento de las micobacterias en los monocitos (MN) y macrófagos infectados, mediante la producción de la catelicidina LL-37 involucrada en la muerte de *M. tuberculosis*.

**Objetivo.** Estudiar el efecto de la forma activa de la vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) sobre la producción de LL-37, óxido nítrico y el control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en monocitos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

**Metodología.** Se analizaron MN de 15 pacientes con DM2 y 13 sujetos sanos, los MN se estimularon con diferentes concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y se analizó la expresión y la cinética de expresión de LL-37 por PCR en tiempo real, inducida por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . El control de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* cepa H37Ra en ausencia o presencia de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se realizó a D0, D1, D3 post-infección mediante la determinación de las unidades formadoras de colonias en MN de pacientes con DM2 y sujetos sanos. La inducción de especies reactivas como el óxido nítrico se evaluó por medio de la formación de nitrito de sodio en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

**Resultados.** La estimulación de los MN con la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mostró que la expresión de LL-37 es dosis-dependiente, observándose un aumento en la expresión de LL-37 en los MN de los pacientes. La expresión de LL-37 se inicia a las 4 horas y se incrementa a las 18 y teniendo su expresión máxima a las 24h. El control de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* cepa H37Ra por MN de los pacientes con DM2 se incrementó significativamente en presencia de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a los días 1 y 3, y esto puede estar relacionado con el aumento en la producción de LL-37.

**Conclusiones.** La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , favorece significativamente la control de crecimiento intracelular micobacteriano en los MN de los pacientes con DM2 y esto puede estar relacionado con el aumento en la producción de LL-37.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un aumento en la concentración de la glucosa sanguínea (hiperglucemia) y por alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, que es consecuencia de trastornos en la secreción y/o en la acción de la insulina (1).

Los criterios para el diagnóstico de la enfermedad se basan en síntomas clínicos como son excreción excesiva de orina, sed, hambre constante, pérdida de peso y cansancio, que pueden aparecer de forma súbita (2), esta sintomatología es apoyada por análisis de laboratorio donde la determinación de los niveles mayores a 126 mg/dl de glucosa plasmática en ayuno de 8 horas (3), y mayores de 6% de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) se asocian con la diabetes (4).

### **1.1. Diabetes mellitus tipo 2.**

La prevalencia de la diabetes mellitus aumenta anualmente en todo el mundo y en la actualidad afecta a más de 285 millones de personas y se espera que alcance los 438 millones en 2030 (5).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es el tipo de diabetes más frecuente afectando al 90-95% de los pacientes diabéticos y se asocia con la obesidad (6).

La DM2 se caracteriza por un complejo mecanismo fisiopatológico, cuyo rasgo principal es la pérdida relativa de producción y/o resistencia a la insulina, esto quiere decir que los receptores de insulina que son los que facilitan la entrada de la glucosa a la célula están dañados por factores que interfieren su acción fisiológica (7).

Los pacientes con DM2 no dependen de la administración de insulina exógena, pero podrían necesitarla para controlar la hiperglucemia, si no lo consiguen con una dieta, ejercicio y agentes hipoglucemiantes orales (5).

Con frecuencia el diagnóstico se hace a partir de los 40 años, ya que la enfermedad puede pasar desapercibida durante muchos años y el diagnóstico se establece cuando empiezan a aparecer las complicaciones (2), aunque podría darse antes, especialmente en poblaciones con una alta prevalencia de DM2 (5). Hace poco tiempo, este tipo de diabetes

sólo se observaba en adultos, sin embargo, en la actualidad también se están presentando casos en niños entre 10-14 años (8) quizá como resultado de los hábitos alimenticios y sedentarismo (2).

El aumento de la prevalencia de la DM2 va asociado a diferentes factores como son los antecedentes familiares, el envejecimiento de la población, la dieta y la disminución de la actividad física (2).

## **1.2. Complicaciones de la diabetes.**

La DM2 es la primera causa de ceguera y causa el 35% de casos nuevos de insuficiencia renal crónica (5).

En el sistema inmune la enfermedad produce inmunosupresión y susceptibilidad a las infecciones; por otro lado, es la sexta causa de enfermedad periodontal con periodontitis y gingivitis con pérdida de dientes (9), de la misma forma puede producir disminución de la movilidad de las articulaciones y provocar el 50% de amputaciones no traumáticas de los miembros inferiores (6).

La DM2 puede ocasionar complicaciones agudas como; la hipoglicemia y el Síndrome hiperglicémico hiperosmolar no cetósico (10). El 80% de los pacientes DM tiene de dos a cuatro veces más riesgo de muerte por complicaciones crónicas como: las macrovasculares (Enfermedad Cardiovascular Coronaria como Infarto al miocardio siendo la principal causa de mortalidad de los diabéticos, el Evento Vascular cerebral y la Enfermedad vascular arterial periférica) o microvasculares (Nefropatía, la Retinopatía y la Neuropatía) (5).

## **1.3. La diabetes mellitus en México.**

En el 2010 el número de defunciones asociadas a DM fue del 14% (72, 449), donde el 52.2% ocurrieron en mujeres y el 47.8% en hombres (11). De acuerdo a los datos de la Secretaría de Salud del 17 de marzo de 2011, esta enfermedad ocupa el primer lugar en número de defunciones por año en adultos (11-12).

La Federación Mexicana de Diabetes en el 2010 presentó estadísticas alarmantes, donde se estima que entre 6.5 - 10 millones (11%) de mexicanos en edad adulta tiene DM, y se ha considerado que 2 millones de personas aún no han sido diagnosticadas (13).

La Federación Internacional de Diabetes ha reportado que México ocupa el décimo lugar de diabetes en el mundo y se estima que para el 2030 ocupará el séptimo lugar (5).

#### **1.4. Diabetes mellitus tipo 2 y la inmunidad innata.**

Estudios en modelos de diabetes en ratones y ratas diabéticas no obesos han mostrado que existe la producción de altos niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) (14), receptor de IL-6 (IL-6R) y la proteína C-reactiva causando un proceso inflamatorio crónico (15).

En la membrana celular existen receptores denominados TLRs (Toll-like receptors), que juegan un papel importante en la destrucción de los microorganismos ya que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y están asociados al desarrollo de una respuesta inflamatoria. Dentro de estos receptores se encuentran TLR2 y TLR4, los resultados son contradictorios, debido a que en una investigación realizada en los MN de los pacientes con DM2 se ha demostrado un aumento basal que se incrementa después de la estimulación con su ligando específico (Pam3CSK4, lipopolisacárido respectivamente) y es asociado con el aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que la hiperglucemia contribuye a un estado inflamatorio durante la enfermedad (16). Mientras que en otro estudio, se ha demostrado que no hay diferencia en los niveles de expresión basal de TLR2, TLR4 y citocinas pro-inflamatorias entre los MN de pacientes con DM2 y sujetos sanos, sin embargo, después de la estimulación con ligandos específicos de los receptores en los pacientes su expresión está disminuida al igual que la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (17). Estos resultados muestran que la funcionalidad de los MN de pacientes con diabetes está alterada por el estado de hiperglucemia, lo que podría contribuir a la deficiencia en la respuesta inmune durante la enfermedad.

Además, estudios en pacientes con DM demuestran que hay defectos en la inmunidad innata tales como: la disminución de la fagocitosis (17), opsonización y

actividad bactericida de los MN y macrófagos, asociado con la hiperglucemia donde la glucosa se une a C3b e inhibe la opsonización, también se ha observado que existe una disminución de C3b en pacientes con DM (14, 18).

En un modelo *in vitro* (19) y en pacientes (20) con diabetes se demostró que la hiperglucemia reduce la capacidad de unión de la fracción Fc de la IgG, y la fijación del complemento, lo que pone en evidencia los cambios producidos durante la enfermedad que afecta directamente en la inmunidad innata.

Sugiriendo el papel de la hiperglucemia en la alteración de la respuesta inmune causante del incremento de la susceptibilidad a infecciones extracelulares por bacterias gram positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococo pyogenes*  $\beta$ -hemolítico, *Clostridium spp*), gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Haemoplilus influenzae*, *Escherichia coli*), hongos (*Candida spp*) y por el virus de la influenza (21).

### **1.5. Diabetes mellitus tipo 2 e infecciones.**

Se ha observado que en los pacientes diabéticos con hiperglucemia y niveles >7% de hemoglobina glicosilada (HbA1c) se aumenta el riesgo de infecciones debido a las alteraciones en los mecanismos de defensa de las células como: menor capacidad de quimiotaxis, fagocitosis, niveles bajos de inmunoglobulinas (IgG e IgA) y del complemento (22). En pacientes con DM con niveles de 350-450mg/dl de glucosa alteran la actividad bactericida asociada a la producción de óxido nítrico lo que puede estar asociado a la susceptibilidad a las infecciones causadas por diversos patógenos tales como virus, hongos y bacterias (23).

Los pacientes con DM tienen una probabilidad tres veces mayor de infectarse con *Mycobacterium tuberculosis*, desarrollar la tuberculosis y de fallecer por esta enfermedad (14, 24-25). *M. tuberculosis* es un bacilo intracelular con una pared gruesa con alto contenido de lípidos, ácido-alcohol-resistente, aerobia y gram positiva.

En su informe el Dr. Martín Castellanos Joya, Director de Micobacteriosis del Programa de Prevención y Control de Tuberculosis del Centro Nacional de Vigilancia

Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE), señaló que el 20% (4,016) de pacientes con tuberculosis tienen diabetes (26).

### **1.5.1. Mecanismos bactericidas de los monocitos-macrófagos.**

Los MN son generados en la medula ósea y del torrente sanguíneo migran a diferentes sitios donde se diferencian a macrófagos locales. Una función importante de los MN y macrófagos es la de fagocitar a diferentes microorganismos, restos celulares o partículas. Este proceso es mediado por diferentes receptores como son los receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4), receptores Fc de inmunoglobulina G (FcγRs), receptores para manosas, receptor para glúcidos y receptores scavenger (27).

Además estas células producen sustancias bactericidas involucradas en la eliminación de los patógenos como son la lisozima y óxido nítrico, este último sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), cuya importancia en el control inmunológico se ha demostrado en ratones infectados con *M. tuberculosis* (28-30).

En la tuberculosis los MN y los macrófagos juegan un papel muy importante ya que son los encargados de fagocitar a las micobacterias. Los macrófagos alveolares, constituyen la primera línea de defensa en el sitio de infección; después de la fagocitosis regulan la respuesta inmune durante la infección a través de la producción de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12), proteasas (serina-proteasas, cisteína-proteasas, metalo-proteasas y aspartato-proteasas) y factores del complemento que junto con los anticuerpos producidos por los linfocitos B que pueden favorecer la opsonización para luego ser reconocidos por los receptores del macrófago.

Además de participar en la inmunidad innata una de las funciones importantes de los macrófagos es presentar antígenos y por lo tanto ser parte del inicio de la inmunidad adquirida.

Por otro lado actúan como células efectoras y reguladoras, produciendo citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12) y anti-inflamatorias (IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ ), y quimiocinas (CXC (IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , ENA-78, GCP-2), y CC (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES), C y CX3C) presentando antígenos, activando y estimulando la diferenciación de linfocitos T (28).

En macrófagos humanos la activación de TLR2/1 en presencia de vitamina D induce la expresión del receptor de la vitamina D (VDR), la 1 $\alpha$ -hidroxilasa mitocondrial (CYP27B1), lo que conduce a la inducción del péptido antimicrobiano catelicidina LL-37 asociado con el control del crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*. Además se ha demostrado que las poblaciones afro-americanas son más susceptibles a la tuberculosis por los bajos niveles de vitamina D en suero y por lo tanto hay menor expresión de catelicidina (31). Lo que apoya la relación entre los TLR y la inmunidad innata mediada por la vitamina D.

## **1.6. La vitamina D.**

La vitamina D es liposoluble derivada de esteroides; la exposición solar es la principal fuente de vitamina D en el organismo ya que se puede sintetizar hasta el 90% (32). La conversión fotoquímica inducida de 7-dehidrocolesterol (33) lo transforma en previtamina D<sub>3</sub> en la piel, por exposición a los rayos ultravioleta en un proceso dependiente de la temperatura (34-35). Sólo el 10% de la vitamina D se obtiene de la dieta, ya que son pocos los alimentos que la contienen de forma natural, por ejemplo los pescados grasos como el salmón, atún, sardinas, el aceite de hígado de bacalao, otros como las ostras, el hígado, la manteca, leche, la yema de huevo y los vegetales verdes (36-37).

Cualquiera que sea la fuente de la vitamina D, debe ser hidroxilada dos veces para producir la forma biológicamente activa de la vitamina D (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), con una vida media de 6 a 10 horas en circulación (38).

### **1.6.1. Funciones y deficiencias de la vitamina D.**

La ingesta de la vitamina D es importante para el organismo ya que aumenta la absorción intestinal de calcio y fósforo ingerido y mejora la reabsorción de calcio por el riñón, dando lugar al aumento de estos minerales en el plasma (34).

Las principales acciones biológicas de esta vitamina incluyen el suministro de fósforo y calcio, necesario para la contracción muscular y la regulación de la remodelación

ósea (34) además se ha demostrado que juega un papel importante en la respuesta inmune innata y adquirida (39).

La deficiencia de vitamina D puede causar raquitismo caracterizada por la deformación ósea durante el desarrollo, mientras que en adultos, puede causar osteomalacia que es el reblandecimiento de los huesos y el metabolismo muscular alterado debido al deterioro en el balance de calcio (38).

Diferentes estudios han demostrado que la deficiencia de vitamina D es un riesgo para la intolerancia a la glucosa, ya que se han encontrado concentraciones bajas ( menores de 20ng/ml (50nmol/l) de vitamina D en suero de pacientes con DM2 y se ha observado mayor prevalencia en las mujeres con DM2 por lo que estos pacientes corren un mayor riesgo de resistencia a la insulina, disminuyendo la producción de insulina y una asociación con el síndrome metabólico (37, 40-41), lo que sugiere que la vitamina D puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la DM2, ya que afecta la sensibilidad a la insulina o la función de las células  $\beta$  pancreáticas.

### **1.6.2. Biosíntesis de la vitamina D en monocitos.**

La vitamina D se encuentra en el suero en su forma inactiva (25(OH) D<sub>3</sub>), la cual, es transportada por una proteína de unión a vitamina D (DBP) a los MN/macrófagos y entra a la célula.

En la superficie de los monocitos se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs) que sirven de sensores de patógenos a través del reconocimiento de los patrones de moléculas asociado a patógenos (PAMPs) como es el caso de TLR2 en la infección con *M. tuberculosis*.

La activación de estos receptores promueve la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que induce la expresión de los genes dentro de los que se encuentra el que codifica a la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa mitocondrial (CYP27B1) quien hidroxila la 25(OH) D<sub>3</sub> en el carbono 1 convirtiéndola en su forma activa (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), y además estimula la síntesis del receptor de vitamina D (VDR) (42).

La vitamina D activa interacciona con el VDR citoplasmático y con el receptor de retinoides (RXR), este complejo se trasloca al núcleo donde se unen a secuencias de DNA,

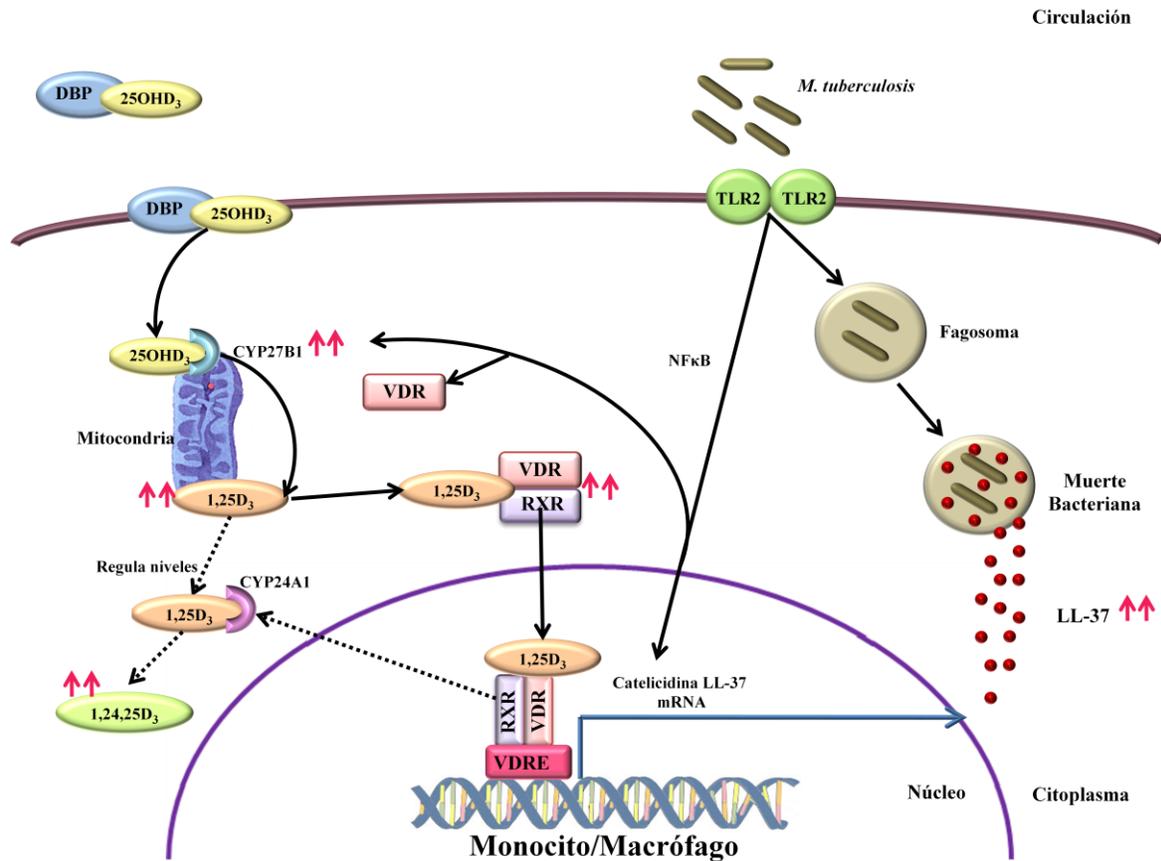
llamadas elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), en las regiones promotoras de los genes que regulan la expresión de moléculas involucrados en la respuesta inmune innata como: la proteína de cubierta que contiene aspartato y triptófano (TACO), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), aumenta los receptores involucrados en la fagocitosis (TLRs, Fc de IgG (Fc $\gamma$ RI, RII RIII), receptores del complemento (CR3) y la expresión de péptidos antimicrobianos como:  $\beta$ -defensinas y LL-37, los cuales, participan en la eliminación intracelular de la micobacteria (31, 35, 39, 43-44).

El complejo formado por la 1,25(OH) $_2$  D $_3$ -VDR-RXR también promueve la síntesis de la enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1) que autorregula la producción de la forma activa de la vitamina D, normalizando los niveles de la 1,25(OH) $_2$  D $_3$  a través de una hidroxilación en el carbono 24 formando la 24-dihidroxitamina D (24(OH) D $_3$ ), y cuya acción inmunológica aún no ha sido descrita (39, 43-44). (Figura 1)

Diferentes estudios han confirmado la capacidad de la 1,25(OH) $_2$  D $_3$  para inducir la expresión del péptido antimicrobiano catelicidina LL-37 en líneas celulares mieloides (45), células epiteliales (46) y queratinocitos (47).

La deficiencia de la vitamina D y la susceptibilidad a la tuberculosis se han estudiado por más de 20 años demostrando que bajos niveles de la vitamina predisponen a las personas a las infecciones (48-51) y al desarrollo DM2 en un estudio longitudinal en mujeres se observó que al aumentar la concentración de vitamina D por suplemento de esta en la dieta disminuye el riesgo de desarrollar DM2 (52) de igual forma en un estudio realizado en adultos australianos se demostró que el aumento en las concentraciones de vitamina D en suero se asocia con un menor riesgo de desarrollar DM2 (53).

Lo que apoya el efecto protector de la vitamina D y es de gran interés estudiar la estimulación de la inmunidad innata incrementando la capacidad de los MN para destruir a la micobacteria por la producción de péptidos antimicrobianos como son las catelicidinas LL-37 inducidos por la vitamina D.



Elaborado a partir de: White 2008, Adams 2008, Gombart 2009 y Jo 2010

**Figura 1. Activación de los monocitos por la vitamina D.** La vitamina D activa es dependiente de la activación de los receptores tipo Toll (TLRs) para la inducción de la expresión de LL-37. Este modelo propone que la interacción de *M. tuberculosis* con TLR2, inicia una vía de señalización que activa el factor de transcripción NF-κβ que induce la expresión del gen del receptor de vitamina D (VDR) y la 1α-hidroxilasa mitocondrial (CYP27B1). Esto conduce a la hidroxilación de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>), que ha sido transportada desde la circulación en un complejo con la proteína de unión a vitamina D (DBP) y una vez activada la 1,25-dihidroxivitamina D (1,25D<sub>3</sub>) se une al VDR y al receptor de retinoides (RXR), que entran al núcleo donde se unen a los elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), en las regiones promotoras, el gen de la catelicidina LL-37 es activado y la proteína sintetizada, se dirige al fagosoma que contiene *M. tuberculosis* donde se une a la pared lipídica haciendo poros y provocándole la muerte. También se induce la expresión de la enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1) que regula los niveles de la 1,25D<sub>3</sub> en el citoplasma de la célula.

### 1.6.3. La vitamina D y la inmunidad innata.

La primera línea de defensa frente a los agentes infecciosos, es la respuesta inmune innata, pues reconoce rápidamente a los patógenos y desarrolla una respuesta antimicrobiana.

En los últimos años, se ha demostrado que el sistema inmune responde a los niveles circulantes de 25(OH) D<sub>3</sub>, siendo la forma biológicamente inactiva que se encuentra principalmente en la circulación con una vida media de 19 días (43). Liu y sus colegas encontraron que la señalización a través de TLR1/2 estimulados con lipopolisacárido (LPS) induce la expresión de CYP27B1 y el VDR en macrófagos humanos (31, 35).

Diferentes estudios han mostrado que la vitamina D no tiene ninguna acción antimicrobiana directa sobre la micobacteria (50-51), pero su metabolito activo modula la respuesta inmune innata contra *Mycobacterium tuberculosis* al inducir la producción de péptidos antimicrobianos como β-defensinas (54), LL-37 y la expresión de la iNOS que es la enzima involucrada en la producción de óxido nítrico (39, 43).

Estudios *in vitro* en MN de sujetos sanos (50-51) y la línea de monocitos humanos (THP-1) (55) infectadas con *M. tuberculosis* han puesto en evidencia que la vitamina D tiene un papel importante en la actividad antimicobacteriana, ya que el tratamiento con la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-forma activa) reduce las unidades formadoras de colonias asociado con el aumento en la expresión y producción del péptido antimicrobiano LL-37. En estos estudios se demostró que el tratamiento con la vitamina D causa un aumento en la expresión del RNA mensajero y producción LL-37 determinada por citometría de flujo. Además su efecto antimicobacteriano fue corroborado con RNA de interferencia y por la adición de diferentes concentraciones del péptido antimicrobiano LL-37 (39, 43, 54-55).

Además se ha detectado al receptor citoplasmático de vitamina D (VDR) en neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (39) y la expresión de LL-37 en líneas celulares mieloides (45), células epiteliales (46) y queratinocitos (47) tratadas con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Se conocen múltiples acciones de la vitamina D, sobre la inmunidad innata tales como: a) la producción de péptidos antimicrobianos como defensinas y catelicidina en MN, neutrófilos, células NK y células epiteliales (31, 39, 43), b) inducir la diferenciación de los

MN en macrófagos y c) la óxido nítrico sintasa involucrada en la producción de óxido nítrico (55).

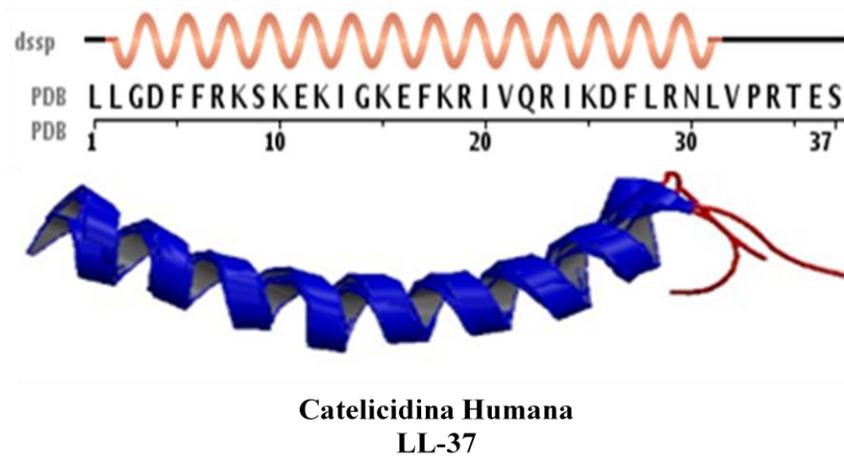
### **1.7.Catelicidina LL-37.**

Las catelicidinas son una familia de péptidos antimicrobianos que se expresan en leucocitos, MN (50), macrófagos (51), células epiteliales de mamíferos y otros vertebrados (56) jugando un papel importante en la inmunidad innata.

La catelicidina humana LL-37 originalmente fue caracterizada en neutrófilos y proviene de una molécula precursora de 18kDa llamada hCAP-18 (human catelicidin antimicrobial peptides 18kDa) que es procesada por la serina-proteasas generando el péptido activo C-terminal llamado LL-37 por tener 2 leucinas y 35 aminoácidos de longitud (57-59). (Figura 2) (60).

La LL-37 existe constitutivamente en los gránulos de los neutrófilos y es secretada por células epiteliales, MN, linfocitos T y células cebadas cuando los TLRs reconocen a PAMPs (54, 61).

En diferentes estudios se ha demostrado que los MN tratados con vitamina D  $25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  inducen la expresión del gen LL-37 (35, 39, 43-44). Evidenciando que la vitamina D contribuye con la protección contra la tuberculosis mediante la inducción de LL-37. Ya que se ha demostrado que existe una correlación entre la producción de LL-37 y el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *M. tuberculosis*. El mecanismo de acción de LL-37 es la de unirse a la pared lipídica de la micobacteria causando la formación de poros y finalmente la muerte (42, 50-51, 62).



**Figura 2.** Secuencia y estructura de la catelicidina LL-37. (Fuente: PDB- Protein data bank).

### 1.7.1. Función antimicrobiana de la catelicidina LL-37.

La principal función de la catelicidina LL-37 es la de ser un bactericida de amplio espectro que inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas, hongos, parásitos y algunos virus (63).

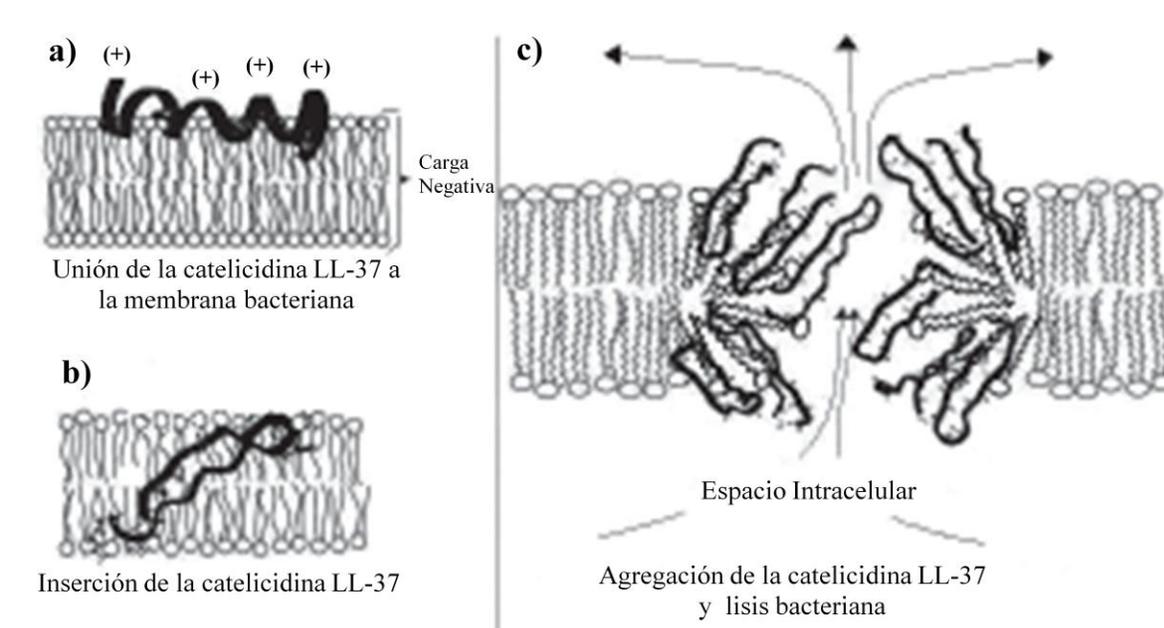
El efecto antimicrobiano de la catelicidina LL-37, es la de actuar sobre la membrana de los patógenos formando poros que llevan a la lisis del microorganismo. La LL-37 llega a la membrana externa en forma de oligómeros de diferentes tamaños, que se disocian en monómeros y recubren la membrana e interactúan con los fosfolípidos con carga negativa causando la formación de poros en la membrana lo que conlleva a la muerte del microorganismo (59, 61). (Figura 3)

Se ha demostrado la expresión de LL-37, en células como neutrófilos, células asesinas naturales, MN, macrófagos alveolares, macrófagos derivados de monocitos y en células A549 infectadas con *M. bovis* (64) o *M. tuberculosis* (55) sugiriendo un papel importante de LL-37 en la respuesta contra *M. tuberculosis*.

En la década de los ochentas se hicieron una serie de experimentos *in vitro* analizando el papel de la vitamina D y su efecto sobre la actividad antimicobacteriana de los MN, basándose en observaciones como fueron la exposición solar y el consumo de aceite de hígado de bacalao como tratamiento contra la tuberculosis (48-51).

Estudios de Liu y col. (31) indican que tras una infección por *M. tuberculosis* y la activación del TLR2/1, los MN y macrófagos (62) sintetizan simultáneamente VDR, y CYP27B1, la enzima que hidroxila la 25(OH) D<sub>3</sub> convirtiéndola en su forma biológicamente activa (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) y promueve la expresión del gen del LL-37, que se sintetiza y migra a los fagosomas que contienen a *M. tuberculosis* causando su muerte. Además, la eficacia de LL-37 aumenta al incubar las células con Vitamina D (58, 65).

Por todo lo anterior, es de gran interés estudiar el efecto de la vitamina D sobre la capacidad bactericida de los MN de los pacientes con DM2 quienes son más susceptibles a las infecciones por *M. tuberculosis*, pues esto aún no ha sido explorado.



Modificado de Rivas-Santiago, 2006

**Figura 3. Efecto antimicrobiano de la catelicidina LL-37.** La catelicidina LL-37 se une a los fosfolípidos con carga negativa de la membrana bacteriana, cubriendo su superficie, causando la formación de poros, y finalmente se lleva a cabo la lisis celular por choque osmótico.

## 2. JUSTIFICACIÓN.

La diabetes mellitus es un problema de salud pública en México ya que cerca de 6.5-10 millones de mexicanos adultos tienen diabetes mellitus tipo 2 y 2 millones aún no han sido diagnosticados.

Existen reportes que han demostrado que los niveles bajos de vitamina D predispone al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, por otra parte, se ha encontrado que son pacientes con más susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis* mostrando que tienen de 1.8 a 8 veces mayor riesgo de desarrollar tuberculosis.

En México el 20% de los pacientes con tuberculosis tienen diabetes, sin embargo, poco se sabe sobre la alteración de la respuesta inmune en estos pacientes.

La vitamina D juega un papel importante al reducir el crecimiento de *M. tuberculosis* en MN de sujetos sanos, mediante la inducción de péptidos antimicrobianos como la catelicidina LL-37. Sin embargo, se desconoce el efecto de la vitamina D en el control intracelular de *M. tuberculosis* en MN de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

### 3. HIPÓTESIS

La administración *in vitro* de la vitamina D induce la producción del péptido antimicrobiano LL-37 favoreciendo el control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en los MN de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

#### **4. OBJETIVOS.**

##### **Objetivo general**

Estudiar el efecto de la forma activa de la vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ) sobre la producción de LL-37, óxido nítrico y el control de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en monocitos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

##### **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el efecto de la forma activa de la vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ) sobre la expresión del gen LL-37 en los monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos por la técnica del PCR.
- 2) Estudiar el efecto de ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ) sobre el control de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en monocitos infectados de pacientes con DM2 y sujetos sanos por la técnica de la cuenta de unidades formadoras de colonias.
- 3) Evaluar el efecto de ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ) sobre la producción de óxido nítrico en cultivos de MN infectados con *M. tuberculosis*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

Este protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Se estudiaron pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y sujetos sanos que fueron reclutados en la Clínica del Síndrome Metabólico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Todos los participantes expresaron su consentimiento voluntario de forma escrita.

### **5.1. Grupos de estudio**

**Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2):** Se incluyeron 15 pacientes con el diagnóstico DM2. Sin evidencias clínicas de tuberculosis, ni proceso infeccioso aparente o enfermedad inflamatoria crónica y serología negativa de VIH.

**Sujetos sanos (Sanos):** Se incluyeron 13 sujetos clínicamente sanos y serología negativa de VIH.

### **5.2. Criterios de inclusión**

A todos los participantes en este estudio se les explicó en forma clara los objetivos del estudio, se les solicitó su participación voluntaria por escrito, y firmaron la carta de consentimiento y fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión.

#### **Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2).**

Se incluyeron hombres y mujeres con rango de edad de 18-65 años con el diagnóstico de DM2 según los criterios de la ADA (Asociación Americana de Diabetes) con síntomas como excreción excesiva de orina, sed y pérdida de peso. Con glucosa plasmática en ayuno (mínimo 8 horas) igual o mayor a 126mg/dl y con hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayor a 6%.

Un parámetro importante de inclusión fue no presentar algún proceso infeccioso aparente o enfermedad inflamatoria crónica.

#### **Voluntarios sanos.**

Se incluyeron hombres y mujeres sanos con rango de edad de 18-65 años. Con HbA1c menor a 6% y glucosa sanguínea menor de 100mg/dl y con serología negativa para el VIH.

#### **Criterios de exclusión.**

Los pacientes con DM2 con enfermedad inflamatoria o infecciosa asociada aparente, y además presentar complicaciones avanzadas. También se excluyeron voluntarios (DM2 y sanos) con serología positiva para el VIH, femeninos con embarazo, o bien, que no proporcionaron su consentimiento firmado.

#### **5.3. Toma de muestra de sangre periférica.**

Se tomó una muestra de sangre venosa, desinfectando previamente el área con un algodón humedecido con alcohol y se introdujo la aguja del equipo alado con Safety-Lok (Vacutainer). Se tomaron 5 ml de sangre en tubo sin anticoagulante y posteriormente se tomaron 60 ml de sangre en una jeringa con heparina (5,000 UI/ml).

#### **Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).**

A partir de los 60ml de sangre con anticoagulante (heparina) se separaron las células mononucleares por centrifugación en un gradiente de densidad. Brevemente, en tubos de 50ml (Falcon), se mezclaron 20ml de medio suplementado (RPMI 1640 con 2mM de L-glutamina, Hyclone) con 20ml de sangre. Se agregaron 10ml de Ficoll-hypaque (densidad 1.077g/ml) (BIO Whittaker) para formar el gradiente. Los tubos se centrifugaron a 1200rpm a temperatura ambiente por 45min, y posteriormente la interfase (células mononucleares) se transfirió a otro tubo y para eliminar el Ficoll-hypaque las células se lavaron, con medio RPMI suplementado y se centrifugando a 1200rpm a 4°C por 15 minutos. Al finalizar los lavados, el paquete celular se resuspendió en medio completo (medio suplementado con 10% de una mezcla de suero humano descomplementado) y se

contaron las células en una cámara de Neubauer. Se determinó la viabilidad de las células por exclusión de azul de tripano (Gibco) que fue del 100%.

#### **5.4. Purificación de Monocitos (MN).**

A partir de las células mononucleares previamente aisladas se purificaron los MN por selección positiva con el sistema de MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) utilizando microperlas magnéticas conjugadas con alta especificidad al anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano (isotipo: IgG2a de ratón). Brevemente,  $10^7$  células mononucleares se resuspendieron en 80µl de buffer de Miltenyi (PBS -0.5%BSA-EDTA) y se agregaron 20µl del anticuerpo anti-CD14 acoplado a una microperla se mezcló en vórtex y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Para eliminar el anticuerpo libre se adicionó 1-2ml de buffer de Miltenyi centrifugando 5 minutos a 2000rpm a 4°C. Las células se resuspendieron en el buffer de Miltenyi (0.5-1ml), y se pasaron por una columna LS MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) pre-humedecida colocada en un soporte magnético. En un tubo se recuperaron las poblaciones de células CD14<sup>-</sup> negativas que son eluidas durante los lavados con buffer de Miltenyi, mientras que las células CD14<sup>+</sup> son retenidas en la columna. Posteriormente, la columna fue removida del soporte magnético y la fracción de células CD14 positivas se eluyó de la columna. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio completo. Se contaron los MN purificados y se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripano. Y se ajustaron los MN (CD14<sup>+</sup>) a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml con medio completo.

#### **5.5. Preparación de la suspensión de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*.**

Para cada experimento se descongeló un vial de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (ATCC 25117; American Type Culture Collection Manassas, VA) almacenada a -70°C, se mezcló en el vórtex y centrifugó a 8,000rpm por 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la micobacteria se resuspendió en 1ml de medio completo (RPMI 1640 con 2mM de L-glutamina y 10% de suero humano descomplementado). La micobacteria se disgregó pasando la masa bacteriana a través de una aguja de 21Gx32mm durante 10 veces y posteriormente 10 veces en aguja de 27Gx13mm, seguido de sonicación por 1 minuto a 80 ciclos (Sonicador Ultrasonic Processor) a temperatura ambiente, inmediatamente después

se centrifugó a 800 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante libre de cúmulos micobacterianos se transfirió a otro tubo de 1.6 ml estéril. De esta suspensión bacteriana a concentración de  $1 \times 10^9$  y se hizo una dilución (1:10) para tenerla a una concentración  $1 \times 10^8$ , la cual se utilizó para infectar a los MN.

#### **5.6. Efecto bactericida de los MN determinada por unidades formadoras de colonia (UFC).**

Se ajustaron los MN (CD14<sup>+</sup>) purificados a  $1 \times 10^6$ /ml con medio completo, y en una placa de cultivo de 96 pozos fondo plano (Costar) se colocaron  $1 \times 10^5$  MN por pozo y se dejaron adherir 1 hora a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>; posteriormente los MN fueron infectados durante una hora con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* en proporción de 10 bacterias por célula (10:1). Para eliminar las micobacterias no fagocitadas, los MN se lavaron tres veces con PBS estéril a temperatura ambiente y finalmente se agregaron 200µl por pozo de medio completo y los MN infectados se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> a diferentes tiempos de la cinética de estudio: D0 (1 hora), D1 (24 horas) y D3 (72 horas), haciendo triplicados para cada tiempo.

Para cada tiempo de la cinética se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para posteriormente determinar la producción de óxido nítrico. Por otra parte, los MN infectados fueron lisados con 50µl/pozo de Dodecil-Sulfato de Sodio al 0.1% por incubación durante 10 minutos posteriormente se agregaron 50µl/pozo de albúmina sérica bovina al 20%, obteniendo un volumen final de 100µl por pozo. Con este volumen obtenido en la lisis celular se realizaron diluciones seriadas (1:10) ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$ ) en medio 7H9 suplementado con ADC (albúmina-dextrosa-catalasa) (Difco) en tubos de polipropileno y 10µl de cada dilución se sembraron por triplicado en placas con agar 7H10-OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa). Las placas se incubaron durante 21 días a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, se contaron y reportaron la media de las UFC.

#### **5.7. Efecto de la Vitamina D (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) sobre la capacidad bactericida de los MN determinada por unidades formadoras de colonia (UFC).**

Se colocaron  $1 \times 10^5$  MN por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos fondo plano (Costar) y se dejaron adherir 1 hora a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>; posteriormente los MN fueron infectados

durante una hora con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* en proporción de 10 bacterias por célula (10:1). Los MN se lavaron tres veces con PBS para eliminar las micobacterias no fagocitadas y se agregaron 200µl de medio completo con 500nM de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> a diferentes tiempos: D0 (1 hora), D1 (24 horas) y D3 (72 horas). En cada tiempo se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para posteriormente determinar la producción de óxido nítrico. Y los MN infectados fueron lisados con 50µl/pozo de Dodecil-Sulfato de Sodio al 0.1% y se incubaron durante 10 minutos y se neutralizó con 50µl/pozo de albúmina sérica bovina al 20%. Con el lisado celular se realizaron cuatro diluciones seriadas en medio 7H9 suplementado y se sembraron 10µl de cada dilución por triplicado en placas con agar 7H10-OADC. Las placas se incubaron durante 21 días a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y se determinaron las UFC.

#### **5.8. Determinación de Óxido Nítrico en sobrenadantes de cultivo.**

En los sobrenadantes provenientes de los cultivos donde se evaluó la capacidad bactericida de los MN se determinó la presencia del óxido nítrico por medio de la formación del nitrito de sodio. Brevemente, en una placa de 96 pozos de fondo plano se colocaron 50µl por duplicado de diferentes concentraciones de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) (0, 20, 40, 60, 80, 100nM) para hacer una curva estándar. Después en otros pozos se añadieron 50µl de los sobrenadantes de cultivos por duplicado, y se agregaron 50µl por pozo del reactivo de Griess preparado al momento (Sulfanilamida al 1.5% en HCl 1N/N-1-Naphtylene-diamine dihydrochloride al 0.15%). La placa se incubó en la oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 540nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland). Para determinar la concentración del nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) se interpolaron las lecturas de absorbancia de las muestras en la curva estándar. Las concentraciones de nitritos se expresaron en micromoles (µM).

#### **5.9. Expresión del gen LL-37 por PCR en células mononucleares de sangre periférica.**

Las células mononucleares de sangre periférica de un sujeto sano, fueron estimuladas con diferentes concentraciones 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (0.2, 2, 20, 200nM), se incubaron durante 24h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se lisaron las células con buffer de lisis RLT (Quiagen), y estos lisados celulares se utilizaron para hacer la purificación de RNA total.

### **5.10. Purificación del RNA total por columna.**

La purificación del RNA total se realizó utilizando el sistema RNeasy Mini Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los lisados celulares se descongelaron para llevarlos a temperatura ambiente, se mezclaron con 350µl de etanol al 70% y se transfirieron 700µl de la muestra a la columna con membrana de sílice, se centrifugó por 1 minuto a 12,000rpm. La columna, se lavó con 350µl de la solución RW1 y se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 12,000rpm. El DNA genómico fue removido agregando 80µl de DNasa I, directamente en la columna, e incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente la columna con 350µl de RW1, se centrifugó por 1 minuto a 12,000rpm. Después se agregaron 500µl de tampón RPE en la columna, se centrifugó por 1 minuto a 12,000rpm, se repitió este lavado. La columna se transfirió a un tubo de 1.7ml y se agregaron 20µl de agua libre de RNAsas (agua-DEPC) en la columna y, se centrifugó por 1 minuto a 8,000 rpm para eluir el RNA, este paso se repitió nuevamente obteniendo un volumen final de 40µl de RNA total que fue almacenado a -70°C.

### **5.11. Síntesis de DNA complementario por transcripción reversa.**

El RNA total se utilizó para la síntesis del DNA complementario (cDNA) utilizando el kit SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los reactivos se descongelaron, mezclaron y centrifugaron. Se preparó la mezcla de RNA/primer para cada muestra en un tubo de 0.2ml estéril. Las muestras se incubaron a 65°C por 5min en un termociclador (iCycler Thermal Cycler BIO-RAD) y después se colocaron en hielo por 1 minuto. Por otra parte, se preparó la mezcla de transcripción reversa (RT) (Ver apéndice), y se agregaron 9µl de la mezcla RT a cada una de las muestras y se incubaron a temperatura ambiente por 2 minutos, después se agregó 1µl (50 Unidades/µl) de la enzima Superscript II RT a cada una de las muestras, y se llevo a cabo la síntesis de cDNA en el termociclador con las siguientes condiciones (25°C/10min; 42°C/50min y 70°C/15min). Finalizada la síntesis se agregó 1µl de RNase H (2U/µl) a cada una de las muestras, y se incubaron 20min a 37°C, para remover el RNA utilizado como templete durante la síntesis del cDNA, al finalizar este ciclo se guardó el cDNA a -20°C hasta ser utilizado para la amplificación por PCR convencional o en Tiempo Real.

### **5.12. Amplificación de LL-37 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Con el cDNA sintetizado se amplificó un fragmento de 107pb de LL-37 humana por PCR, utilizando los siguientes iniciadores; Forward 5´- GACGACACAGCAGTCACCAGA-3´ y Reverse: 5´- TGATGTCAAAGGAGCCCCTG -3´. Se preparó la mezcla para la reacción de amplificación (Ver apéndice). En un tubo de 0.2ml se agregaron 22µl de la mezcla de reacción de amplificación y 3µl de cDNA de la muestra para obtener un volumen total de 25µl, y la amplificación del fragmento se realizó en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo (95°C-5 min, 54°C-1min y 72°C-30seg), 40 ciclos (95°C-1 min, 54°C-1min y 72°C-30seg) y (95°C-5 min, 54°C-1min y 72°C-30seg) un ciclo final (95°C-1min, 54°C-1min y 72°C por 10min). El producto amplificado se analizó en electroforesis en gel de poliacrilamida (Acilamida/Bis-acilamida 30/0.8%), durante 1 hora a 100V. Para visualizar el fragmento amplificado, el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1µg/ml por 15min y se observó el gel en un transiluminador bajo luz ultra violeta (Mighty Bright Hoefer Scientific Instruments) y se tomó una fotografía.

### **5.13. Cinética de expresión de LL-37 inducida por la vitamina D por PCR-Tiempo Real.**

En placas de cultivo de 24 pozos (Costar) se agregaron  $0.5 \times 10^6$  MN/pozo y se incubaron por 1 hora a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> para dejar adherir los MN, posteriormente los MN se infectaron con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* en proporción de 10 micobacterias por célula y se incubaron durante 1 hora. Se lavaron los MN tres veces con 500µl/pozo de PBS. Después se agregaron 500µl/pozo de medio completo (RPMI 1640 con 2mM de L-glutamina y 10% de suero humano descomplementado) con diferentes concentraciones de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (0.2, 2, 20, 200nM). Se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> a los diferentes tiempos de la cinética 4, 18 y 24 h. Al finalizar los tiempos de la cinética estudiada se cosecharon los sobrenadantes en tubos de 1.6ml y se almacenaron a -20°C, por otra parte, se lisaron las células con 350µl de buffer de lisis RLT (Quiagen) y se colocaron los lisados celulares en tubos de 1.7 ml libres de RNAsas y almacenados a -20°C para la purificación del RNA utilizando el RNase Mini Kit (Quiagen) y síntesis de cDNA.

#### **5.14. Análisis de la expresión de genes por PCR en Tiempo Real (Cuantificación relativa).**

La expresión de LL-37 y 18s ribosomal en MN estimulados con diferentes concentraciones de la 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> y a diferentes tiempos se analizó por PCR en tiempo real siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Brevemente, se descongelaron y se mezclaron todos los reactivos antes de utilizarlos, se preparó la mezcla del Master mix para la expresión de genes en un tubo de 0.6ml estéril (Ver apéndice). Se utilizó el ensayo Taqman para LL-37 (Hs00189038\_m1 CAMP, AB Applied Biosystems) con la sonda marcada con FAM y el ensayo para el 18s ribosomal marcado con VIC (Applied Biosystems) como gen constitutivo. Se mezclaron 42µl de Master mix de cada gen con 10µl de cDNA (dilución 1:5), estas mezclas se hicieron en tubos de 0.6ml, cuidadosamente se aplicaron 25µl de la muestra por duplicado en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos (Applied Biosystems). La placa fue sellada con el plástico adhesivo óptico (Applied Biosystems) y se centrifugo a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar las burbujas de los pozos, y la amplificación se realizó en el Sequence Detection System 7500 ABI Prisma Real Time PCR (Applied Biosystem), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo (50°C por 2 minutos), 1 ciclo (95°C por 10 minutos), y 40 ciclos (95°C por 15 segundos, 62°C por 1 minuto). Se hizo una cuantificación relativa utilizando el método ddCt considerando el calibrador la condición experimental sin estímulo. El análisis se realizó utilizando, el software SDS versión 1.4 de Applied Biosystem, reportando los resultados como incrementos con respecto al calibrador.

#### **5.15 Análisis estadístico.**

Las diferencias se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney Rank Sum Test y la prueba exáct de Fisher, considerando significancia estadística con un valor de  $p \leq 0.05$ . Se utilizó el software GraphPad Prisma versión 5.03 (2009). En todos los resultados se muestra Media  $\pm$  error estándar.

## 6. RESULTADOS.

En el presente estudio se incluyeron 15 pacientes con DM2 y 13 sujetos sanos. En la tabla 1 se muestran los datos de sexo, edad, valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y glucosa en ayuno, talla, peso e índice de masa corporal (IMC). Se puede observar que en los grupos de estudio hay una mayor proporción de mujeres, que corresponden al 64% y 70% en DM2 y sanos respectivamente.

Con respecto a la edad, los niveles de HbA1c y glucosa en ayuno los pacientes con DM2 mostraron un aumento significativo comparado con los sanos. No se encontraron diferencias con respecto a la talla, el peso y el IMC entre los grupos de estudio (Tabla 1).

Es importante mencionar que los pacientes con DM2 incluidos en el estudio estaban controlados con hipoglucemiantes orales como metformina y glibenclamida; además que ninguno de los pacientes con DM2 presentó alguna enfermedad infecciosa o inflamatoria asociada.

**Tabla 1.** Características clínicas de la población de estudio.

	<b>DM2 (n=15)</b>	<b>Sanos (n=13)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>			
<b>Hombres</b>	4	3	>0.05*
<b>Mujeres</b>	11	10	>0.05*
<b>Edad (26)</b>	54.1 ± 2.0	43.23 ± 2.8	0.0080
<b>HbA1c (%)</b>	7.3 ± 0.4	5.5 ± 0.07	<0.0001
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	136.4 ± 4.8	92.92 ± 2.6	<0.0001
<b>Talla (m)</b>	1.58 ± 0.013	1.57 ± 0.013	>0.05
<b>Peso (Kg)</b>	66 ± 1.8	62.2 ± 1.3	>0.05
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.3 ± 0.57	25.2 ± 0.54	>0.05

Media ± error estándar.

p≤0.05, DM2 vs. Sanos, Mann-Whitney U test

\* p≤0.05, DM2 vs. Sanos, Exact de Fisher test

HbA1c = Hemoglobina glicosilada

IMC = Índice de masa corporal

### **6.1. La forma activa de la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) induce la expresión del gen LL-37 en células mononucleares de sangre periférica.**

Considerando que la producción de LL-37 se ha asociado a la capacidad de los MN para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* y como se ha descrito que la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> induce la expresión de LL-37. Nuestro primer objetivo fue determinar si la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> tiene un efecto sobre la expresión de la catelicidina LL-37, por lo que se hizo el análisis preliminar de la expresión del gen en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con diferentes concentraciones de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (0.2, 2, 20 y 200nM) durante 24 horas y se incluyó una condición de medio como control negativo.

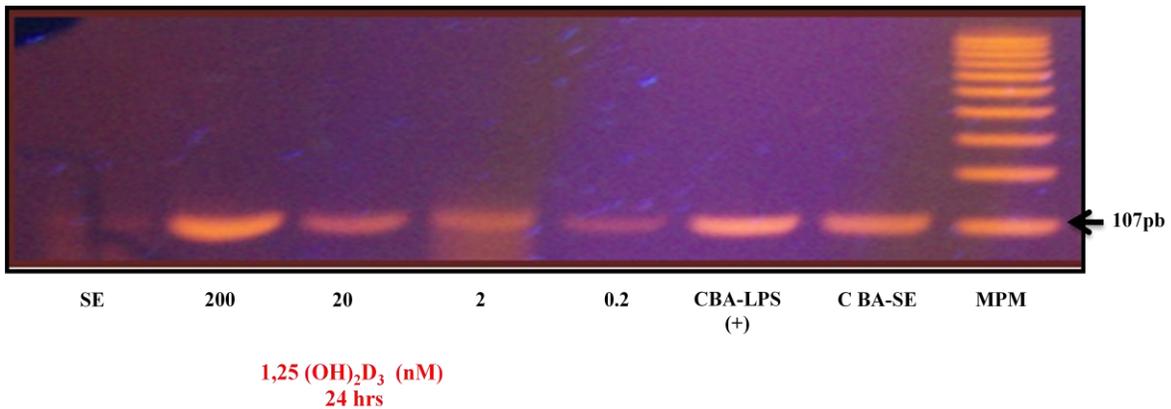
En la Figura 1 se muestra que la estimulación de las células mononucleares con 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> induce la expresión del gen de LL-37 mediante el análisis de la amplificación de un fragmento de 107pb. Además que las células muestran una expresión basal baja de LL-37, notoriamente se observa que la estimulación con 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> induce la expresión del gen de una manera dosis-dependiente en las células mononucleares de sangre periférica. Como controles positivos de la amplificación se incluyeron células bronquiolo alveolares sin estímulo (CBA-SE) y estimuladas con lipopolisacarido (CBA-LPS) y se observó que con las condiciones basales hay mayor expresión en comparación con los MN, porque las células bronquiolo alveolares son células diferenciadas.

### **6.2. La vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) estimula la expresión dosis-dependiente del gen LL-37 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.**

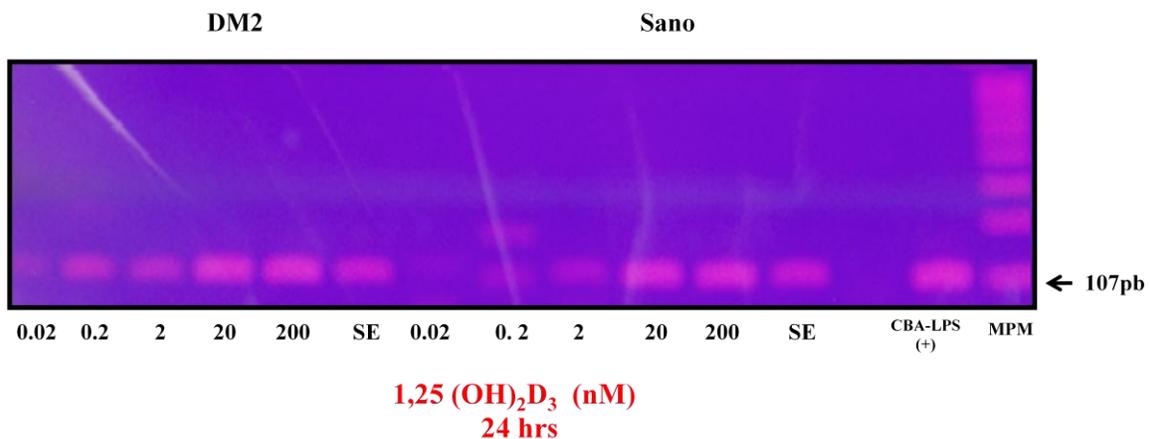
Después de demostrar que la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> induce la expresión de LL-37 en células mononucleares de sangre periférica se procedió a realizar el análisis en MN purificados ya que forman parte de la inmunidad innata y son las células objeto de nuestro estudio. Se analizó el efecto de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> sobre la expresión del gen LL-37 en los MN de un paciente con DM2 y un sujeto sano estimulados por 24 h con diferentes concentraciones de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. En la Figura 2 se muestra la amplificación del fragmento de 107pb de LL-37 inducida por la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> y se observó que la expresión de LL-37 es dosis-dependiente y estos resultados son consistentes con lo observado en las células mononucleares (Figura 1). Se puede apreciar que los MN del paciente muestran mayor

expresión de LL-37 en comparación con los MN del sujeto sano a todas las concentraciones utilizadas de vitamina D (Figura 2), aunque consideramos que este no es un análisis cuantitativo.

A diferencia de las células mononucleares se puede observar que hay una expresión basal más notable en los MN tanto de DM2 como sanos (Figura 2), y esto se debe a que es una población de MN purificados.



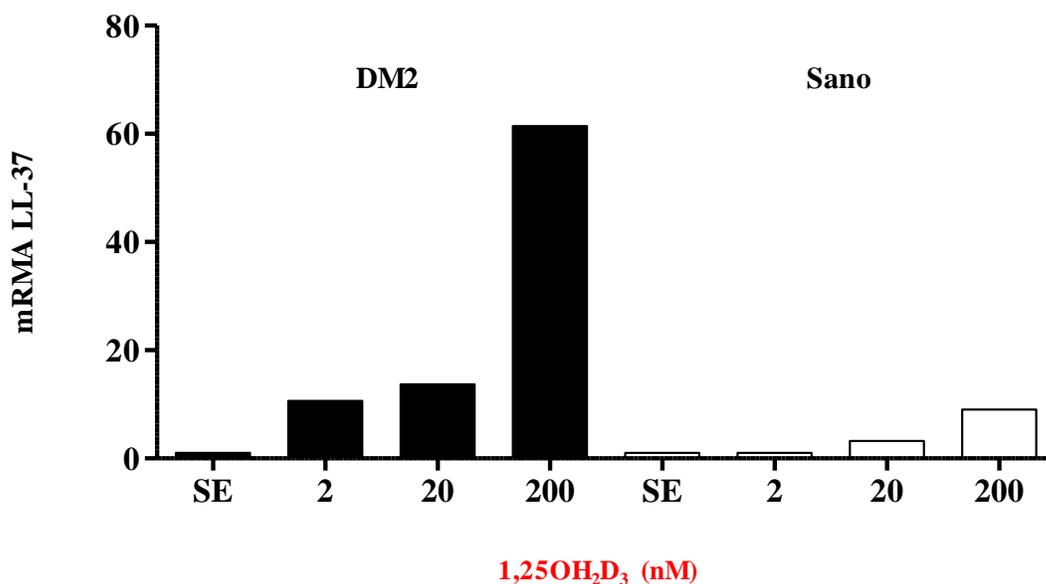
**Figura 1. La vitamina D induce la expresión de LL-37 en células mononucleares de sangre periférica.**  $1 \times 10^6$  células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  por 24 h y se analizó la expresión de un fragmento de 107pb sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida. Control negativo=células bronquiolo alveolares sin estímulo (CBA-SE), control positivo estimulado con lipopolisacarido (CBA-LPS) y el marcador de peso molecular (MPM).



**Figura 2. La vitamina D estimula la expresión de LL-37 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.** Los MN fueron estimulados con diferentes concentraciones de  $1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$  durante 24 h y se analizó la expresión de LL-37 por PCR y electroforesis en gel de poliacrilamida. Control positivo estimulado con lipopolisacárido (CBA-LPS) y el marcador de peso molecular (MPM).

### 6.3. Aumento en la expresión de LL-37 inducida por la vitamina D en monocitos.

Para determinar si existen diferencias cuantitativas en la expresión de LL-37 entre los MN del paciente con DM2 y el sujeto sano, se analizó la expresión del gen LL-37 y 18s ribosomal como gen constitutivo por PCR en tiempo real. En la Figura 3 se muestra que la expresión de LL-37 aumenta con la concentración de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  en los MN del paciente y el sujeto sano. Sin embargo, podemos ver diferencias notables en la expresión, ya que hay incrementos de expresión 7.4, 12.1 y 52.4 veces más (2, 20 y 200nM  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  respectivamente) en los MN del paciente en comparación con los MN del sujeto sano.

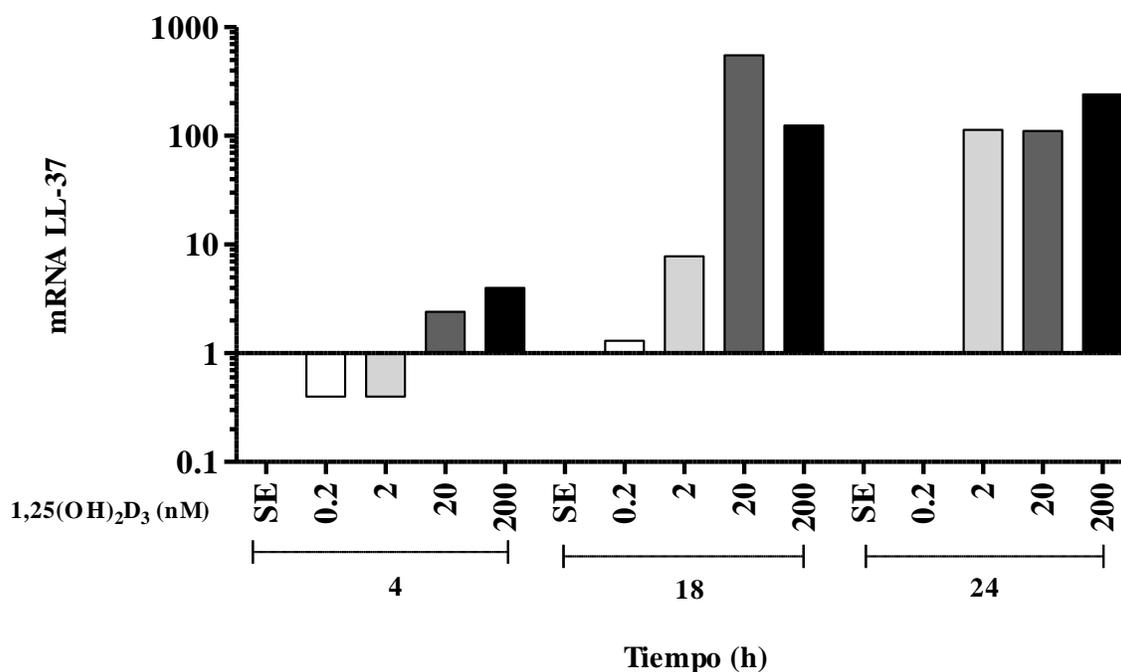


**Figura 3. Cinética de expresión de LL-37 inducida por la vitamina D en monocitos.** Los MN de un paciente y un sujeto sano fueron estimulados con diferentes concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  por 24h y se analizó la expresión del LL-37 y 18s ribosomal por PCR en tiempo real.

#### 6.4. Cinética de la expresión del gen LL-37 en monocitos de un paciente con DM2.

Para conocer la cinética de expresión de LL-37 inducida por la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  en los MN de un paciente con DM2. Se incubaron los MN con diferentes concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  y se analizó la expresión del gen de LL-37 y 18s ribosomal por PCR en tiempo real a las 4, 18 y 24 h. Demostrando que la expresión de LL-37 se inicia a los tiempos tempranos (4h) y se incrementa con el tiempo y la concentración (Figura 4). Se observa que la expresión de LL-37 a las 4 horas es menor de 1 a 0.2 y 2nM y aumenta en 20 y 200nM de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ , mientras que a las 18 h la expresión de LL-37 aumenta en todas las concentraciones, pero a 20nM se observa la máxima expresión de 553 y disminuye a 124 con 200nM. No obstante a las 24 h observamos que la expresión a 2 y 20nM son similares (113.5 vs. 110.8), aumentando a 241.8 a 200nM.

De estos resultados se determinó utilizar la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  a una concentración de 200nM por 24h para analizar la expresión de los genes LL-37 y 18s ribosomal.



**Figura 4. Cinética de expresión de LL-37 en monocitos de un paciente con DM2.** Los MN de un paciente con DM2 se incubaron con diferentes concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  y se analizó la expresión del gen de LL-37 y 18s ribosomal por PCR en tiempo real.

### **6.5. Efecto de la vitamina D sobre la actividad anti-micobacteriana de los MN de pacientes con DM2.**

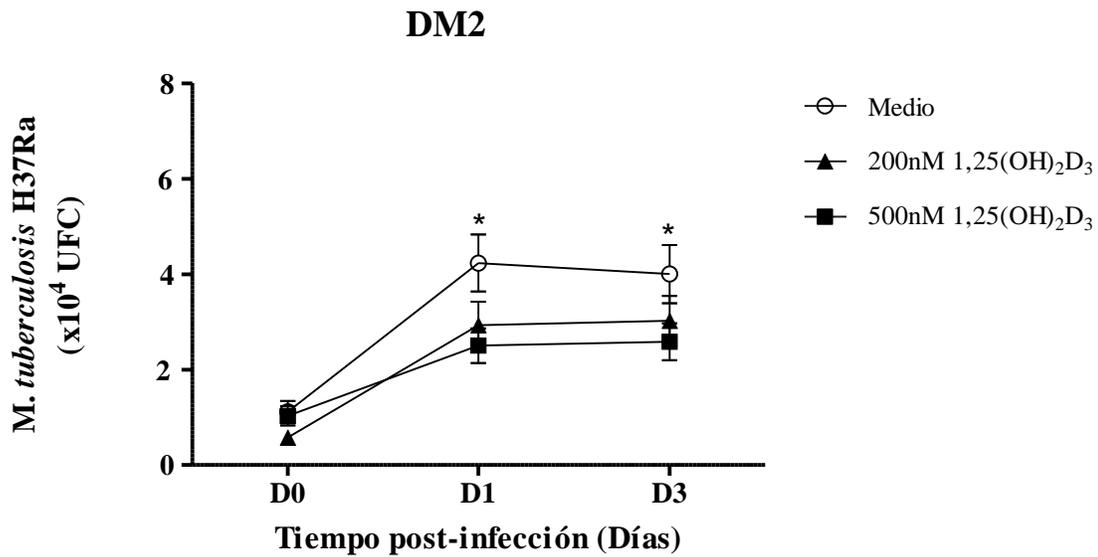
Considerando que los MN son los responsables del control intracelular de las micobacterias y la producción de LL-37 se ha asociado a su capacidad para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*, se estudió el efecto de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> sobre la capacidad de inhibición del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* cepa H37Ra (10 micobacterias: 1 monocito), en MN infectados incubados durante (D0) 1, (D1) 24 y (D3) 72 horas en ausencia o presencia de 200nM y 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>.

Los resultados mostraron que a 200 y 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> hay una disminución de las unidades formadoras de colonia (UFC), pero con 500nM hay una disminución significativa de las UFC al D1 y D3 con respecto al medio (Figura 5a) en los MN de pacientes con DM2, mientras que en los sujetos sanos se observó que a 200nM el crecimiento tiene un comportamiento similar al medio, mientras que a 500nM hay una disminución de las UFC (Figura 5b). La 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> a una concentración de 500nM favorece la capacidad bactericida de los MN al inhibir significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el crecimiento de la micobacteria a los D1 y D3 en los pacientes con DM2. Con este antecedente se decidió utilizar la concentración de 500nM para los ensayos de inhibición del crecimiento de la micobacteria.

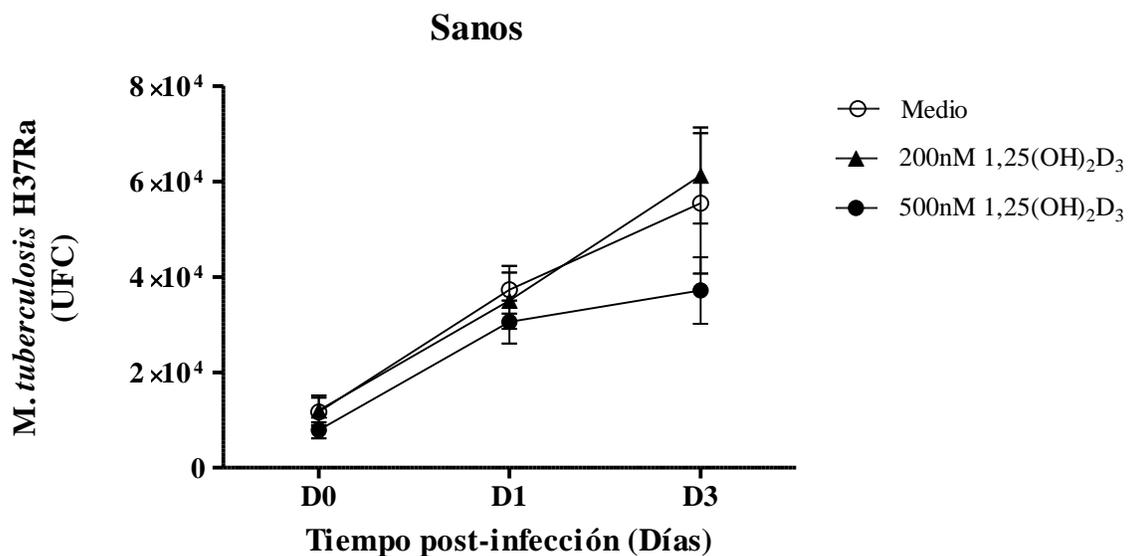
### **6.6. La vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) no tiene un efecto directo en la muerte de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*.**

Para evaluar el efecto de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> en el crecimiento de *M. tuberculosis* cepa H37Ra se realizó un experimento en el que se incubó una concentración de  $1 \times 10^7$  de micobacterias de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* durante (D0) 1, (D1) 24 y (D3) horas en ausencia o presencia de 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. En la Figura 6 se observa que el crecimiento de la micobacteria tiene un comportamiento similar al medio ( $p \geq 0.05$ , Mann-Whitney U test).

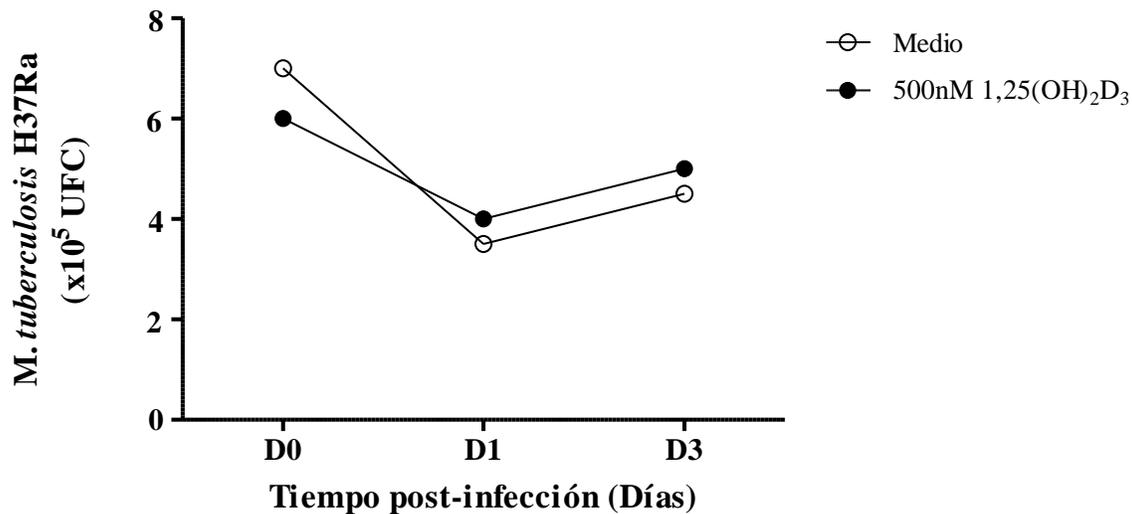
a)



b)



**Figura 5. Efecto de la concentración de vitamina D sobre la actividad antimicrobacteriana de los MN infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* en MN infectados.** Los MN infectados con *M. tuberculosis* H37Ra (10:1) se incubaron durante (D0) 1, (D1) 24 y (D3) 72 horas en ausencia o presencia de 200 y 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Se determinaron las UFC. Los valores graficados corresponden a Media± Error estándar. **a)** Pacientes con DM2 200nM (n=7); 500nM (n=15) y **b)** Sanos 200nM (n=8); 500nM (n=13). (\*p<0.05, Medio vs. 500nM 1, 25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, Mann-Whitney U test).

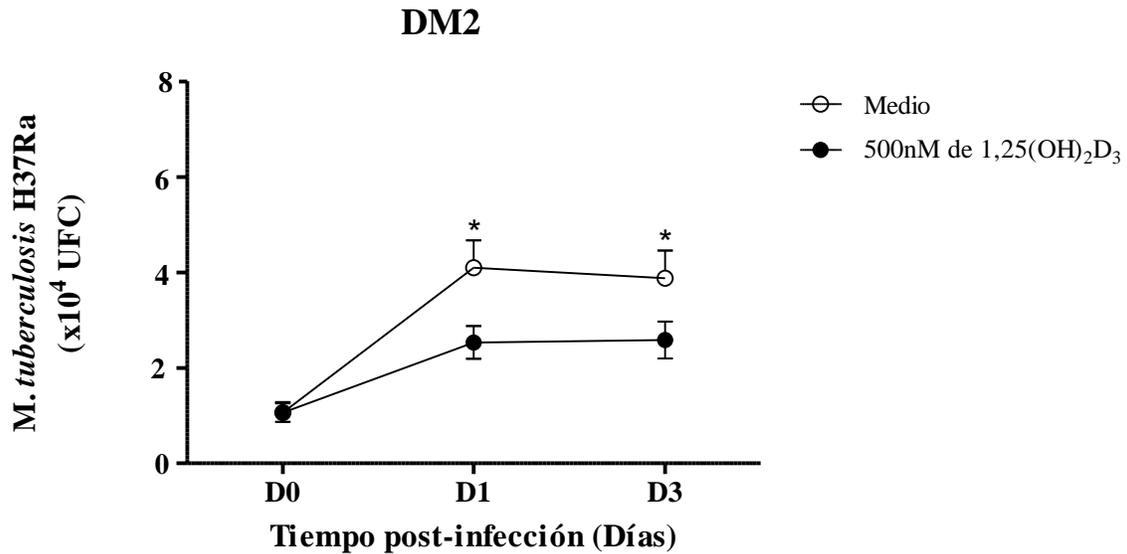


**Figura 6.** La vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) no tiene actividad anti-micobacteriana. Las micobacterias se incubaron durante (D0) 1, (D1) 24 y (D3) 72h en ausencia o presencia de 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>.

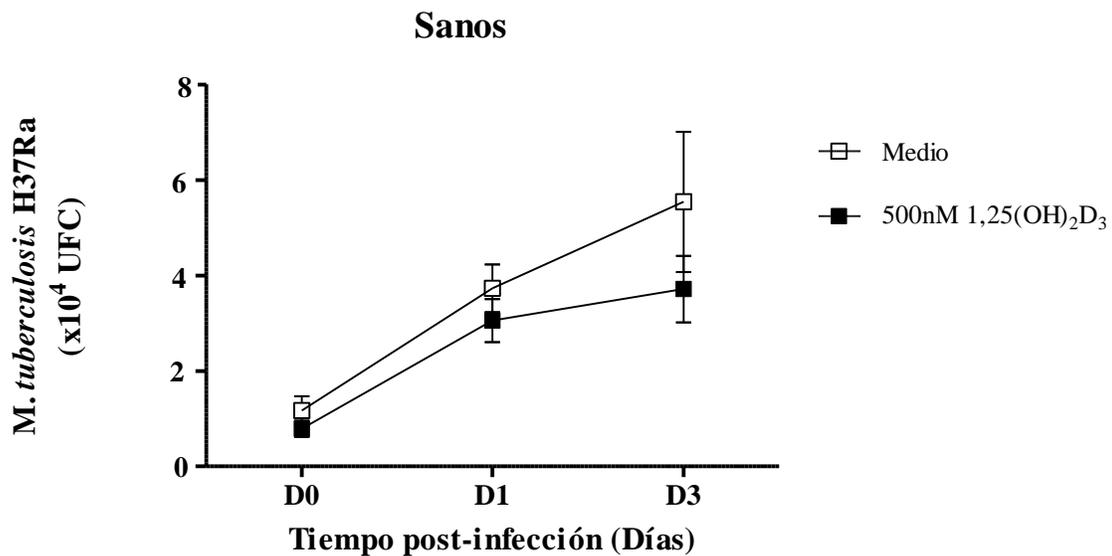
**6.7. La vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> a 500nM favorece la actividad anti-micobacteriana en MN de pacientes con DM2 infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*.**

Una vez establecida la concentración experimental de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> se procedió a analizar su efecto sobre la capacidad bactericida de los MN infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Ra (10:1). Los MN de pacientes con DM2 y sujetos sanos se incubaron en ausencia o presencia de 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, y los lisados fueron sembrados en medio 7H10 y se determinaron las UFC. Se observó que la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> favorece la capacidad bactericida de los MN de los pacientes con DM2 al inhibir significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el crecimiento de la micobacteria a los D1 y D3 (Figura 7A) y una tendencia similar en los sujetos sanos ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 7B).

A)



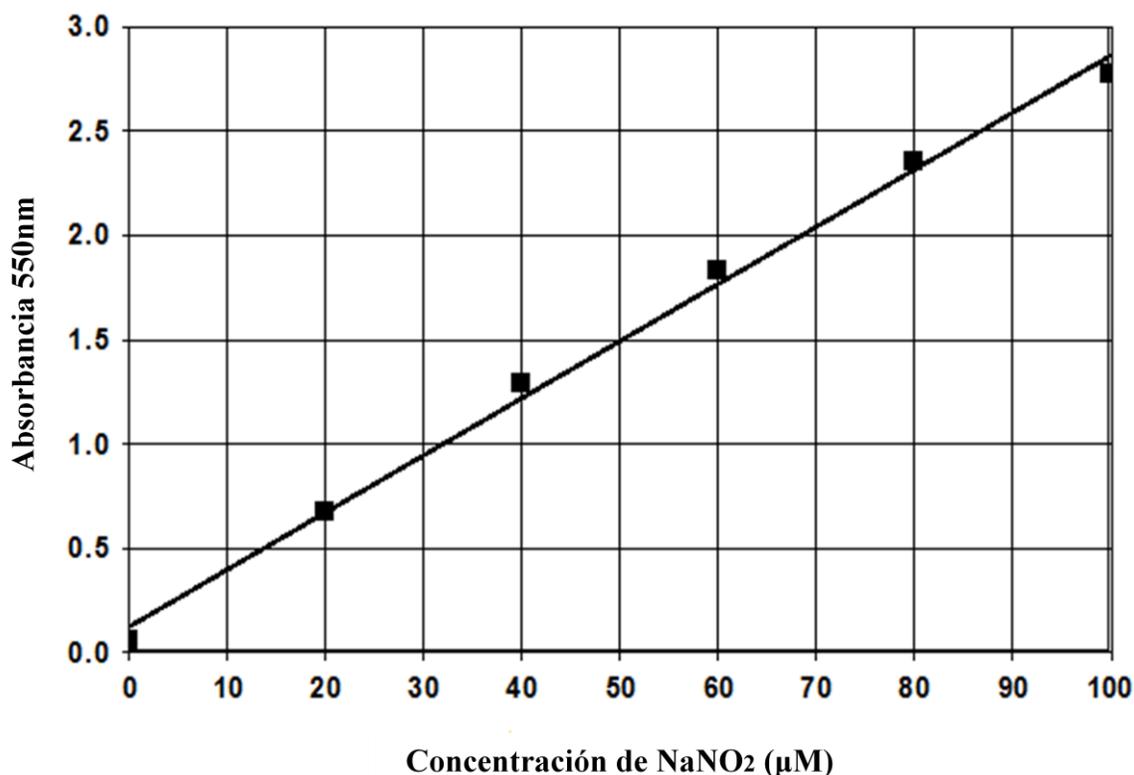
B)



**Figura 7.** La vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> favorece la actividad anti-micobacteriana en los MN de pacientes con DM2 infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Ra. Los MN infectados con *M. tuberculosis* H37Ra (10:1) se incubaron durante (D0) 1, (D1) 24 y (D3) 72 h en ausencia o presencia de 500nM de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Las células se lisaron y las diluciones se determinaron UFC. Media ± Error estándar. **A)** Pacientes con DM2 (n=15), **B)** Sanos (n=13) (\*p≤0.05, Medio vs 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, Mann-Whitney U test).

### 6.8. La vitamina D no tiene efecto en la producción de óxido nítrico por monocitos infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Ra.

Para determinar si el óxido nítrico está involucrado en el control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* observado en los MN estimulados con vitamina D, en los sobrenadantes provenientes de evaluar la capacidad bactericida se hizo la evaluación de óxido nítrico por medio de la determinación de nitrito de sodio utilizando la técnica de Griess. Nuestros resultados se muestran en la Figura 8 donde se observa que no hay producción de óxido nítrico en MN infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Ra con o sin tratamiento con  $(1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3)$ .



**Figura 8. Producción de óxido nítrico.** Curva de calibración para la determinación de nitrito de sodio. Con R= 0.991.

## 7. DISCUSIÓN.

La DM2 es una de las principales causas de muerte en México, y actualmente representa un problema de salud pública (13).

Se ha observado que los pacientes con diabetes mellitus son susceptibles al desarrollo de tuberculosis activa (24).

Los bajos niveles de vitamina D en sangre son un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 (37, 52-53) y esta misma deficiencia predispone a los pacientes con DM2 a desarrollar tuberculosis (66).

Existen reportes utilizando diferentes tipos celulares en los que se ha demostrado el efecto de la vitamina D sobre la inmunidad innata, por ejemplo los estudios *in vitro* con MN de sujetos sanos y la línea celular THP1 tratadas con la forma activa de la vitamina D favorece la acción bactericida de las células al inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* cepas H37Ra y Erdman (50-51, 55). Por otra parte, en células mononucleares de sangre periférica y MN de sujetos sanos infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv se ha asociado la producción del péptido antimicrobiano LL-37 con la reducción de las unidades formadoras de colonia, sugiriendo la participación de LL-37 en la muerte de la micobacteria (51, 54-55, 62).

El mecanismo bactericida de la vitamina D en células de la inmunidad innata, se basa en su capacidad de inducir la expresión de LL-37 posiblemente involucrado en la muerte de *M. tuberculosis* en monocitos y macrófagos. Aunque la vitamina D promueve la actividad bactericida contra *M. tuberculosis* en las células, claramente se ha demostrado que por sí sola no tiene un efecto bactericida sobre *M. tuberculosis* (50-51).

La respuesta inmune innata tiene un papel importante en la infección causada por *M. tuberculosis* donde participan los MN y macrófagos quienes llevaran a cabo la fagocitosis, el procesamiento y la presentación de antígenos iniciando el desarrollo de una respuesta inmune.

Considerando que los pacientes con DM2 son más susceptibles a la infección con *M. tuberculosis* y con la finalidad de dilucidar las alteraciones en la respuesta inmune causadas por la hiperglucemia y comprender el efecto de la vitamina D (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) sobre sus MN, en el presente estudio se analizó la capacidad bactericida de los MN, además

de determinar si la producción de LL-37 y el óxido nítrico están involucrados en la actividad anti-micobacteriana de estas células.

La población de estudio se seleccionó de acuerdo a los criterios de inclusión, y en el caso de los pacientes se excluyeron los que presentaron algún proceso infeccioso o enfermedad inflamatoria crónica, ya que una enfermedad asociada a la DM2 puede influir en el fenómeno que queremos estudiar (la inmunidad innata en MN de pacientes con DM2), también es importante mencionar que todos los pacientes son compensados y estaban bajo tratamiento de hipoglucemiantes como metformina y glibenclamida.

De acuerdo a la ADA dentro de los parámetros establecidos para el diagnóstico de la enfermedad es tener niveles elevados de HbA1c >6% y glucosa 100-125 mg/dl en ayuno (3-4), nuestros pacientes mostraron niveles significativamente elevados de HbA1c y glucosa en comparación con los sujetos sanos, bajo los estándares de peso, talla e índice de masa corporal no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio, es una población no obesa (Tabla 1).

Los resultados demostraron que bajo nuestras condiciones experimentales la 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (0.2-200nM) induce la expresión del gen LL-37 en células mononucleares de sangre periférica y en los MN purificados consistentes con los reportes previos (50-51, 55, 62) (Figura 1 y 2).

Además demostramos que la 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> induce la expresión de LL-37 en los MN de pacientes con DM2 y en los sujetos sanos, de una manera dosis-dependiente (Figura 2). Cuando comparamos la expresión basal de LL-37 en células mononucleares y los MN encontramos diferencias muy claras observándose mayor expresión de LL-37 en los MN, esto se debe básicamente a las poblaciones analizadas; ya que los MN constituyen solo del 5 al 10% de las células mononucleares.

Al cuantificar la expresión de LL-37 entre los MN del paciente y el sujeto sano, se encontró que la expresión es dependiente de la concentración de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> como ya se había demostrado en los experimentos per-eliminarios (Figura 1 y 2) y esta aumentada en el paciente con DM2 (Figura 3) y que la expresión del LL-37 inducida por la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> en los MN comienza a las 4 horas y se incrementa con el tiempo y la concentración (Figura 4), observándose que hay expresión significativa a las 18 y 24 horas. Reportes en macrófagos

derivados de monocitos demostraron que después de la infección con *M. tuberculosis* se tiene mayor expresión de LL-37 a 18 horas (67).

Considerando que la vitamina D  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  induce la producción del gen LL-37, y asociado a su capacidad para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* en los MN de sujetos sanos (62). Se hizo el estudio del efecto de la vitamina D  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  sobre la capacidad bactericida de los MN en pacientes con DM2 quienes tienen mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*, mediante unidades formadoras de colonia (UFC), el cual es un método que expresa el número de colonias originadas a partir de una célula, haciendo cuantificable el efecto que tiene la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  en inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*.

La capacidad bactericida de los MN se cuantificó por la inhibición del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*, y se demostró que hay una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) de las UFC al D1 (24) y D3 (72) horas después de la infección en MN con 500nM de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  (Figuras 5a y 7A). Estos resultados (Figura 7A) demuestran claramente que los MN de pacientes con DM2 tratados con la vitamina D  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  mejoran su actividad bactericida en comparación con los sujetos sanos. Esto puede deberse a que los MN de los pacientes se encuentran en un proceso inflamatorio crónico y probablemente tienen una mayor velocidad de respuesta en comparación con los MN de los sujetos sanos.

Para confirmar que la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  no presenta un efecto directo en la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* cepa H37Ra como se ha reportado antes (50-51). Se hizo un experimento en el cual el crecimiento de la micobacteria no se ve afectada por la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  (Figura 6), lo que descarta que ni la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  ni el etanol con el cual esta disuelta la vitamina afectan el crecimiento de la micobacteria.

Pueden existir otros mecanismos inducidos por la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  que contribuyan con la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*, como es la expresión de la oxido nítrico sintasa (NOS2) involucrada en la producción de oxido nítrico y concluyen que la inhibición del crecimiento no está asociado a la producción del óxido nítrico (62). Por lo que se analizaron los sobrenadantes provenientes de evaluar la capacidad bactericida de los MN en la determinación de óxido nítrico por medio de la generación de nitrito de sodio y no se encontró producción de oxido nítrico, lo que sugiere que el control de crecimiento

intracelular de *M. tuberculosis* está asociado a la inducción del péptido antimicrobiano LL-37 por la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>).

Cabe remarcar que en este estudio se utilizó la forma activa de la vitamina D de manera que hay que profundizar aún más en el estudio para determinar el efecto que produce la forma inactiva de la vitamina D (25(OH) D<sub>3</sub>), lo que nos llevara a evaluar la funcionalidad de la enzima involucrada en generar la forma activa de la vitamina ya que quizá uno de los factores que causan la susceptibilidad de los pacientes con DM2 está asociada a alteraciones funcionales en las enzimas (CYP27B1 y CYP24A1) involucradas en la activación y regulación de la forma activa de la vitamina D, ya que alteraciones a este nivel pueden estar asociadas a la susceptibilidad a enfermedades infecciosas en los pacientes con DM2, o bien, una vez que se da la infección no hay control eficiente.

## 8. CONCLUSIONES.

1. La forma activa de la vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ), induce la expresión dosis-dependiente del gen de LL-37 en monocitos de pacientes con DM2.
2. La vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) induce la expresión de LL-37 que inicia a las 4 horas y se incrementa a las 18 y 24h.
3. La vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) aumenta significativamente el control de crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* de los MN de pacientes con DM2.
4. La actividad anti-micobacteriana de los MN estimulados con la vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) puede estar relacionado con el aumento en la producción de LL-37.
5. La vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ) no induce la producción de óxido nítrico en MN de pacientes con DM2 o sujetos sanos infectados con *M. tuberculosis*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Oriental, O. R. p. e. M. 2006. Lineamientos para el manejo de la hipertensión en pacientes con diabetes mellitus. In <http://www.emro.who.int/ncd/>. O. M. d. I. Salud, ed.
2. Salud, O. M. d. I. 2010. Diabetes. In [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/).
3. Diabetes, A. A. d. I. 2010. Todo sobre la Diabetes. In <http://www.diabetes.org/espanol/todo-sobre-la-diabetes/>.
4. Association, A. D. 2009. Standards of Medical Care in Diabetes—2009. *DIABETES CARE* 32:49.
5. Diabetes, F. I. d. 2010. ¿Qué es la Diabetes? In <http://www.diabetesatlas.org/es/content/what-diabetes-es>.
6. Laliberte, R. 2003. *Detenga la diabetes desde ahora. Guía Práctica y efectiva*.
7. Barceló, A. 2002. Módulo Diabetes: Salud del Niño y del Adolescente Salud Familiar y Comunitaria. *Organización Panamericana de la Salud*:51.
8. Salud, S. d. 2011. Necesario contener el incremento de los casos de diabetes In [http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n\\_seccion=Boletines&seccion=2011-03-21\\_5110.html](http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n_seccion=Boletines&seccion=2011-03-21_5110.html).
9. Løe, H. 1993. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16:329-334.
10. Davis, T. M., I. M. Stratton, C. J. Fox, R. R. Holman, and R. C. Turner. 1997. U.K. Prospective Diabetes Study 22. Effect of age at diagnosis on diabetic tissue damage during the first 6 years of NIDDM. *Diabetes Care* 20:1435-1441.
11. Salud, S. d. 2011. Diabetes mellitus, uno de los grandes retos en materia de Salud. In [http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n\\_seccion=Boletines&seccion=2011-03-17\\_5105.html](http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n_seccion=Boletines&seccion=2011-03-17_5105.html).
12. (OPS), O. P. d. I. S. 2008. Causas principales de mortalidad. In [http://ais.paho.org/hip/viz/mort\\_causasprincipales\\_lt\\_oms.asp](http://ais.paho.org/hip/viz/mort_causasprincipales_lt_oms.asp).
13. A.C., F. M. d. D. 2010. Diabetes. In <http://www.fmdiabetes.org>.
14. González-Hernández Y., S. D. E., Escobar-Gutiérrez Alejandro, Muños Torrico Marcela, Torres Rojas Martha. 2009. Asociación de tuberculosis y diabetes mellitus: Mecanismos inmunológicos involucrados en la susceptibilidad. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 22: 48-55.
15. Palomer, X., J. M. Gonzalez-Clemente, F. Blanco-Vaca, and D. Mauricio. 2008. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 10:185-197.
16. Dasu, M. R., S. Devaraj, S. Park, and I. Jialal. 2010. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33:861-868.
17. Komura, T., Y. Sakai, M. Honda, T. Takamura, K. Matsushima, and S. Kaneko. 2010. CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59:634-643.

18. Lee, C. F., L. P. Chu, S. C. Cheng, R. A. Good, M. M. Fuh, and L. Shou. 1986. Fc and C3b receptor expression of phagocytes in poorly controlled diabetic patients. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 10:236-244.
19. Dolhofer-Bliesener, R., and K. D. Gerbitz. 1990. Impairment by glycation of immunoglobulin G Fc fragment function. *Scand J Clin Lab Invest* 50:739-746.
20. Dolhofer-Bliesener, R., B. Lechner, and K. D. Gerbitz. 1994. Impaired immunoglobulin G Fc fragment function in diabetics is caused by a mechanism different from glycation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32:329-336.
21. Villarreal, D. J. C. 2011. Infecciones en pacientes diabéticos. In <http://www.aspame.net/charlas/infeccionesendiabeticos.pdf>.
22. Muñoz, M. 2002. Riesgo de infecciones habituales en diabetes mellitus tipo 2. *Avances en Diabetología* 18:21-27.
23. Chen, Y. H., S. J. Lin, F. Y. Lin, T. C. Wu, C. R. Tsao, P. H. Huang, P. L. Liu, Y. L. Chen, and J. W. Chen. 2007. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes* 56:1559-1568.
24. Jeon, C. Y., and M. B. Murray. 2008. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med* 5:e152.
25. Diabetes, F. I. d. 2010. Una llamada de atención contra la diabetes. <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/WEB/Call-to-Action-on-Diabetes-SP.pdf>:20.
26. Dr. Castellanos Joya, M. 2011. Situación actual de la Tuberculosis en México... Avances y desafíos. In *Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades*. <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/diamundial/PresentaciónoficialTB2010México.pdf>. 31.
27. Trejo-Márquez, H. 2003. Bases moleculares de la interacción de Mycobacterium tuberculosis con los macrófagos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 16:41-47.
28. Frantz, S., K. A. Vincent, O. Feron, and R. A. Kelly. 2005. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 96:15-26.
29. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.
30. Davis, A. S., I. Vergne, S. S. Master, G. B. Kyei, J. Chua, and V. Deretic. 2007. Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLoS Pathog* 3:e186.
31. Liu, P. T., S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B. H. Tan, S. R. Krutzik, M. T. Ochoa, J. Schaubert, K. Wu, C. Meinken, D. L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zugel, R. L. Gallo, D. Eisenberg, M. Hewison, B. W. Hollis, J. S. Adams, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311:1770-1773.
32. Lips, P. 2010. Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:297-300.
33. Riella, M. C. 2004. *Nutrición y Riñón*.
34. Kochupillai, N. 2008. The physiology of vitamin D : current concepts. *Indian J Med Res* 127:256-262.
35. Gombart, A. F. 2009. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol* 4:1151-1165.
36. Blenda, J. 2009. *Huesos, articulaciones y músculos sanos*.

37. Holick, M. 2007. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine* 357:266-281.
38. Biesalski, H. K. 2007. *Nutrición: Texto y atlas*.
39. White, J. H. 2008. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun* 76:3837-3843.
40. Chiu, K. C., A. Chu, V. L. Go, and M. F. Saad. 2004. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 79:820-825.
41. Pittas, A. G., B. Dawson-Hughes, T. Li, R. M. Van Dam, W. C. Willett, J. E. Manson, and F. B. Hu. 2006. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 29:650-656.
42. Martineau, A. R., R. J. Wilkinson, K. A. Wilkinson, S. M. Newton, B. Kampmann, B. M. Hall, G. E. Packe, R. N. Davidson, S. M. Eldridge, Z. J. Maunsell, S. J. Rainbow, J. L. Berry, and C. J. Griffiths. 2007. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 176:208-213.
43. Adams, J. S., and M. Hewison. 2008. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:80-90.
44. Jo, E. K. 2010. Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy. *Cell Microbiol* 12:1026-1035.
45. Gombart, A. F., N. Borregaard, and H. P. Koeffler. 2005. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J* 19:1067-1077.
46. Yim, S., P. Dhawan, C. Raganath, S. Christakos, and G. Diamond. 2007. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Cyst Fibros* 6:403-410.
47. Weber, G., J. D. Heilborn, C. I. Chamorro Jimenez, A. Hammarsjo, H. Torma, and M. Stahle. 2005. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *J Invest Dermatol* 124:1080-1082.
48. Davies, P. D., R. C. Brown, and J. S. Woodhead. 1985. Serum concentrations of vitamin D metabolites in untreated tuberculosis. *Thorax* 40:187-190.
49. Rook, G. A. 1988. The role of vitamin D in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 138:768-770.
50. Rook, G. A., J. Steele, L. Fraher, S. Barker, R. Karmali, J. O'Riordan, and J. Stanford. 1986. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *Immunology* 57:159-163.
51. Crowle, A. J., E. J. Ross, and M. H. May. 1987. Inhibition by 1,25(OH)2-vitamin D3 of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun* 55:2945-2950.
52. Pittas, A. G., Q. Sun, J. E. Manson, B. Dawson-Hughes, and F. B. Hu. 2010. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of incident type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 33:2021-2023.
53. Gagnon, C., Z. X. Lu, D. J. Magliano, D. W. Dunstan, J. E. Shaw, P. Z. Zimmet, K. Sikaris, N. Grantham, P. R. Ebeling, and R. M. Daly. 2011. Serum 25-Hydroxyvitamin D, Calcium Intake, and Risk of Type 2 Diabetes After 5 Years:

- Results from a national, population-based prospective study (the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle study). *Diabetes Care* 34:1133-1138.
54. Liu, P. T., M. Schenk, V. P. Walker, P. W. Dempsey, M. Kanchanapoomi, M. Wheelwright, A. Vazirnia, X. Zhang, A. Steinmeyer, U. Zugel, B. W. Hollis, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2009. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One* 4:e5810.
  55. Liu, P. T., S. Stenger, D. H. Tang, and R. L. Modlin. 2007. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 179:2060-2063.
  56. Rivas-Santiago, B., J. C. Contreras, E. Sada, and R. Hernandez-Pando. 2008. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand J Immunol* 67:448-452.
  57. Zanetti, M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 75:39-48.
  58. Liu, P. T., and R. L. Modlin. 2008. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 20:371-376.
  59. Oren, Z., J. C. Lerman, G. H. Gudmundsson, B. Agerberth, and Y. Shai. 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341 ( Pt 3):501-513.
  60. bank, P. d. 2011. Secuencia y estructura de la Catelicidina LL-37. In <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2K6O>.
  61. Rivas-Santiago B, e. a. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Publica Mex* 48:62-71.
  62. Martineau, A. R., K. A. Wilkinson, S. M. Newton, R. A. Floto, A. W. Norman, K. Skolimowska, R. N. Davidson, O. E. Sorensen, B. Kampmann, C. J. Griffiths, and R. J. Wilkinson. 2007. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol* 178:7190-7198.
  63. Sanchez, J. F., F. Hoh, M. P. Strub, A. Aumelas, and C. Dumas. 2002. Structure of the cathelicidin motif of protegrin-3 precursor: structural insights into the activation mechanism of an antimicrobial protein. *Structure* 10:1363-1370.
  64. Mendez-Samperio, P., E. Miranda, and A. Trejo. 2008. Expression and secretion of cathelicidin LL-37 in human epithelial cells after infection by *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *Clin Vaccine Immunol* 15:1450-1455.
  65. Zasloff, M. 2006. Fighting infections with vitamin D. *Nat Med* 12:388-390.
  66. Talat, N., S. Perry, J. Parsonnet, G. Dawood, and R. Hussain. 2010. Vitamin d deficiency and tuberculosis progression. *Emerg Infect Dis* 16:853-855.
  67. Rivas-Santiago, B., R. Hernandez-Pando, C. Carranza, E. Juarez, J. L. Contreras, D. Aguilar-Leon, M. Torres, and E. Sada. 2008. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun* 76:935-941.

## 10. APÉNDICE.

### **Medio Suplementado.**

Medio RPMI suplementado con 2mM de L-Glutamina

Suplementar 1Lt de RPMI 1640 (Cambrex) con 10ml de L-Glutamina 200mM, para tener una concentración final de 2mM.

### **Medio Completo (RPMI-Glutamina-10% Suero Humano Descomplementado).**

Agregar 5ml pool de suero humano descomplementado a 45ml de medio RPMI-1640 suplementado.

### **Medio 7H9.**

1.88g de agar 7H9 (Difco)

1.6ml de glicerol (Merck)

400ml de agua desionizada

40ml de ADC (albúmina-dextrosa-catalasa) (BD BBL<sup>MT</sup>)

Procedimiento:

1. Mezclar en una botella de 500ml el 7H9 en polvo, el glicerol, el agua desionizada.
2. Agitar con una barra magnética hasta completa disolución.
3. Esterilizar en autoclave por 15min a 121°C. Enfriar a 50°C aproximadamente.
4. Agregar 40ml de ADC (BBL), filtrándolo previamente con membrana de 0.20µm (Corning).
5. Guardar el medio suplementado en refrigeración a 4°C.

### **Medio 7H10.**

497 ml de agua desionizada

11.4g de agar 7H10 (Difco)

6 ml de glicerol (Merck)

2,5g de asparagina (Difco)

60 ml de OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) (BD BBL<sup>MT</sup>)

Procedimiento:

1. En un matraz colocar el agua desionizada.
2. Agregar poco a poco el agar, glicerol y la asparagina.
3. Disolver los componentes del agar en el horno de microondas hasta que el agar se disuelva completamente adquiriendo un color verde translúcido.
4. Tapar los matraces con tapones de gasa y esterilizar en autoclave durante 10min a 121°C.
5. Colocar en la campana las placas petri (60 x 15mm, Falcon) abiertas con cuidado de mantener la esterilidad.

6. Enfriar el medio a 40 o 50°C y agregar 60 ml de OADC (BBL) filtrándolo previamente con membrana de 0.20µm (Corning).
7. Agitar suavemente y con una pipeta de 50ml agregar 10ml de medio en cada placa.
8. Dejar gelificar el agar.
9. Guardar las placas a 37°C durante 24 horas para prueba de esterilidad.
10. Al día siguiente sacar, dejar enfriar las placas y guardarlas en refrigeración a 4°C.

#### **Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS) al 0.1%**

- 10mg del SDS (Biorad)
- 10ml de medio 7H9 (Difco)

#### **Procedimiento:**

1. Pesar el SDS y disolverlo en el medio 7H9.
2. Filtrar en la campana con membrana de 0.20µm (Corning).
3. Hacer alícuotas de 1ml y guardar a -20°C.

#### **Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 20%**

- 2g de BSA fracción V (Calbiochem)
- 8ml de medio 7H9 (Difco)

#### **Procedimiento:**

1. Pesar la BSA y disolverla en el medio 7H9.
2. Filtrar dentro de la campana con membrana de 0.45µm (Corning) y después por un filtro de 0.20µm (Corning)
3. Hacer alícuotas de 1ml y guardar a -20°C.

#### **Buffer de Miltenyi (PBS 0.01M, pH=7.2, BSA 0.5%, EDTA 2mM)**

- 1 litro de de solución salina fosfatada (BIO Whittaker) al 0.01M, pH=7.2
- 5g de Albúmina Sérica Bovina 20% (Calbiochem)
- 4ml de la solución de EDTA 0.5M (Gibco BRL)

#### **Procedimiento:**

Pesar 5g de albúmina sérica bovina y disolverla en 900ml de PBS, agregar 4ml de EDTA agitar y aforar a 1000ml con PBS. Filtrar con membrana de 0.20µm en la campana de flujo laminar. Hacer alícuotas de 50ml y etiquetar los tubos, guardar en refrigeración a 4°C.

#### **Vitamina D 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>-forma activa (Sigma)**

Del stock de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 1mM (1000nM), se hizo una dilución 1:100 con medio completo para obtener una concentración 10µM, esto se obtiene mezclando 990µl de medio completo y 10µl de Vitamina D (1000nM). Para poder preparar medio completo con

diferentes concentraciones de Vitamina D, se mezclaron 11,760µl de medio completo con 240µl de Vitamina D (10µM), obteniendo una concentración de 200nM. Para obtener una concentración de 500nM, se mezclaron 11,400µl de medio completo con 600µl de Vitamina D (10µM).

### **Etanol al 70%**

En un tubo de 50ml (Falcon) se agregan 35ml de etanol absoluto (Merck) y 15ml de agua libre de RNAsas (agua-DEPC) (Qiagen)

### **Preparación de la DNAsa**

Agregar en un tubo de 1.6ml (Falcon), 10µl de la solución madre de DNAsa I (Qiagen) y 70µl de buffer de digestión de DNA (RDD) (Qiagen). Mezclar con suavidad. Esta solución se prepara de acuerdo al número de muestras. Para 10 muestras, se mezclan 100µl de DNAsa I (Qiagen) con 700µl de buffer RDD (Qiagen).

### **Síntesis de DNA complementario por transcripción reversa.**

Se preparó la mezcla de RNA/primer para cada muestra en un tubo de 0.2ml estéril agregando los componentes en el siguiente orden:

<b>Componente</b>	<b>Muestra</b>	<b>+RT Control</b>
Random hexámeros (50ng/µl)	1µl	1µl
Mezcla 10mM dNTP	1µl	1µl
5µg RNA total	8µl	-
RNA Control (50ng/µl)	-	1µl
Agua-DEPC	-	7µl
Volumen total	10µl	10µl

Por otra parte, se preparó la mezcla de transcripción reversa (RT) de acuerdo al siguiente protocolo:

<b>Mezcla RT</b>	<b>Por reacción</b>
10X RT buffer	2µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	4µl
0.1M DTT	2 µl
RNaseOUT recombinant	
Ribonuclease inhibitor (40U/µl)	1µl
Volumen Total	9µl

### **Amplificación de LL-37 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Se preparó la mezcla para la reacción de amplificación:

<b>Componente</b>	<b>Por tubo</b>	<b>Control +</b>
10X PCR Buffer sin/Mg+2	2.5	2.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5
10 mM dNTP mix	1	1
Primer Forward ( 10 pM/μl)	1	1 (prim A)
Primer Reverse ( 10 pM/μl)	1	1 (prim B)
Taq polimerasa (1U/μl)	1	1
H <sub>2</sub> O-DEPC	14	16
Total	22	24

### **Análisis de la expresión de genes por PCR en Tiempo Real (Cuantificación relativa).**

Se preparó la mezcla del Master mix para la expresión de genes en un tubo de 0.6ml estéril agregando los siguientes componentes:

#### **Mezcla para Expresión de Genes (18S RNA ribosomal, LL-37)**

	(1 Reacción)	(9X)
Agua DEPC	6.25μl	56.25μl
2x Universal Master Mix	12.5μl	112.5μl
Ensayo 20X (primers y sonda)	<u>1.25μl</u>	<u>11.25μl</u>
	20μl	180μl

#### **Ácido Clorhídrico 1N**

Para preparar 100ml de ácido clorhídrico 1N, añadir 8.58ml de HCl a 80ml de agua desionizada con mucho cuidado pues es una reacción exérgica. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 100ml extremando precauciones.

#### **Sulfanilamida al 1.5% en HCl 1N**

Pesar 1.5g de sulfanilamida (Sigma) y disolver en 80ml de HCl 1N, aforar a 100ml, guardar en refrigeración protegido de la luz.

#### **N-1-Naphtylene-diamine dihydrochloride al 0.15% de agua desionizada**

Pesar 0.15g de N-1-Naphtylene-diamine (Sigma) y disolver en 80ml de agua desionizada, aforar a 100ml y guardar en refrigeración protegido de la luz.

#### **Reactivo de Griess**

Mezlar volúmenes iguales de los reactivos Sulfanilamida al 1.5% y N-1-Naphtylene-diamine dihydrochloride al 0.15% al momento de utilizar.

### Curva estándar para la determinación de óxido nítrico con $\text{NaNO}_2$

Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) peso molecular  $\text{PM}=69\text{g}$

1M= 69g/L

1mM=69mg/L

Para preparar 100ml pesar 6.9mg de  $\text{NaNO}_2$  y disolver en 80ml de agua desionizada, aforar a 100ml.

Con la solución de 1mM al diluirla a 1:10 en RPMI 10% de suero humano descomplementado obteniendo 100nM. Con esta dilución preparar la curva estándar.

Curva:

Concentración final (nM)	$\text{NaNO}_2$ $\mu\text{l}$	RPMI 10% SHD $\mu\text{l}$
0	0	1000
20	200	800
40	400	600
60	600	400
80	800	200
100	1000	0

### Solución Amortiguadora TBE 10X pH8.3 ( Tris 890mM, Ác. bórico 890mM, EDTA 20mM) para electroforesis.

Pesar 7.4g de EDTA (Sigma)

108g de Tris Base (Sigma)

55g de ácido bórico (Sigma)

Disolver en 1000ml agua, ajustar el pH a 8.3 antes de aforar y filtrar la solución utilizando membrana de  $0.45\mu\text{m}$  de diámetro y conservarla a temperatura ambiente.

### Solución Amortiguadora TBE 1X

Tomar 50ml de la solución amortiguadora TBE 10X y agregarla en 450ml de agua para obtener un volumen de 500ml del buffer TBE 1X. Guardar a temperatura ambiente.

### Gel de Acrilamida-Bisacrilamida (30/0.8%)

Componentes	Volumen
Acrilamida 40% (Bio-Rad)	10ml
Agua	25.7ml
TBE 10X	4ml
Persulfato de Amónio (Bio-Rad)	250 $\mu\text{l}$
TEMED (Bio-Rad)	25 $\mu\text{l}$
Volumen Final	40ml

## Procedimiento

1. Se prepara un gel de acrilamida al 10%, mezclando en un matraz los siguientes componentes: 10ml de acrilamida al 40% (Bio-Rad), 25.7ml de agua, 4ml de TBE 10X y 250µl de Persulfato de Amónio (PSA) (Bio-Rad).
2. Se agregan 25 µl de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Rio-Rad) y se mezcla para iniciar la polimerización e inmediatamente verter la solución en los vidrios (molde), eliminando las burbujas.
3. Colocar el peine para hacer los pozos y dejar polimerizar.
4. Quitar el peine deslizándolo suavemente.
5. Preparación de las muestras. Se toman 20µl de cDNA con una gota de colorante loading buffer (BMA).
6. Colocar el gel en la cámara con el buffer de TBE 1X
7. Cargar 25 µl de las muestras en los pozos
8. Correr la electroforesis a 100 volts por 1h.
9. Sacar el gel y teñirlo en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1µg/ml (Sigma) por 15min.
10. Observar el gel en un transiluminador bajo luz UV (Mighty Bright Hoefer Scientific Instruments).
11. Tomar una fotografía.